

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

**EFEITO DE DIFERENTES POSOLOGIAS DO VERNIZ DE CLOREXIDINA A 1%  
NOS NÍVEIS DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS  
NA SALIVA E NO BIOFILME DENTAL**

**Luciana Gazaniga Maia Ribeiro**

Porto Alegre  
Outubro, 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

**Linha de Pesquisa:**

**Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia**

**EFEITO DE DIFERENTES POSOLOGIAS DO VERNIZ DE CLOREXIDINA A 1%  
NOS NÍVEIS DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS  
NA SALIVA E NO BIOFILME DENTAL**

**Luciana Gazaniga Maia Ribeiro**

*Orientadora:* Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Maltz

*Co-Orientadora:* Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lina Naomi Hashizume

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito final para obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica, ênfase em Cariologia.

Porto Alegre, outubro de 2005.

## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico esta dissertação ao meu amado marido **Eduardo**. Agradeço a você, grande companheiro e incentivador, por ter estado presente em todos os momentos desta jornada. Esta conquista é nossa!

## **AGRADECIMENTOS**

---

À professora Marisa Maltz, exemplo de aprimoramento profissional e científico, agradeço pela oportunidade de um convívio gratificante e engrandecedor e pela dedicação e necessária exigência com que conduziu o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Lina Naomi Hashizume, pelo incondicional auxílio em todas as etapas deste trabalho contribuindo com inestimável e indispensável conhecimento, organização e competência.

Aos meus queridos pais, Leoze e Joire, que mesmo de longe acompanharam cada momento desta conquista.

Aos meus familiares, em especial aos meus queridos irmãos Viviana e Júnior, pelo carinho e compreensão dos momentos de ausência.

À equipe do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal, em especial à Clarissa, Juliana e Berenice, pelo apoio e convívio de amizade.

Às alunas do curso de graduação, Fernanda Fagundes e Rochele Mansan, pela dedicação e auxílio nos procedimentos de campo e laboratoriais.

Aos pais e voluntários desta pesquisa, alunos do Instituto Estadual Rio Branco e Fundação Pão dos Pobres, pela contribuição e colaboração em todos os momentos que foram solicitados.

Aos diretores e professores do Instituto Estadual Rio Branco e Fundação Pão dos Pobres por terem nos recebido de forma receptiva, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

À Ivoclar-Vivadent pelo apoio através da doação do verniz Cervitec e verniz placebo.

À empresa Colgate pelo apoio através da doação de escovas e fios dentais.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1: Revisão da Literatura .....</b>	<b>17</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>17</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>18</b>
<b>Materiais e Método .....</b>	<b>19</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>20</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>30</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>36</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 2 .....</b>	<b>41</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>42</b>
<b>Material and Methods .....</b>	<b>43</b>
<b>Results .....</b>	<b>46</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>47</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>55</b>
<b>References .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

---

Não há concordância em relação ao número total e intervalo entre as aplicações do verniz de clorexidina (CLX) a 1%. Além disso, os resultados quanto ao período de redução dos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM) na saliva ou biofilme dental são controversos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, através de um estudo clínico randomizado e controlado, o efeito de diferentes posologias do verniz de CLX a 1% nos níveis de EGM. Pacientes com níveis de EGM  $\geq 10^5$  UFC/ml saliva, 11-16 anos, foram distribuídos em 4 grupos: grupo A (n=14): 1 aplicação do verniz de CLX; grupo B (n=14): 1 aplicação diária do verniz CLX, em 3 dias consecutivos; grupo C (n=15): 3 aplicações do verniz CLX com intervalo de 4 dias entre cada aplicação; grupo D (n=12): 1 aplicação diária do verniz placebo, em 3 dias consecutivos. Amostras de saliva e biofilme dental foram coletadas no início do estudo e 1, 4 e 8 semanas após o término das aplicações e foram cultivadas para avaliação dos níveis de EGM e bactérias totais. Os dados foram avaliados através do teste ANOVA (medidas repetidas) e teste de Tukey. Após 1 semana, observou-se uma leve redução nos níveis salivares de EGM nos grupos A, B e C (-0,70; -0,90; -0,41  $\log_{10}$  UFC/ml saliva; respectivamente), significativa somente nos grupos A e B ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças nos níveis salivares de EGM entre os grupos experimentais nos diferentes períodos do experimento. No biofilme dental, 1 semana após o término do tratamento, foi observado um aumento significativo nos níveis de bactérias totais em todos os grupos experimentais e uma redução significativa nos níveis de EGM apenas no grupo A. O verniz de CLX a 1% resultou em uma leve e curta redução nos níveis de EGM. Este estudo demonstrou que repetidas aplicações do verniz de clorexidina a 1% não aumentam o seu efeito na redução dos níveis de EGM.

**Palavras- chave:** clorexidina, verniz, estreptococos do grupo mutans, saliva, biofilme dental.

## ABSTRACT

---

There is no agreement with respect to the total number of 1% chlorhexidine (CHX) varnish applications and the interval between them. In addition, results on the reduction period of mutans streptococci (MS) in the saliva or dental biofilm are controversial. The aim of the present investigation was to evaluate in a randomized controlled study the effect of different 1% CHX varnish regimens on levels of MS. Subjects with  $MS \geq 10^5$  CFU/ml saliva, 11-16 years old, were allocated in 4 groups: group A (n=14): one CHX varnish application; group B (n=14): CHX varnish was applied once daily on 3 consecutive days; group C (n=15): CHX varnish was applied 3 times with an interval of 4 days between each application; and group D (n=12); placebo varnish was applied once daily on 3 consecutive days. Saliva and dental biofilm samples were collected at baseline and 1, 4, and 8 weeks after the final varnish application and cultivated for MS and total bacterial counts. The results were evaluated by ANOVA (repeated measures) and Tukey test. After 1 week, a slight reduction in salivary levels of MS in groups A, B, and C (-0.70, -0.90, and -0.41  $\log_{10}$  CFU/ml saliva, respectively) was observed, significant only in groups A and B ( $p < 0.05$ ). No difference in salivary levels of MS was observed between the experimental groups in the different experimental periods. After 1 week in the dental biofilm a significant increase in total bacterial counts was observed in all experimental groups while a significant decrease in the levels of MS was observed only in group A. The 1% CHX varnish caused a slight, short-term reduction in MS. The present study demonstrated that repeated applications of 1% CHX varnish do not increase its effects.

**Key Words:** Chlorhexidine, varnish, mutans streptococci, saliva, dental biofilm

## INTRODUÇÃO

---

A importância da presença de microorganismos na etiologia da doença cárie está bem estabelecida sendo os estreptococos do grupo mutans (EGM) os mais relacionados com o seu desenvolvimento (LOESCHE, 1986; VAN HOUTE, 1994). Os EGM são capazes de metabolizar os carboidratos da dieta provocando um aumento na concentração de ácidos orgânicos no biofilme dental, principalmente ácido lático, que pode resultar em perda de mineral da superfície dental com o decorrer do tempo. Algumas características são determinantes do potencial cariogênico destes microorganismos, como: capacidade de adesão à superfície dental, capacidade de transportar rapidamente os carboidratos fermentáveis e convertê-los em ácido, capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares e intracelulares e capacidade de manter o metabolismo dos carboidratos em um meio com baixo pH (HAMADA e SLADE, 1980; DE SOET, NYVAD e KILIAN, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000).

Estudos longitudinais e de prevalência mostram uma correlação positiva entre o número de EGM na saliva e/ou biofilme dental e a doença cárie (IKEDA, SANDHAM e BRADLEY, 1973; KOHLER, PETTERSSON e BRATTHALL, 1981; KRISTOFFERSSON e BRATTHALL, 1982; VAN HOUTE *et al.*, 1990; STRAETEMANS *et al.*, 1998; TWETMAN e PETERSSON, 1999; JOHARJI e ADENUBI, 2001). Tanzer, Livingston e Thompson (2001) em uma revisão sistemática da literatura do período de 1966 a 2000 utilizando o MEDLINE e EMBASE, encontraram 79 estudos longitudinais e casos controle que indicam o importante papel dos EGM na cárie dentária, e ainda, sustentam uma forte associação estatística destes microorganismos com a incidência da lesão cariosa. Estudos mostram que é possível haver desenvolvimento de cárie mesmo na ausência de significantes proporções de estreptococos do grupo mutans (SANSONE *et al.*, 1993; VAN RUYVEN *et al.*, 2000), bem como, altos níveis salivares destes microorganismos podem ser encontrados em populações



com baixa prevalência de cárie (CARLSSON, OLSSON e BRATTHALL, 1985; CARLSSON *et al.*, 1987).

Os EGM não são os únicos microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie. Entretanto, devido suas características, têm a capacidade de causar perda de mineral. Uma das formas de controle da atividade cariogênica seria a redução dos níveis de EGM no biofilme dental através do uso de antimicrobianos com conseqüente modificação da sua composição. Esta modificação ecológica do biofilme pode acarretar no equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização entre a superfície dental e o biofilme dental adjacente (MARSH, 1994). Dentre os antimicrobianos disponíveis, a clorexidina é o agente que mais tem sido investigado no controle da atividade cariogênica (EMILSON, 1994; VAN RIJKOM, TRUIN e VAN 'T HOF, 1996). Este agente reduz o desenvolvimento de alguns microrganismos, destacando-se os EGM que são particularmente sensíveis a esta substância (EMILSON, 1977; MALTZ-TURKIENICZ, KRASSE e EMILSON, 1980; KOO *et al.*, 2003).

A clorexidina possui a capacidade de se adsorver as superfícies da cavidade bucal (tecidos moles e duros) sendo lentamente liberada destes locais, com conseqüente ação por maior período de tempo. Por ser uma molécula carregada positivamente, a clorexidina reage com moléculas carregadas negativamente (grupo fosfato, carboxílico ou sulfato) encontradas na superfície bacteriana. Em baixas concentrações possui uma ação bacteriostática causando alterações na membrana celular, tornando-a mais permeável, com conseqüente extravasamento dos constituintes intracelulares. Em altas concentrações sua ação é bactericida provocando a precipitação do conteúdo celular de forma irreversível. A clorexidina também atua inibindo a ação da enzima glicosiltransferase que é responsável pelo acúmulo de bactérias na superfície dental (HUGO e LONGWORTH, 1964; HUGO e LONGWORTH, 1966; SCHEIE e KJEILEN, 1987; KOO *et al.*, 2003).

A clorexidina pode ser apresentada na formulação de dentifrícios, soluções, géis ou vernizes. As soluções são encontradas principalmente nas concentrações de 0,12% e 0,2%. Quanto ao gel de clorexidina, a concentração de 1% é a que mais tem sido investigada e, quanto ao verniz de clorexidina encontram-se disponíveis no mercado as concentrações de 1% (Cervitec<sup>®</sup>), 10% (Chlorzoin<sup>®</sup>), 20% (BioC<sup>®</sup>) e 35% (EC40<sup>®</sup>). Baixas concentrações de clorexidina (0,12% a 0,4%, dentifrício e solução) resultam na inibição da formação do biofilme dental e redução da inflamação gengival (ELDRIDGE *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2001; CHARLES *et al.*, 2004) e, concentrações mais altas (1% a 40%, gel e verniz) demonstram um efeito adicional sobre os microorganismos cariogênicos. Estudos observaram uma redução nos níveis de EGM após tratamento com gel e verniz de clorexidina com conseqüente diminuição no aparecimento de novas lesões cariosas (ZICKERT, EMILSON e KRASSE, 1982; LINDQUIST *et al.*, 1989; JOHARJI e ADENUBI, 2001; ARAUJO *et al.*, 2002; BACA *et al.*, 2002). Alguns estudos também demonstraram que a redução de EGM após tratamento com clorexidina resultou em um biofilme com menor produção de ácido (SKOLD-LARSSON, BORGSTROM e TWETMAN, 2001; GERARDU *et al.*, 2003).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar o efeito da clorexidina na redução dos níveis de EGM na cavidade bucal. Os bochechos com soluções de clorexidina a 0,12% e 0,2% são avaliados principalmente logo após o término do tratamento com estas substâncias. Efeito mais prolongado pode ser obtido com concentrações acima de 1%, na formulação de gel ou verniz. O gel de clorexidina é estudado desde a década de 70. De acordo com os estudos da literatura, o gel pode ser aplicado através da escova dental, da profilaxia profissional ou através do uso de moldeiras individuais em casa e / ou no consultório. Os resultados do efeito do tratamento com gel de clorexidina nos níveis de EGM podem variar de acordo com a metodologia de aplicação empregada. Em 1985, foi desenvolvido o verniz de clorexidina com o objetivo de aumentar a substantividade e a efetividade de liberação da

clorexidina na cavidade bucal. Dentre suas diferentes formulações, o verniz de clorexidina a 1% é o mais investigado. Entretanto, existem variações na sua metodologia de aplicação bem como controvérsia nos resultados quanto ao período de redução dos níveis de EGM na saliva e / ou biofilme dental.

## **OBJETIVO**

---

Avaliar o efeito de diferentes posologias do verniz de clorexidina a 1% nos níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva e no biofilme dental.

Esta dissertação será apresentada na forma de dois artigos:

**Artigo Científico 1:** Efeito de diferentes formulações de clorexidina na redução dos níveis de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal: revisão sistemática da literatura.

**Artigo Científico 2:** Effect of different 1% chlorhexidine varnish regimens on levels of mutans streptococci.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ARAÚJO, A. M.; *et al.* Effect of Cervitec on mutans streptococci in plaque and on caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. *Caries Res.*, Basel, v.36, n.5, p.373-376, Sep.-Oct. 2002.
- BACA, P.; *et al.* Effectiveness of chlorhexidine-thymol varnish for caries reduction in permanent first molars of 6-7-year-old children: 24-month clinical trial. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, Copenhagen, v.30, n.5, p.363-368, Oct. 2002.
- CARLSSON, P.; *et al.* High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. *Oral Microbiol. Immunol.*, Philadelphia, v.2, n.3, p.121-124, Sep. 1987.
- CARLSSON, P., OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.30, n.3, p.265-268, Mar. 1985.
- CHARLES, C. H.; *et al.* Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v.31, n.10, p.878-884, Oct. 2004.
- DE SOET, J. J., NYVAD, B.; KILIAN, M. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res.*, Basel, v.34, n.6, p.486-490, Nov.-Dec. 2000.
- ELDRIDGE, K. R.; *et al.* Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. *J. Prosthet. Dent.*, St. Louis, v.80, n.6, p.685-690, Dec. 1998.
- EMILSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.85, n.4, p.255-265, May. 1977.
- EMILSON, C. G. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.682-691, Mar. 1994.
- GERARDU, V. A.; *et al.* The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.37, n.5, p.369-373, Sep.-Oct. 2003.
- HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.44, n.2, p.331-384, Jun. 1980.
- HOFFMANN, T.; *et al.* Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin. Oral Investig.*, Berlin, v.5, n.2, p.89-95, Jun. 2001.
- HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.16, p.655-662, Oct. 1964.
- HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.18, n.9, p.569-578, Sep. 1966.

- IKEDA, T., SANDHAM, H. J.; BRADLEY, E. L., JR. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.18, n.4, p.555-566, Apr. 1973.
- JOHARJI, R. M.; ADENUBI, J. O. Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. *J. Dent.*, Bristol, v.29, n.4, p.247-254, May. 2001.
- KOHLER, B., PETTERSSON, B. M.; BRATTHALL, D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.89, n.1, p.19-25, Feb. 1981.
- KOO, H.; *et al.* Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol. Immunol.*, Philadelphia, v.17, n.6, p.337-343, Dec. 2003.
- KRISTOFFERSSON, K.; BRATTHALL, D. Transient reduction of *Streptococcus mutans* interdentially by chlorhexidine gel. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.90, n.6, p.417-422, Dec. 1982.
- LINDQUIST, B.; *et al.* Effect of different carriers preventive measures in children highly infected with mutans streptococci. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.97, n.4, p.330-337, Aug. 1989.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
- MALTZ-TURKIENICZ, M., KRASSE, B.; EMILSON, C. G. Effects of chlorhexidine and iodine on in vitro plaques of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.88, n.1, p.28-33, Feb. 1980.
- MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v.8, n.2, p.263-271, Jul. 1994.
- MATTOS-GRANER, R. O.; *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res.*, Washington, v.79, n.6, p.1371-1377, Jun. 2000.
- SANSONE, C.; *et al.* The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J. Dent. Res.*, Washington, v.72, n.2, p.508-516, Feb. 1993.
- SCHEIE, A. A.; KJEILEN, J. C. Effects of chlorhexidine, NaF and SnF<sub>2</sub> on glucan formation by salivary and culture supernatant GTF adsorbed to hydroxyapatite. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.95, n.6, p.532-535, Dec. 1987.
- SKOLD-LARSSON, K., BORGSTROM, M. K.; TWETMAN, S. Effect of an antibacterial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. *Clin. Oral Investig.*, Berlin, v.5, n.2, p.118-121, Jun. 2001.
- STRAETEMANS, M. M.; *et al.* Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. *J. Dent. Res.*, Washington, v.77, n.10, p.1851-1855, Oct. 1998.
- TANZER, J. M., LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. *J. Dent. Educ.*, Washington, v.65, n.10, p.1028-1037, Oct. 2001.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Interdental caries incidence and progression in relation to mutans streptococci suppression after chlorhexidine-thymol varnish treatments in schoolchildren. *Acta Odontol. Scand.*, Stockholm, v.57, n.3, p.144-148, Jun. 1999.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.

VAN HOUTE, J.; *et al.* Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J. Dent. Res.*, Washington, v.69, n.8, p.1463-1468, Aug. 1990.

VAN RIJKOM, H. M., TRUIN, G. J.; VAN 'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J. Dent. Res.*, Washington, v.75, n.2, p.790-795, Feb. 1996.

VAN RUYVEN, F. O.; *et al.* Relationship among mutans streptococci, "low-pH" bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J. Dent. Res.*, Washington, v.79, n.2, p.778-784, Feb. 2000.

ZICKERT, I., EMILSON, C. G.; KRASSE, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.27, n.10, p.861-868, Oct. 1982.



## **ARTIGO CIENTÍFICO 1: Revisão da Literatura**

---

### **Efeito de diferentes formulações de clorexidina na redução dos níveis de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal: revisão sistemática da literatura**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar, através de uma revisão sistemática da literatura, o efeito de soluções, géis e vernizes de clorexidina (CLX) nos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM) na cavidade bucal. Foi realizado um levantamento no Pubmed e Lilacs até janeiro de 2005 sendo incluídos apenas estudos clínicos (n=51). Os critérios utilizados para exclusão foram: associação de outros métodos preventivos, ausência de tratamento restaurador prévio, publicação do mesmo resultado em artigos científicos distintos, falta de dados quanto aos resultados. Existe uma grande variação na quantidade de solução de CLX utilizada durante o bochecho, tempo de bochecho, frequência e período de tratamento. Estudos randomizados controlados não indicam um efeito a longo prazo após bochechos com solução de CLX (0,12% e 0,2%) nos níveis salivares de EGM. A concentração de 1% de CLX foi a mais investigada tanto para o gel quanto para o verniz. Redução significativa foi obtida após tratamento intensivo com gel (3-4 aplicações diárias, em 2 dias) e após aplicações diárias durante 10 e 14 dias consecutivos. Não é possível afirmar que o verniz de clorexidina a 1% apresenta melhores resultados quando aplicado de forma intensiva em comparação as aplicações realizadas com intervalo de 1 ou mais meses. Existe uma grande variação em relação aos resultados do seu efeito nos níveis de EGM. O aumento na concentração do verniz de CLX de 1% para 40% apresentou melhor efeito no período de redução dos EGM. Nos estudos que compararam gel e verniz, observou-se que apesar do gel ter demonstrado uma redução levemente maior em relação ao verniz, não foram observadas diferenças significativas entre as duas formas de tratamento. Devido a grande variabilidade individual de resposta após o tratamento com CLX existe a necessidade de monitoramento do seu efeito.

**Palavras-chave:** clorexidina, solução, gel, verniz, estreptococos do grupo mutans.

## INTRODUÇÃO

Os estreptococos do grupo mutans (EGM) são os microorganismos mais relacionados com o desenvolvimento da doença cárie (LOESCHE, 1986; VAN HOUTE, 1994). Devido as suas características de capacidade de adesão à superfície dental, capacidade de transportar rapidamente os carboidratos fermentáveis e convertê-los em ácido, capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares e intracelulares e capacidade de manter o metabolismo dos carboidratos em um meio com baixo pH (ácido-tolerantes) podem causar perda de mineral da estrutura dental (HAMADA e SLADE, 1980; DE SOET, NYVAD e KILIAN, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000). A presença de EGM no biofilme dental tem sido utilizada como indicador de um biofilme dental cariogênico (LOESCHE *et al.*, 1975). Uma das formas de controle da atividade cariogênica seria a redução destes microorganismos no biofilme dental através do uso de antimicrobianos com conseqüente modificação da sua composição. Esta modificação ecológica do biofilme pode acarretar no equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização entre a superfície dental e a placa adjacente (MARSH, 1994).

Dentre os antimicrobianos disponíveis para uso em Odontologia, a clorexidina (CLX) é o agente que mais tem sido investigado no controle da atividade cariogênica (ZICKERT, EMILSON e KRASSE, 1982; LINDQUIST *et al.*, 1989; EMILSON, 1994; VAN RIJKOM, TRUIN e VAN'T HOF, 1996). A clorexidina reduz o desenvolvimento de alguns microrganismos, destacando-se os EGM que são particularmente sensíveis a esta substância (EMILSON, 1977; MALTZ-TURKIENICZ, KRASSE e EMILSON, 1980; KOO *et al.*, 2003).

A clorexidina atua na atividade metabólica das bactérias onde, em baixas concentrações, é bacteriostática causando alterações nas funções da membrana celular e extravasamento dos constituintes intracelulares e, em altas concentrações, é bactericida

provocando a precipitação do conteúdo celular de forma irreversível (HUGO e LONGWORTH, 1964; HUGO e LONGWORTH, 1966). Também atua inibindo a ação da enzima glicosiltransferase que é responsável pelo acúmulo de bactérias na superfície dental (SCHEIE e KJEILEN, 1987; KOO *et al.*, 2003).

A clorexidina pode ser encontrada na formulação de dentifrícios (0,4%), soluções (0,12% e 0,2%), géis (1%) ou vernizes (1%, 10%, 20% e 35%). Vários estudos têm sido desenvolvidos para avaliar o efeito de diferentes formulações de clorexidina na redução dos EGM na cavidade bucal. O objetivo deste estudo foi avaliar, através de uma revisão sistemática da literatura, o efeito de soluções, géis e vernizes de clorexidina no período de redução dos níveis de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal.

## **MATERIAIS E MÉTODO**

Foi realizado um levantamento, até o período de janeiro de 2005, nas bases de dados PUBMED e LILACS utilizando-se como palavras-chave “chlorhexidine + streptococcus mutans”, “chlorhexidine + mutans streptococci” e “clorexidina + streptococcus mutans”. Não foram incluídos neste levantamento estudos não publicados e trabalhos definidos como teses e dissertações. Foram incluídos estudos clínicos que avaliaram o efeito de soluções, géis ou vernizes de clorexidina nos níveis de EGM. De 308 referências encontradas no PUBMED e 14 referências encontradas no LILACS, foram incluídos após a leitura dos resumos 88 e 2 artigos, respectivamente. Após a leitura completa dos artigos selecionados foram excluídos mais 39 estudos. Os critérios para a exclusão destes trabalhos foram: (1) a associação adicional de outros métodos preventivos como o uso de alguma forma de fluoreto, orientação de higiene bucal, aconselhamento dietético, profilaxia profissional intensiva, uso de verniz de poliuretano sobre o verniz de clorexidina (total de 22 artigos); (2) ausência de tratamento restaurador prévio (dois artigos); (3) mesmo resultado publicado em artigos científicos

distintos (dois artigos) e (4) falta de dados quanto à redução de EGM nos diferentes períodos de avaliação (13 artigos); Portanto, foram incluídos nesta revisão 51 estudos, sendo 11 relacionados à solução de clorexidina, 14 ao gel de clorexidina, 22 ao verniz de clorexidina e quatro comparações entre gel e verniz de clorexidina.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Solução de Clorexidina**

Os estudos relacionados à solução de clorexidina avaliaram seu efeito na redução apenas nos níveis salivares de EGM, não analisando a sua ação no biofilme dental. As concentrações de clorexidina testadas foram 0,12% e 0,2%, sendo que um trabalho comparou as concentrações de 0,025%, 0,05% e 0,12% (CLARK e GUEST, 1994). Quanto ao método de uso, foram observadas grandes variações no que se refere à quantidade de solução utilizada durante o bochecho, tempo de bochecho, frequência e período de tratamento dificultando a comparação dos estudos (Tabela 1).

Nos estudos que avaliaram a solução de clorexidina a 0,12% a quantidade de solução variou entre 10 e 15 ml sendo que um estudo utilizou 4 ml de solução. Os bochechos foram realizados uma vez ao dia, duas vezes ao dia ou semanal; durante 30 segundos ou 1 minuto, por períodos de tratamentos desde um único bochecho até seis semanas. Na concentração de 0,2% de clorexidina, a quantidade de solução utilizada em cada bochecho variou entre 5 e 10 ml; com bochechos realizados uma, duas ou quatro vezes ao dia; durante 1 minuto e, com tempo de tratamento de uma a quatro semanas.

A maioria dos trabalhos incluídos nesta revisão avaliou o efeito de bochechos com solução de clorexidina a 0,12% e 0,2% logo após o término do tratamento (DAHLEN, 1984; HOOVER e TO, 1990; CLARK e GUEST, 1994; ELDRIDGE *et al.*, 1998; KULKARNI e

DAMLE, 2003; DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2004). Todos observaram redução significativa até 24 horas após a realização dos bochechos com exceção do estudo de Dahlen (1984).

Dos estudos que avaliaram o efeito a longo prazo do tratamento com solução de clorexidina, somente um (CLX 0,12%) apresentou efeito duradouro (seis semanas) na redução dos níveis salivares de EGM (PERSSON *et al.*, 1991). Neste estudo o período de tratamento foi realizado por um período prolongado (seis semanas). Tratamentos com solução de CLX a 0,12% realizados durante uma ou duas semanas, com frequência diária de um ou dois bochechos não resultaram em redução significativa nos níveis salivares de EGM a longo prazo (LIMA *et al.*, 2001; GROPPPO *et al.*, 2002; MENENDEZ *et al.*, 2005). O aumento na concentração de CLX para 0,2% e no período de tratamento para quatro semanas apresentou resultado semelhante aos estudos com menor concentração ou menor período de tratamento (ZANELA, BIJELLA e ROSA, 2002).

Dentre os 11 artigos relacionados à solução de clorexidina, apenas cinco estudos foram randomizados e controlados. Destes, dois avaliaram o efeito até 24 horas após o término dos bochechos, sendo que um observou redução significativa nos níveis de EGM (HOOVER e TO, 1990) e outro não (DAHLEN, 1984). Três avaliaram o efeito da solução de clorexidina a longo prazo (GROPPPO *et al.*, 2002; ZANELA, BIJELLA e ROSA, 2002; MENENDEZ *et al.*, 2005) onde dois não demonstraram redução significativa em nenhum dos períodos avaliados e um apresentou redução apenas durante o tratamento (terceiro e sexto dia após o início dos bochechos). Sendo assim, os estudos com maior evidência científica (randomizados e controlados) não indicam um efeito a longo prazo após bochechos com solução de clorexidina nos níveis salivares de EGM.

## **Gel de Clorexidina**

O gel contendo 1% de clorexidina foi o mais estudado na redução dos níveis de EGM na saliva e/ou biofilme dental, entretanto, outras concentrações também foram investigadas, como: 0,2% (WAN *et al.*, 2003), 0,5% (EMILSON e FORNELL, 1976) e 5% (SCHAEKEN *et al.*, 1984; SCHAEKEN *et al.*, 1986).

O gel de clorexidina a 0,2%, 0,5% e 1% é aplicado através da escova dental (EMILSON e FORNELL, 1976; TWETMAN e GRINDEFJORD, 1999; WAN *et al.*, 2003) e nas concentrações de 1% e 5% é aplicado através da profilaxia profissional (OSTELA, KARHUVAARA e TENOVUO, 1991) do auxílio de moldeiras individuais (EMILSON, 1981; MALTZ, ZICKERT e KRASSE, 1981; CLARK, MORGAN e MACENTEE, 1991; ROCHA *et al.*, 2003).

A aplicação do gel de clorexidina a 0,2% e 0,5% através da escova dental não apresentou redução significativa nos níveis de EGM quando comparada ao gel placebo (EMILSON e FORNELL, 1976; WAN *et al.*, 2003). Em ambos os estudos observou-se um decréscimo nos níveis destes microorganismos tanto no grupo teste quanto no grupo controle. O gel de clorexidina a 1% aplicado através da escova dental, duas vezes ao dia no período de duas semanas, reduziu os níveis de EGM até quatro semanas após o término do tratamento (TWETMAN e GRINDEFJORD, 1999). Entretanto, este estudo não apresentou um grupo controle.

O gel de clorexidina a 1% é aplicado com o auxílio de moldeiras individuais no consultório e/ou em casa. Nos tratamentos estudados foram realizadas aplicações de forma intensiva em um ou dois dias consecutivos ou aplicações diárias por um período de tempo variável entre 7 a 14 dias consecutivos.

O tratamento intensivo com gel de clorexidina a 1% (três aplicações de 5 minutos) em uma única sessão resultou em redução significativa nos níveis de EGM apenas por um

período até três dias (EMILSON, GISSELSSON e BIRKHED, 1999). Kristoffersson e Bratthall (1982) em um estudo de boca-dividida avaliaram o efeito de uma, duas ou três aplicações de 3 minutos, em duas sessões. Observaram que uma semana após 49% a 64% dos sítios apresentavam-se colonizados por EGM.

Maltz, Zickert e Krasse (1981) estudaram o efeito de um tratamento de forma intensiva, com quatro aplicações no primeiro dia e três aplicações no segundo dia, em estudantes com 14 a 15 anos de idade e contagem inicial de EGM maior ou igual a  $2,0 \times 10^5$  UFC/ml saliva. Observaram que após 24 semanas do término do tratamento 20% dos voluntários ainda apresentavam valores abaixo daqueles encontrados antes das aplicações do gel de clorexidina a 1%. Entretanto, uma grande variação no tempo de recolonização do EGM foi observada entre os indivíduos. Resultado semelhante foi observado por Rocha *et al.* (2003). Devido a esta variabilidade na resposta ao tratamento, Wallman *et al.* (1998) individualizaram o tratamento em pacientes com contagem inicial de EGM maior que  $5,0 \times 10^5$  UFC/ml saliva e número elevado de dentes restaurados. O efeito do tratamento foi monitorado durante 12 semanas sendo repetido de três a nove vezes para a manutenção dos valores de EGM abaixo dos níveis de detecção.

Tratamentos realizados durante 10 e 14 dias consecutivos (uma aplicação diária durante 5 minutos) ocasionaram redução nos níveis de EGM por um período de quatro (CLARK, MORGAN e MACENTEE, 1991) e 14 semanas (EMILSON, 1981). A associação do tratamento intensivo com gel de clorexidina a 1%, antes e após, aplicações realizadas em casa durante 7 dias consecutivos potencializa seu efeito sobre os EGM com reduções significativas até 26 semanas após o término do tratamento (EMILSON, LINDQUIST e WENNERHOLM, 1987).

Profilaxia profissional com gel de clorexidina a 1% ocasiona uma redução nos níveis de EGM por curto período de tempo. Três sessões de profilaxia profissional, executadas no

período de uma semana, resultaram em redução significativa por duas semanas (OSTELA, KARHUVAARA e TENOVUO, 1991). Quando a profilaxia foi realizada uma única vez, a redução de EGM foi observada por três dias (EMILSON, GISSELSSON e BIRKHED, 1999).

O aumento da concentração do gel de clorexidina de 1% para 5% parece não intensificar seu efeito na redução dos níveis de EGM (SCHAEKEN *et al.*, 1984; SCHAEKEN *et al.*, 1986).

Dos 14 artigos relacionados ao gel de clorexidina, 7 foram estudos clínicos randomizados sendo que dentre estes 5 eram controlados. Embora muitos estudos (n = 9) não tenham preenchido o critério de randomização e/ou controle é possível observar que há uma coerência nos resultados encontrados. A administração do gel de clorexidina em uma única sessão (1-3 aplicações / sessão) resultou em uma pequena e curta redução nos níveis de EGM. Redução significativa nos níveis destes microorganismos pode ser obtida após tratamentos intensivos (3-4 aplicações diárias, em dois dias) ou em aplicações diárias por períodos de 10 e 14 dias. Entretanto, observa-se uma grande variação na resposta individual ao tratamento tornando necessária uma reavaliação dos níveis de EGM durante o tratamento.

### **Verniz de Clorexidina**

O primeiro verniz, contendo 10% de clorexidina na sua formulação, foi desenvolvido por Balanyk e Sandham (1985) com o objetivo de aumentar a substantividade e a efetividade de liberação da clorexidina na cavidade bucal. Desde então, vários estudos têm sido realizados com este tipo de material, em diferentes concentrações (1%, 3%, 20%, 30%, 40% e 50%), com a finalidade de avaliar seu efeito na redução dos níveis de EGM na saliva e no biofilme dental. Atualmente, tem-se à disposição no mercado os vernizes nas concentrações de clorexidina igual a 1% (Cervitec<sup>®</sup>), 10% (Chlorzoin<sup>®</sup>), 20% (BioC<sup>®</sup>) e 35% (EC40<sup>®</sup>). Dentre estes, o verniz de clorexidina a 1% é o mais investigado.



O tratamento com verniz de clorexidina a 1% pode ser intensivo (2-4 aplicações com intervalo de 2-7 dias entre elas) ou não (aplicações com intervalos  $\geq 30$  dias). Observa-se, portanto, uma grande variação quanto ao número total e intervalo entre suas aplicações. A maioria dos estudos que avaliaram o efeito do verniz de clorexidina a 1% nos níveis de EGM não são controlados ( $n = 6$ ). Dentre os estudos controlados, alguns utilizaram o desenho experimental de boca-dividida ( $n = 4$ ) e apenas um estudo apresentou grupo controle (tabela 3). O desenho experimental de boca-dividida é problemático quando se quer avaliar o efeito de agentes antimicrobianos. A clorexidina devido a sua característica de substantividade possui a capacidade de ficar retida nas superfícies moles e duras da cavidade bucal com conseqüente liberação por período prolongado. Esta propriedade faz com que o tratamento de um quadrante possa interferir na ecologia bucal. Os trabalhos com este tipo de desenho experimental não foram excluídos desta revisão porque: (1) em dois estudos não observou-se nenhum efeito no quadrante controle (TWETMAN, HALLGREN e PETERSSON, 1995; SKOLD-LARSSON, BORGSTROM e TWETMAN, 2001); (2) em dois estudos observou-se uma redução nos níveis de EGM do biofilme dental no quadrante controle, entretanto, o quadrante teste apresentou um decréscimo mais acentuado,  $p < 0,05$  (PETERSSON et al., 1991; ARAUJO et al., 2002); (3) a redução nos níveis de EGM observada nestes trabalhos foi semelhante a de outros trabalhos com desenho experimental em paralelo.

Os resultados relacionados ao período de redução dos níveis de EGM após aplicações do verniz de clorexidina a 1% são controversos. Estudos com tratamento intensivo (duas aplicações, no período de duas semanas) demonstraram uma redução nos níveis de EGM do biofilme dental de três meses (PETERSSON *et al.*, 1991). Entretanto, o mesmo grupo de pesquisadores observou uma variação nos resultados com redução de três dias a duas e três semanas (TWETMAN, HALLGREN e PETERSSON, 1995; TWETMAN e PETERSSON, 1997b; SKOLD-LARSSON, BORGSTROM e TWETMAN, 2001). Wallman e Birkhed

(2002) e Petersson *et al.* (1991) também avaliaram o efeito do verniz de clorexidina a 1% nos níveis salivares de EGM, enquanto o primeiro não observou diferença nestes níveis, o segundo encontrou uma redução significativa no período de três meses. O aumento de duas para três aplicações parece não alterar seu efeito. Attin *et al.* (2003) encontraram redução nos níveis de EGM no biofilme dental após um mês do término do tratamento e após 3 meses na saliva, enquanto que, Twetman e Petersson (1998, 1999) observaram o contrário, redução até um mês pós-tratamento na saliva e de três meses no biofilme dental.

Aplicações mensais (3 aplicações) do verniz de clorexidina a 1% resultaram em uma redução significativa nos níveis de EGM no biofilme dental um mês após a primeira aplicação, porém, sem efeito após as aplicações subsequentes. Na saliva, não houve diferença significativa em nenhum dos períodos avaliados (TWETMAN e PETERSSON, 1997a). Aplicações adicionais a um tratamento intensivo, um mês e três meses após o início do tratamento, não prolongaram seu efeito (TWETMAN, HALLGREN e PETERSSON, 1995).

O tratamento com verniz de clorexidina a 1% tem resultado em um pequeno decréscimo nos níveis de EGM. Além disso, trabalhos demonstraram que uma proporção considerável do total de sítios tratados não responde favoravelmente ao tratamento com o verniz de clorexidina a 1%, permanecendo com níveis de EGM inalterados ou com acréscimo em relação aos valores iniciais (TWETMAN e PETERSSON, 1997b; HEINTZE e TWETMAN, 2002). Apenas um estudo não detectou a presença destes microorganismos pós-tratamento. Seus resultados são discrepantes da literatura também em relação ao período de redução uma vez que o verniz foi aplicado na superfície oclusal de um dente (molar) e houve redução significativa na saliva até seis meses após o término do tratamento (ARAUJO *et al.*, 2002).

No único estudo com grupo controle (verniz placebo), o verniz de clorexidina a 1% foi aplicado duas vezes com intervalo de 3-4 dias entre as aplicações. O tratamento apresentou

efeito apenas no biofilme dental, não sendo observado na saliva. No biofilme dental houve um decréscimo significativo nos níveis de EGM uma semana após o término das aplicações. Na avaliação do efeito do tratamento um mês e dois meses após, foi observado um aumento progressivo nos níveis de EGM, entretanto, com valores significativamente menores em relação aos valores encontrados antes do tratamento apenas no primeiro mês. Entre o segundo e terceiro mês foi observado um decréscimo nos níveis de EGM com conseqüente diferença significativa em relação aos valores iniciais. Os autores concluíram que os níveis de EGM permaneceram abaixo dos níveis iniciais até o terceiro mês após o término do tratamento. Entretanto, os resultados encontrados no primeiro, segundo e terceiro mês sugerem que a partir do primeiro mês houve uma variação normal nos níveis de EGM e não um efeito do tratamento em si (WALLMAN e BIRKHED, 2002).

A redução prolongada dos níveis de EGM após aplicação tópica do verniz contendo clorexidina na sua composição parece ser dependente da sua concentração. O verniz de clorexidina a 40% é mais efetivo contra os EGM do que vernizes contendo 10 ou 20% (SCHAEKEN, VAN DER HOEVEN e HENDRIKS, 1989) e 25 ou 33% (SCHAEKEN *et al.*, 1991). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre tratamentos realizados com verniz de clorexidina nas concentrações de 10% e 20% (SANDHAM, NADEAU e PHILLIPS, 1992) e, entre 40% e 50% (SCHAEKEN e DE HAAN, 1989).

A aplicação do verniz com uma concentração maior ou igual a 40% causa gosto desagradável por várias horas após o tratamento (SCHAEKEN e DE HAAN, 1989; ATTIN *et al.*, 2003). Este efeito indesejável pode ser diminuído através da redução da concentração de clorexidina ou do seu tempo de contato com a superfície de aplicação. Por este motivo, a maioria dos estudos com verniz de clorexidina a 40% utilizam como metodologia uma menor frequência de aplicação, período de intervalo maior entre as aplicações e remoção do verniz com o auxílio de instrumentos após 8 a 15 minutos (tabela 4).

O verniz de clorexidina a 40% tem sido aplicado uma única vez (SCHAEKEN, VAN DER HOEVEN e VAN DEN KIEBOOM, 1994; PIENIHAKKINEN *et al.*, 1995; GERARDU *et al.*, 2003), de forma intensiva (duas aplicações no intervalo de 1 semana) (IE e SCHAEKEN, 1993) ou mensalmente (SCHAEKEN, KELTJENS e VAN DER HOEVEN, 1991; SODERLING *et al.*, 2000). Os trabalhos que realizaram uma única aplicação do verniz de clorexidina a 40% e utilizaram a mesma metodologia de quantificação dos níveis de EGM (diluição das amostras e cultivo) apresentaram resultados variáveis de uma semana (GERARDU *et al.*, 2003), um mês (PIENIHAKKINEN *et al.*, 1995) e dois meses (IE e SCHAEKEN, 1993). Com o aumento da frequência para uma vez por mês durante três meses o efeito observado foi de três meses (SCHAEKEN, KELTJENS e VAN DER HOEVEN, 1991). Este efeito foi ainda mais duradouro (quatro meses) quando foi realizado tratamento de forma intensiva (duas aplicações, no intervalo de uma semana) (IE e SCHAEKEN, 1993).

Um novo método de aplicação do verniz contendo 3% de clorexidina foi criado com o objetivo de promover uma liberação ainda mais lenta da clorexidina no meio bucal. Nesta metodologia, moldeiras individuais são revestidas uma vez com verniz de clorexidina a 3% e utilizadas por sete horas, à noite, durante sete dias consecutivos. Steinberg *et al.* (1991) demonstraram redução significativa nos níveis salivares durante todo o período de avaliação (35 dias após o início do tratamento) e, Hildebrandt *et al.* (1992) observaram redução de até três meses. Hildebrandt (1996) avaliou o efeito deste método de tratamento realizado por um período de tempo maior, ou seja, os voluntários utilizaram a moldeira conforme descrito anteriormente por quatro semanas, com intervalo de uma semana entre cada semana de tratamento. O tratamento repetido demonstrou uma redução progressiva na redução dos níveis de EGM, porém, o resultado a longo prazo não foi avaliado.

A análise conjunta dos trabalhos indica que: (1) não é possível afirmar que o verniz de clorexidina a 1% apresenta melhores resultados quando aplicado de forma intensiva em

comparação as aplicações realizadas com intervalo de um ou mais meses. Somente dois estudos avaliaram o efeito de aplicações mensais e, os estudos com aplicação intensiva apresentaram resultados controversos e com variações no efeito sobre os níveis de EGM (desde ausência de efeito até períodos de redução de três dias a três meses). Além disso, apenas um estudo preenche os critérios ideais de randomização e controle; (2) o verniz de clorexidina a 40% apesar da variabilidade dos resultados apresentou um maior efeito no período de redução dos níveis de EGM, em relação ao verniz de clorexidina a 1%; (3) a aplicação interna do verniz de clorexidina em moldeiras parece ser uma forma promissora de lenta liberação da clorexidina no meio bucal; (4) uma grande variação na resposta individual ao tratamento foi observada sendo necessário o monitoramento dos níveis de EGM logo após a aplicação do verniz para avaliação individual do efeito deste agente.

### **Gel X Verniz**

Foram encontrados quatro estudos que compararam o efeito do gel e verniz contendo clorexidina na redução dos níveis de EGM (KELTJENS *et al.*, 1992; TWETMAN e PETERSSON, 1998; HEINTZE e TWETMAN, 2002; WALLMAN e BIRKHED, 2002) (Tabela 5).

A utilização do gel de clorexidina a 1% em uma única aplicação (profilaxia profissional) ou com maior frequência (escovação dental diária durante duas semanas) apresentaram resultados inferiores ao verniz de clorexidina a 1% e 40%. Nestas aplicações além do gel ter sido utilizado em menor quantidade do que quando é aplicado através de moldeiras também foi diluído na saliva (HEINTZE e TWETMAN, 2002)

Keltjens *et al.* (1992) compararam o efeito de uma aplicação do verniz de clorexidina a 40% com aplicações diárias do gel de clorexidina a 1%, realizadas em casa durante sete dias consecutivos. Tanto o verniz quanto o gel reduziram de forma significativa os níveis de EGM

no biofilme dental, não havendo diferença entre os dois grupos. Entretanto, o tratamento com gel ocasionou um efeito mais duradouro (verniz - quatro semanas; gel - oito semanas). Twetman e Petersson (1998) e Wallman e Birkhed (2002) também não observaram diferenças significativas entre as duas formulações de clorexidina (gel CLX 1% e verniz CLX 1%), embora o gel tenha demonstrado uma redução levemente maior em relação ao verniz. Apesar destes dois estudos encontrados na literatura não terem demonstrado superioridade significativa do gel em relação ao verniz existe uma tendência de melhores resultados com o uso do gel. Mais estudos são necessários.

## **CONCLUSÕES**

De acordo com os estudos analisados é possível concluir que: (1) bochechos com solução de clorexidina não apresentam efeito a longo prazo nos níveis salivares de EGM; (2) o gel de clorexidina resulta em redução significativa nos níveis de EGM após tratamentos intensivos (3-4 aplicações diárias, em dois dias) ou em aplicações diárias por períodos de 10 e 14 dias; (3) o tratamento com verniz de clorexidina apresenta uma grande variação no nível e no período de redução dos níveis de EGM; (4) existe a necessidade de monitoramento do efeito do tratamento com clorexidina devido a grande variabilidade individual de resposta a este tipo de tratamento.

**Tabela 1 - Relação de estudos que avaliaram o efeito da solução de clorexidina (CLX) nos níveis salivares de estreptococos do grupo mutans (EGM).**

Autor, ano	Critério Inclusão	n*	Faixa Etária (anos)	Tipo Estudo	Intervenção			Bochecho			Período de Tratamento	Período de Avaliação	Resultado**
					Teste (T)	Controle (C)	Quantidade	Tempo	Frequência	Período de redução significativa níveis salivares de EGM			
Persson et al, 1991	6 ou + dentes remanescentes	21	61-98	R <sup>#</sup> / NC <sup>†</sup>	T: CLX 0,12%	T: CLX 0,12%	10 ml	30 seg	T1: 1x / dia T2: 1x/semana	6 semanas	Logo após e 6 semanas após término bochecho	T1: 6 semanas T2: logo após T1=T2 <sup>xx</sup>	
Eldridge et al, 1998	Estudantes odontologia	11	24-5 média	R / NC	T: CLX 0,12%	T: CLX 0,12%	15 ml	1 min	2x / dia	3 semanas	8 h após término do bochecho	Redução	
Lima et al, 2001	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC***	20	18-25	NC	T: CLX 0,12%	T: CLX 0,12%	10 ml	—	2x/dia	15 dias	Logo após, 15 e 30 dias após término bochecho	logo após o tratamento	
Gropo et al, 2002	Sem uso antib <sup>§</sup> 2 semanas antes, presença todos dentes	10	18-35	R / CC <sup>‡</sup>	T: CLX 0,12% C: água + essência menta + sorbitol	T: CLX 0,12%	10 ml	1 min	1x / dia	1 semana	Durante tratamento (3 <sup>o</sup> e 6 <sup>o</sup> dia) e 1 e 2 semanas após término do bochecho	T: durante o tratamento C: sem #	
Kulkarni & Damle, 2003	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC e mancha branca ativa	15	12-14	C <sup>‡‡</sup>	T: CLX 0,12% C: sol. placebo	T: CLX 0,12%	T: 15 ml C: 10ml	1 min	2x / dia	2 semanas	Logo após término do bochecho	T: redução C: sem #	
Albuquerque et al, 2004	Sem uso antib. 60 dias antes, necessidade pequena cirurgia	60	17-70	NC	T: CLX 0,12%	T: CLX 0,12%	15 ml	30 seg	1	Antes procedimento cirúrgico	Logo após término do bochecho	Redução	
Menendez et al, 2005	Presença EGM na saliva, sem uso antib. 3 meses antes	16	26-55	R / CC	T: CLX 0,12% C: água + corante azul	T: CLX 0,12%	15 ml	1 min	2x / dia	1 semana	Logo após e 2 semanas após término do bochecho	T=C <sup>xx</sup>	
Dahlén, 1984	Ausência lesão cariosa (LC) e inflamação gengival (IG)	18	20-30	R / CC	T: CLX 0,2% C: sol. salina	T: CLX 0,2%	10 ml	1 min	C1 e T1: 2x / dia C2 e T2: 4x / dia	1 semana	30 min, 4h, 24h após término bochecho	T1: sem # T2: 4h C: sem #	
Hoover et al, 1990	Ausência LC e IG	15	20-30	R / CC	T: CLX 0,2% C: sol. salina	T: CLX 0,2%	—	—	2x / dia	1 semana	30 min, 6h e 24h após término bochecho	T: redução C: sem #	
Zanella et al, 2002	Boas condições saúde bucal	20	7-11	R / C	T: CLX 0,2% C: água mentolada	T: CLX 0,2%	5 ml	1 min	1x / dia	4 semanas	24h após 1 <sup>o</sup> bochecho e 1 semana após último bochecho	T: sem # C: sem #	
Clark & Guest, 1994	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC e higiene bucal deficiente	8-10	+ 75	R / NC	T1: CLX 0,025% T2: CLX 0,05% T3: CLX 0,12%	T1: CLX 0,025%	4 ml	—	1x / dia	2 semanas	Logo após término do bochecho	Redução T3 > T1 e T2 <sup>xx</sup>	

**n\***: nº de indivíduos por grupo; **\*\***redução em relação aos valores iniciais; **UFC\*\*\***: unidades formadoras de colônia/ml saliva; **antb<sup>§</sup>**: antibiótico; **R<sup>#</sup>**: randomizado; **NC<sup>†</sup>**: não controlado; **CC<sup>‡</sup>**: estudo cruzado e controlado; **C<sup>‡‡</sup>**: controle; **xx**: análise comparativa entre os grupos.

**Tabela 2 - Relação de estudos que avaliaram o efeito do gel de clorexidina (CLX) nos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM).**

Autor, ano	Critério Inclusão	n*	Faixa Etária (anos)	Tipo Estudo	Intervenção		Método de Aplicação	Frequência	Período de Avaliação	Resultado**; período de redução significativa nos níveis deEGM	
					Teste (T)	Controle (C)				Saliva	Biofilme Dental
Emilison & Formell, 1976	Estudantes odontologia	6	21-28	R <sup>#</sup> / C	T: CLX 0,5% C: placebo	Escovação	2 min/dia 12 meses	Durante e logo após término tratamento	T: redução C: redução	—	—
Wan et al, 2003	Presença EGM	50	10 m	R / C <sup>†</sup>	T: CLX 0,2% C: placebo	Escovação	1x/semana 3 meses	Logo após: 3, 6, 9, 12 e 15 meses pós-tratamento	—	T = C <sup>xx</sup>	—
Twetman & Grindeford, 1999	Presença EGM	37	1½	NC <sup>††</sup>	T: CLX 1%	Escovação	2x/dia 2 semanas	1 e 3 meses pós-tratamento	—	4 semanas	—
Emilison, 1981	EGM≥10 <sup>5</sup> UFC*** e atividade cárie	5	26-33	NC	T: CLX 1%	Moldeira	5 min /dia 14 dias	2,6,10,14,18 semanas pós-tratamento	retorno após 14 semanas	retorno após 14 semanas	—
Clark et al, 1991	+3 superfícies cariadas nos últimos 12 meses	9	+ 75	NC	T: CLX 1%	Moldeira	5 min/dia 10 dias	1x / semana, durante 6 semanas pós-tratamento	retorno após 4 semanas	—	—
Malitz et al, 1981	EGM≥2x10 <sup>5</sup> UFC	24	14-15	NC	T: CLX 1%	Moldeira	1º dia: 4x/5 min 2º dia: 3x/5 min	1, 2, 3 dias; 1,2,3 semanas e 1x/mês durante 6 meses	4 - 24 semanas	—	—
Wallman et al, 1998	EGM>5x10 <sup>5</sup> UFC	9	35-71	R / NC	T: CLX 1%	Moldeira	T1e T2: 3x/5 min, 2 dias T2: + retratamento 1-4 semanas, durante 12 meses	1, 4, 8, 12, 16, 20 e 32 semanas após início do tratamento	T2>T1 até 20 semanas <sup>xx</sup>	T2>T1 até 20 semanas <sup>xx</sup>	—
Rocha et al, 2003	EGM>10 <sup>6</sup> UFC Prótese removível	15	22-69	NC	T: CLX 1%	Moldeira	1º dia: 4x/5 min 2º dia: 3x / 5 min	24 h e 11 semanas pós-tratamento	retorno após 11 semanas	—	—
Emilison et al, 1987	Ausência cavidade ou restauração defetiva	8	22-32	NC	T: CLX 1%	Moldeira	dia 1,2,10,11: 3x5min Dia 3-9: casa (5 min/dia)	2, 4, 6, 8, 10, 12, 26 semanas pós-tratamento	26 semanas	26 semanas	—
Kristofferson & Bratthall, 1982	EGM≥10 <sup>6</sup> UFC	10	—	CBD*	T: CLX 1% C: sem tratamento	Seringa no espaço interproximal	Q1 <sup>##</sup> : 3x3min; Q2:2x3min; Q3: 1x3min; Q4: sem tratamento (em 2 dias)	Logo após, 1 e 6 semanas pós-tratamento	—	1 semana após: T: 49-64% e C: 76% dos sítios colonizados	—
Ostela et al, 1991	Sem uso prévio antibiótico	15	22.1 média	R / C	T: CLX 1% C: placebo	PP**	3 x em 1 semana	1, 2, 7 e 11 semanas pós-tratamento	T: 2 semanas C: sem #	—	—
Emilison et al, 1999	EGM >10 <sup>6</sup> UFC	7	15-16	R / NC	T: CLX 1%	T1 ,moldeira T2:PP	T1: 3x5 min T2: 1 x	3 dias, 2, 4 e 8 semanas pós-tratamento	3 dias (T1 e T2)	3 dias (T1 e T2)	—
Schaeken et al, 1984	Presença de EGM	7	19-27	R / CBD	T: CLX 5% C: placebo	—	superfície livre; margens restaurações e fissuras 1 x 5 min	2 dias, 1 e 3 semanas pós-tratamento	—	Superfície Livre: T = C <sup>xx</sup> Margens e Fissuras: T: 3 semanas C: retorno após 1 semana	—
Schaeken et al, 1986	—	7	20-33	R / C	T: CLX 5% C: placebo	Moldeira	Sessão única 3 x 3 min	1 e 3 semanas pós-tratamento	T: retorno após 1 semana C: sem #	T: retorno após 1 semana C: sem #	—

**n\***: nº de indivíduos por grupo; **\*\***:redução em relação aos valores iniciais; **UFC\*\*\***: unidades formadoras de colônia/ml saliva ; **R<sup>#</sup>**: randomizado; **C<sup>†</sup>**: controlado; **NC<sup>††</sup>**: não controlado; **CBD<sup>\*</sup>**: controlado boca-dividida; **PP<sup>##</sup>**: profilaxia profissional; **Q<sup>##</sup>**: quadrante; **xx**:análise comparativa entre os grupos.



**Tabela 3 – Relação de estudos que avaliaram o efeito do verniz de clorexidina (CLX) a 1% nos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM).**

Autor, ano	Critério Inclusão	n*	Faixa etária (anos)	Tipo Estudo	Intervenção		Local de Aplicação	Período Avaliação	Resultado**:	
					Teste (T) Controle (C)	N° Total			Saliva	período de redução significativa nos níveis de EGM
Pettersson et al, 1991	EGM $\geq 10^5$ UFC***	33	15	R <sup>#</sup> / CBD <sup>†</sup>	T: CLX 1% C: placebo	2	espaço interproximal dentes posteriores	2,8,30 e 90 dias após início do tratamento	3 meses	3 meses após, T e C = redução entretanto T $\neq$ C <sup>xx</sup>
Skold-Larsson et al, 2001	aparelho ortodôntico fixo	25	13-17	R / CBD	T: CLX 1% C: placebo	2	braquetes ortodônticos e esmalte adjacente	3, 7, 30 dias após início tratamento	—	T > C até 3 dias após 2ª aplicação <sup>xx</sup>
Wallman & Birkhed, 2002	EGM $\geq 2,5 \times 10^5$ UFC e n° elevado restaurações	6	24-75	R / C <sup>††</sup>	T: CLX 1% C: placebo	2	todos os dentes	1,4,8,12 semanas após tratamento	T: sem # C: sem #	T: 1 mês C: sem #
Ekenback et al, 2000	3 superfícies radiculares hígidas	16	37-81	R / NC <sup>‡</sup>	T: CLX 1%	2	superfícies radiculares selecionadas	1 semana; 1 e 6 meses após tratamento	—	1 mês
Twetman & Pettersson, 1997b	EGM $\geq 10^5$ UFC	41	11-13	R / NC	T: CLX 1%	2	espaço interproximal dentes posteriores	1 e 3 meses após início tratamento	—	2 semanas
Twetman & Pettersson, 1998	EGM $\geq 10^5$ UFC	31	8-10	R / NC	T: CLX 1%	3	espaço interproximal dentes posteriores	1 e 3 meses após tratamento	1 mês	3 meses
Twetman & Pettersson, 1999	EGM $\geq 10^5$ UFC	107	8-10	NC	T: CLX 1%	3	mesial molares (4 sítios/paciente)	1,3,6,12 meses após início do tratamento	1 mês	3 meses
Atin et al, 2003	EGM $\geq 10^5$ UFC	12	19-31	R / NC	T: CLX 1%	3	todos os dentes	1 e 3 meses após tratamento	3 meses	1 mês
Twetman & Pettersson, 1997a	EGM $\geq 10^5$ UFC	44	11-13	R / NC	T: CLX 1%	T1: 3 T2: 3	espaço interproximal dentes posteriores	1,3,6, meses após início tratamento	T1: 17-20 dias T2: sem #	T1: 3 meses T2: 1 mês após 1ª aplicação
Araujo et al, 2002	2 molares em erupção	16	6-8	CBD	T: CLX 1% C: sem tratamento	3	1 superfície oclusal	Saliva: 6 meses após tratamento Biofilme: 3m após 1ª aplicação e 3m após 2ª aplicação	6 meses após término do tratamento	3 meses após 2ª aplicação redução em T e C entretanto T > C <sup>xx</sup>
Twetman et al, 1995	aparelho ortodôntico fixo	18	11-18	R / CBD	T: CLX 1% C: placebo	4	braquetes ortodônticos e esmalte adjacente.	1 semana, 1,3 e 6 meses após início tratamento	—	T $\neq$ C até 3 semanas após 2 aplicações <sup>xx</sup>

**n\***: n° de indivíduos por grupo; **\*\***: redução em relação aos valores iniciais; **UFC**\*\*\*: unidades formadoras de colônia/ml saliva; **R<sup>#</sup>**: randomizado; **CBD<sup>†</sup>**: controlado, boca-dividida, **C<sup>††</sup>**: controlado; **NC<sup>‡</sup>**: não controlado; **xx**: análise comparativa entre os grupos.

**Tabela 4 –** Relação de estudos que avaliaram o efeito do verniz de clorexidina (CLX) a 40% nos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM).

Autor, ano	Critério Inclusão	n*	Faixa Etária (anos)	Tipo Estudo	Intervenção		Aplicação		Local Aplicação	Período Avaliação	Resultado** : período de redução significativa nos níveis de EGM	
					Teste (T)	Controle (C)	Nº Total	Intervalo			Saliva	Biofilme Dental
Schaeken et al, 1994	1 superfície oclusal com níveis elevados de EGM	8	18-26	NC†	T: CLX 40%		1	—	superfície oclusal	2, 14 dias após término tratamento	—	14 dias
Pienihäkkinen et al, 1995	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC**/ml saliva	20	20-45	R#/NC	T: CLX 40%		1	—	todos os dentes	1 mês e 3 meses após término tratamento (strip mutans)	1 mês (cultivo convencional) e 3 meses (strip mutans)	—
Gerardu et al, 2002	Boas condições de saúde bucal	13	25 média	NC	T: CLX 40%		1	—	todos os dentes	1, 3, 6, 9 e 12 semanas após término tratamento	1 semana	—
Ie & Schaeken, 1993	2 superfícies oclusais com níveis elevados de EGM	10	18-28	R / C††	T: CLX 40% C: placebo		T1:1 T2:2 C: 1	1 semana	superfície oclusal PM e M <sup>§</sup>	1, 2, 4 meses após 1ª aplicação	—	PM M T1: 2 meses 2 meses T2: 4 meses 2 meses C: 1 mês sem #
Schaeken et al, 1991	Presença 2 superfícies radiculares restauradas ou cariadas	16	44,4 média	R / NC	T: CLX 40%		3	3 meses	superfície radicular	3, 6 e 9 meses após início do tratamento	—	3 meses em superfícies cariadas pós-tratamento
Soderling et al, 2000	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC/ml saliva	30	27-30	R / NC	T: CLX 40%		3	6 meses	todos os dentes	6m após 1ª aplicação e 6m após término do tratamento	sem #	—
Attin et al, 2003	EGM ≥ 10 <sup>5</sup> UFC/ml saliva	12	19-31	R / NC	T: CLX 40%		1-2 (2ª aplicação = presença EGM saliva)	1 semana	todos os dentes	1 e 3 meses após término tratamento	3 meses	3 meses

**n\*** = nº de indivíduos por grupo; **\*\***redução em relação aos valores iniciais; **UFC\*\***: unidades formadoras de colônia; **NC†**: não controlado; **R#**: randomizado; **C††**: controlado; **§**PM: pré-molares e M: molares

**Tabela 5 – Relação de estudos que compararam o efeito do gel e verniz de clorexidina (CLX) nos níveis de estreptococos do grupo mutans (EGM).**

Autor, ano	Critério Inclusão	n*	Faixa Etária (anos)	Tipo Estudo	Controle (C)	Gel (G)		Verniz (V)		Local Aplicação	Período Avaliação	Resultado**; período de redução significativa nos níveis de EGM	
						CLX	Frequência Aplicação	CLX	Frequência Aplicação			Saliva	Biofilme Dental
Keltjens et al, 1992	Prótese parcial removível (PPR) há ± 3 anos	8	62 (média)	R <sup>#</sup> / C <sup>†</sup>	gel placebo (GP) verniz placebo (VP)	1%	1x / dia em 7 dias consecutivos	40%	1 aplicação	dentes pilares PPR	1, 2, 4, 8 semanas após tratamento	—	G=V <sup>xx</sup> G1%: 8 semanas V40%: 4 semanas GP e VP: sem ≠
Wallman & Birkhed, 2002	EGM ≥ 2.5x 10 <sup>7</sup> UFC*** e alto número de restaurações	6	24 -75	R / C	verniz placebo (VP)	1%	3x5min/dia, 2 dias consecutivos	1%	2 aplicações intervalo 3-4 dias	todos os dentes	1, 4, 8, 12 semanas pós-tratamento	G=V <sup>xx</sup> G1%: 1 semana V1%: sem ≠ VP: sem ≠	G=V <sup>xx</sup> G1%: 12 semanas V1%: 4 semanas VP: sem ≠
Twetman & Petersson, 1998	EGM ≥ 10 <sup>7</sup> UFC	31	8-10	R / NC <sup>††</sup>	—	1%	3 aplicações período de 10 dias	1%	3 aplicações período de 10 dias	espaço interproximal dentes posteriores	4 e 12 semanas após tratamento	G=V <sup>xx</sup> G1%: 4 semanas V1%: 4 semanas	G=V <sup>xx</sup> G1%: 12 semanas V1%: 12 semanas
Heintze & Twetman, 2002	EGM ≥ 10 <sup>7</sup> UFC	32	18-59	R / NC	—	1%	G1: profilaxia profissional (1x) G2: escovação 1x/dia, 2 semanas	V3: 1% V3: 2 aplicações em 1 semana V4: 40%	V3: 2 aplicações em 1 semana V4: 1 aplicação vestibular e lingual	G1 e G2: todos os dentes V3 e V4: superf. oclusal, espaço interproximal por vestibular e lingual	1 semana e 3 meses após tratamento	—	Redução V > G <sup>xx</sup>

**n\***: n° indivíduos por grupo; **\*\***:redução em relação aos valores iniciais; **UFC\*\*\***: unidades formadoras de colônia/ml saliva; **R<sup>#</sup>**: randomizado; **C<sup>†</sup>**: controlado; **NC<sup>††</sup>**: não controlado; **xx**: análise comparativa entre os grupos

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, A. M.; *et al.* Effect of Cervitec on mutans streptococci in plaque and on caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. *Caries Res.*, Basel, v.36, n.5, p.373-376, Sep./Oct. 2002.
- ATTIN, R.; *et al.* Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing Mutans streptococci and lactobacilli counts. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.48, n.7, p.503-509, Jul. 2003.
- BALANYK, T. E.; SANDHAM, H. J. Development of sustained-release antimicrobial dental varnishes effective against *Streptococcus mutans* in vitro. *J. Dent. Res.*, Washington, v.64, n.12, p.1356-1360, Dec. 1985.
- CLARK, D. C.; GUEST, J. L. The effectiveness of three different strengths of chlorhexidine mouthrinse. *J. Can. Dent. Assoc.*, Toronto, v.60, n.8, p.711-714, Aug. 1994.
- CLARK, D. C., MORGAN, J.; MACENTEE, M. I. Effects of a 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. *Spec. Care Dentist.*, Chicago, v.11, n.3, p.101-103, May/Jun. 1991.
- DAHLEN, G. Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.92, n.1, p.38-42, Feb. 1984.
- DE ALBUQUERQUE, R. F., JR.; *et al.* Reduction of salivary *S. aureus* and mutans group streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. *Quintessence Int.*, Berlin, v.35, n.8, p.635-640, Sep. 2004.
- DE SOET, J. J., NYVAD, B.; KILIAN, M. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res.*, Basel, v.34, n.6, p.486-490, Nov./Dec. 2000.
- ELDRIDGE, K. R.; *et al.* Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. *J. Prosthet. Dent.*, St. Louis, v.80, n.6, p.685-690, Dec. 1998.
- EMILSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.85, n.4, p.255-265, May. 1977.
- EMILSON, C. G. Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.89, n.3, p.239-246, Jun. 1981.
- EMILSON, C. G. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.682-691, Mar. 1994.
- EMILSON, C. G.; FORNELL, J. Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.84, n.5, p.308-319, Sep. 1976.
- EMILSON, C. G., GISSELSSON, H.; BIRKHED, D. Recolonisation pattern of mutans streptococci after suppression by three different modes of chlorhexidine gel application. *Eur. J. Oral Sci.*, Copenhagen, v.107, n.3, p.170-175, Jun. 1999.
- EMILSON, C. G., LINDQUIST, B.; WENNERHOLM, K. Recolonization of human tooth surfaces by *Streptococcus mutans* after suppression by chlorhexidine treatment. *J. Dent. Res.*, Washington, v.66, n.9, p.1503-1508, Sep. 1987.

- GERARDU, V. A.; *et al.* The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.37, n.5, p.369-373, Sep./Oct. 2003.
- GROPPO, F. C.; *et al.* Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int. Dent. J.*, Guilford, v.52, n.6, p.433-437, Dec. 2002.
- HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.44, n.2, p.331-384, Jun. 1980.
- HEINTZE, S. D.; TWETMAN, S. Interdental mutans streptococci suppression in vivo: a comparison of different chlorhexidine regimens in relation to restorative material. *Am. J. Dent.*, San Antonio, v.15, n.2, p.103-108, Apr. 2002.
- HILDEBRANDT, G. H. Effect of repeated treatment with sustained-release chlorhexidine mouth guards on salivary levels of mutans streptococci. *Caries Res.*, Basel, v.30, n.6, p.445-453, Nov./Dec. 1996.
- HILDEBRANDT, G. H.; *et al.* Effect of slow-release chlorhexidine mouthguards on the levels of selected salivary bacteria. *Caries Res.*, Basel, v.26, n.4, p.268-274, Jul./Aug. 1992.
- HOOVER, J. N.; TO, T. Efficacy of chlorhexidine and sanguinarine mouthrinses on selected salivary microflora. *J. Can. Dent. Assoc.*, Toronto, v.56, n.4, p.325-327, Apr. 1990.
- HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.16, p.655-662, Oct. 1964.
- HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.18, n.9, p.569-578, Sep. 1966.
- IE, Y. L.; SCHAEKEN, M. J. Effect of single and repeated application of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in plaque from fissures of premolar and molar teeth. *Caries Res.*, Basel, v.27, n.4, p.303-306, Jul./Aug. 1993.
- KELTJENS, H. M.; *et al.* Effects of chlorhexidine-containing gel and varnish on abutment teeth in patients with overdentures. *J. Dent. Res.*, Washington, v.71, n.9, p.1582-1586, Sep. 1992.
- KOO, H.; *et al.* Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol. Immunol.*, Philadelphia, v.17, n.6, p.337-343, Dec. 2003.
- KRISTOFFERSSON, K.; BRATTHALL, D. Transient reduction of *Streptococcus mutans* interdentally by chlorhexidine gel. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.90, n.6, p.417-422, Dec. 1982.
- KULKARNI, V. V.; DAMLE, S. G. Comparative evaluation of efficacy of sodium fluoride, chlorhexidine and triclosan mouth rinses in reducing the mutans streptococci count in saliva : an in vivo study. *J. Indian. Soc. Pedod. Prev. Dent.*, Chandigarh, v.21, n.3, p.98-104, Sep. 2003.
- LIMA, K. C.; *et al.* Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of NaF, chlorhexidine and a combined chlorhexidine with NaF mouthrinses. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 32, p. 158-161, 2001.
- LINDQUIST, B.; *et al.* Effect of different carriers preventive measures in children highly infected with mutans streptococci. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.97, n.4, p.330-337, Aug. 1989.

- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
- LOESCHE, W. J.; *et al.* Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect. Immun.*, Washington, v.11, n.6, p.1252-1260, Jun. 1975.
- MALTZ-TURKIENICZ, M., KRASSE, B.; EMILSON, C. G. Effects of chlorhexidine and iodine on in vitro plaques of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Scand. J. Dent. Res.*, Washington, v.88, n.1, p.28-33, Feb. 1980.
- MALTZ, M., ZICKERT, I.; KRASSE, B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.89, n.6, p.445-449, Dec. 1981.
- MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v.8, n.2, p.263-271, Jul. 1994.
- MATTOS-GRANER, R. O.; *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res.*, Washington, v.79, n.6, p.1371-1377, Jun. 2000.
- MENENDEZ, A.; *et al.* Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, Philadelphia, v.20, n.1, p.31-34, Feb. 2005.
- OSTELA, I., KARHUVAARA, L.; TENOVUO, J. Comparative antibacterial effects of chlorhexidine and stannous fluoride-amine fluoride containing dental gels against salivary *mutans streptococci*. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.99, n.5, p.378-383, Oct. 1991.
- PERSSON, R. E.; *et al.* Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.72, n.2, p.184-191, Aug. 1991.
- PETERSSON, L. G.; *et al.* *Mutans streptococci* in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren. *Oral Microbiol. Immunol.*, Philadelphia, v.6, n.5, p.284-287, Oct. 1991.
- PIENIHAKKINEN, K.; *et al.* Comparison of the efficacy of 40% chlorhexidine varnish and 1% chlorhexidine-fluoride gel in decreasing the level of salivary *mutans streptococci*. *Caries Res.*, Basel, v.29, n.1, p.62-67, Jan./Feb.1995.
- ROCHA, E. P.; *et al.* Longitudinal study of the influence of removable partial denture and chemical control on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva. *J. Oral Rehabil.*, Oxford, v.30, n.2, p.131-138, Feb. 2003.
- SANDHAM, H. J., NADEAU, L.; PHILLIPS, H. I. The effect of chlorhexidine varnish treatment on salivary *mutans streptococcal* levels in child orthodontic patients. *J. Dent. Res.*, Washington, v.71, n.1, p.32-35, Jan. 1992.
- SCHAEKEN, M. J.; DE HAAN, P. Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. *J. Dent. Res.*, Washington, v.68, n.2, p.119-123, Feb. 1989.
- SCHAEKEN, M. J.; *et al.* Effect of chlorhexidine and iodine on the composition of the human dental plaque flora. *Caries Res.*, Basel, v.18, n.5, p.401-407, Sep./Oct. 1984.
- SCHAEKEN, M. J.; *et al.* Effects of highly concentrated stannous fluoride and chlorhexidine regimes on human dental plaque flora. *J. Dent. Res.*, Washington, v.65, n.1, p.57-61, Jan. 1986.

SCHAEKEN, M. J., KELTJENS, H. M.; VAN DER HOEVEN, J. S. Effects of fluoride and chlorhexidine on the microflora of dental root surfaces and progression of root-surface caries. *J. Dent. Res.*, Washington, v.70, n.2, p.150-153, Feb. 1991.

SCHAEKEN, M. J.; *et al.* Influence of contact time and concentration of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in interproximal dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.25, n.4, p.292-295, Jul./Aug. 1991.

SCHAEKEN, M. J., VAN DER HOEVEN, J. S.; HENDRIKS, J. C. Effects of varnishes containing chlorhexidine on the human dental plaque flora. *J. Dent. Res.*, Washington, v.68, n.12, p.1786-1789, Dec. 1989.

SCHAEKEN, M. J., VAN DER HOEVEN, J. S.; VAN DEN KIEBOOM, C. W. Effect of chlorhexidine varnish on streptococci in dental plaque from occlusal fissures. *Caries Res.*, Basel, v.28, n.4, p.262-266, Jul./Aug. 1994.

SCHEIE, A. A.; KJEILEN, J. C. Effects of chlorhexidine, NaF and SnF<sub>2</sub> on glucan formation by salivary and culture supernatant GTF adsorbed to hydroxyapatite. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.95, n.6, p.532-535, Dec. 1987.

SKOLD-LARSSON, K., BORGSTROM, M. K.; TWETMAN, S. Effect of an antibacterial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. *Clin. Oral Investig.*, Berlin, v.5, n.2, p.118-121, Jun. 2001.

SODERLING, E.; *et al.* Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. *J. Dent. Res.*, Washington, v.79, n.3, p.882-887, Mar. 2000.

STEINBERG, D.; *et al.* The effect of sustained-release varnish of chlorhexidine in dental plastic shells on salivary *Streptococcus mutans*. *Clin. Prev. Dent.*, Philadelphia, v.13, n.2, p.9-12, Mar-Apr. 1991.

TWETMAN, S.; GRINDEFJORD, M. Mutans streptococci suppression by chlorhexidine gel in toddlers. *Am. J. Dent.*, San Antonio, v.12, n.2, p.89-91, Apr. 1999.

TWETMAN, S., HALLGREN, A.; PETERSSON, L. G. Effect of an antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries Res.*, Basel, v.29, n.3, p.188-191, May/June. 1995.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Effect of different chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in interdental plaque and saliva. *Caries Res.*, Basel, v.31, n.3, p.189-193, May/June. 1997a.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of mutans streptococci. *Caries Res.*, Basel, v.31, n.5, p.361-365, Sep./Oct. 1997b.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.32, n.2, p.113-118, Mar./Apr. 1998.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L. G. Interdental caries incidence and progression in relation to mutans streptococci suppression after chlorhexidine-thymol varnish treatments in schoolchildren. *Acta Odontol. Scand.*, Stockholm, v.57, n.3, p.144-148, Jun. 1999.

VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.

VAN RIJKOM, H. M., TRUIN, G. J.; VAN 'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J. Dent. Res.*, Washington, v.75, n.2, p.790-795, Feb. 1996.

WALLMAN, C.; BIRKHED, D. Effect of chlorhexidine varnish and gel on mutans streptococci in margins of restorations in adults. *Caries Res.*, Basel, v.36, n.5, p.360-365, Sep-Oct. 2002.

WALLMAN, C.; *et al.* The effect of monitored chlorhexidine gel treatment on mutans streptococci in margins of restorations. *J. Dent.*, Bristol, v.26, n.1, p.25-30, Jan. 1998.

WAN, A. K.; *et al.* The effects of chlorhexidine gel on *Streptococcus mutans* infection in 10-month-old infants: a longitudinal, placebo-controlled, double-blind trial. *Pediatr. Dent.*, Chicago v.25, n.3, p.215-222, May-Jun. 2003.

ZANELA, N. L., BIJELLA, M. F.; ROSA, O. P. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui. Odontol. Bras.*, São Paulo, v.16, n.2, p.101-106, Apr.-Jun. 2002.

ZICKERT, I., EMILSON, C. G.; KRASSE, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.27, n.10, p.861-868, Oct. 1982.



## **ARTIGO CIENTÍFICO 2**

---

### **EFFECT OF DIFFERENT 1% CHLORHEXIDINE VARNISH REGIMENS ON LEVELS OF MUTANS STREPTOCOCCI**

Ribeiro LGM, Hashizume LN, Maltz M

Department of Preventive and Social Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

**Short Title:** Different 1% CHX varnish regimens

**Key Words:** Chlorhexidine, varnish, mutans streptococci, saliva, dental biofilm

#### **Correspondence**

**Prof<sup>a</sup>. Marisa Maltz**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bom Fim

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

CEP: 90035-003

Tel. +55 14 51 33165247

Fax. +55 14 51 33165002

e-mail: mmaltz@ufrgs.br

## Introduction

The importance of mutans streptococci (MS) in the etiology of dental caries has been clearly established (21, 35). By converting diet sugars to lactic acid, MS have the ability to lower the dental biofilm pH, which can promote tooth demineralization. These microorganisms also have the ability to adhere to the tooth surface and to produce extracellular and intracellular polysaccharides and an aciduric profile, confirming their cariogenic potential (12).

One strategy for controlling dental caries in patients with high levels of cariogenic microorganisms is their suppression by chemotherapeutic agents (19, 36, 41). Chlorhexidine (CHX) is an antimicrobial agent used extensively in dentistry. Among dental biofilm microorganisms, MS are one of the most sensitive to CHX (8, 18, 22).

There are several vehicles used for CHX delivery, such as dentifrices (33), solutions (15, 40), gels (23, 38), and varnishes (16, 31). The latter were specially designed as a slow-release CHX agent, with the purpose of maintaining therapeutic concentrations over a period of several days (4). The varnishes commercially available contain 1% (Cervitec<sup>®</sup>), 10% (Chlorzoin<sup>®</sup>), 20% (BioC<sup>®</sup>), or 35% (EC40<sup>®</sup>) of CHX. Among these, the 1% CHX varnish has been investigated the most.

Results on the reduction period of MS in the saliva or dental biofilm are controversial. Some studies demonstrated a reduction in the levels of MS in the dental biofilm 1 and 3 months after CHX varnish treatment (2, 14, 25). However, the same group of researchers reported different MS reduction periods in distinct experiments, i.e., the treatment was effective after 3 days, 2 weeks or 3 weeks (29, 30, 32). In addition, there is no agreement with respect to the total number of 1% CHX varnish applications (ranging from 1 to 3) and the interval between them (ranging from 1-7 days or monthly) (1, 5, 7, 17, 34).

The aim of the present investigation was to use a randomized controlled study to evaluate the effect of different regimens of topical application of a varnish containing 1% CHX on the levels of MS in the saliva and dental biofilm.

## **Material and methods**

### **Subjects**

One hundred and fifty-eight schoolchildren (Porto Alegre/RS, Brazil), 11-16 years old (mean  $\pm$  SD, 12.9  $\pm$  1.39 years), were screened for MS salivary levels. Those patients with MS  $\geq 10^5$  CFU/ml saliva (colony forming units per milliliter of saliva) in 2 saliva samples were invited to participate in the study (n = 60). Sample size was calculated for ANOVA (4 groups) using the mean of MS counts ( $\log_{10}$  CFU + 1/ml saliva) on the basis of results obtained from Wallman & Birkhed (37). With standard deviation set at 0.7, probability at 0.05, power at 0.90 and treatment effect at 1.0, a total of 12 subjects per group were required. Considering a probability of dropout, 15 subjects per group were allocated. Cavities needing restoration were restored prior to the treatment and a third collection of saliva sample was taken to confirm salivary levels of MS. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Rio Grande do Sul. All participants' parents signed an informed consent.

### **Study design**

Sixty subjects were stratified according to the MS levels and randomly allocated in four groups according to varnish treatment. Five of the children left school. Therefore, the final sample comprised 55 subjects. Group A (n = 14): one application of 1% CHX varnish (Cervitec<sup>®</sup>, Vivacare, Schaan, Liechtenstein); group B (n = 14): varnish applied once daily on 3 consecutive days; group C (n = 15): varnish applied 3 times with an interval of 4 days

between each application; and group D (n = 12): placebo varnish (without the 2 active ingredients, CHX and thymol) applied once daily on 3 consecutive days. Saliva and dental biofilm samples were collected at baseline and 1, 4, and 8 weeks after the final varnish application.

### **Antibacterial activity of CHX varnish**

The antibacterial activity of 1% CHX varnish was evaluated *in vitro* using the agar diffusion method (10). Cultures of *Streptococcus mutans* UA159 were inoculated in 7 ml brain-heart infusion broth (Merck, USA) and incubated at 37°C for 24 h. Microbial cells were re-suspended in sterilized phosphate buffer saline (PBS, 0.05 M, pH 7.3) and the suspension was adjusted spectrophotometrically to yield a final concentration of about  $3 \times 10^8$  cells/ml. Plates with mitis salivarius agar (Difco, USA) supplemented with 2 IU of bacitracin and 15% sucrose (MSB) (11) were inoculated with 0.1 ml of the microbial suspensions that were spread on the medium using sterile glass beads. Sterilized paper disks (9 mm in diameter) were immersed in the experimental substances (1% CHX varnish, 1% CHX solution, and placebo varnish) for 1 min and placed over the MSB surface. The plates were maintained at room temperature for 1 h, and then incubated microaerophilically at 37°C for 48 h. Three replicates were made and the zones of microbial growth inhibition were measured, in mm, using a digital calliper rule ( $\pm 0.01$  mm).

### **Saliva and dental biofilm sampling**

Subjects were asked to refrain from oral hygiene of the posterior teeth 48 h before the sampling. Dental biofilm samples were collected with a sterile curette along the supragingival margins of the tooth surfaces. Stimulated saliva samples were collected for 5 min by asking the subjects to chew an unflavored, sugar-free gum. All samples were kept at 4°C and

cultivated within 3 h.

### **Varnish application**

Prior to varnish application, the teeth were professionally cleaned and the interdental areas were flossed. Before varnish application, each quadrant was isolated with cotton rolls and dried. The varnish was then applied on all teeth surfaces using a small brush supplied by the manufacturer. The patients were instructed to avoid eating for 3 h and brushing their teeth for 24 h following the manufacturer's instructions.

### **Bacteriological procedures**

The saliva samples were vortexed for 10 s (Phoenix AP56, Brazil) and serially diluted in sterilized PBS. Aliquots of 25  $\mu$ l from each dilution were placed in duplicate on MSB agar for MS quantification (39). The dental biofilm samples were weighed ( $\pm$  0.01 mg, Sartorius BP 210D, Germany) and transferred to tubes containing sterilized PBS (ml PBS / mg plaque wet weight), dispersed by sonication (10 s, 40 W, Vibra Cell Tm), homogenized for 10 s (Phoenix AP56, Brazil), and serially diluted in the PBS. Aliquots of 25  $\mu$ l from the different dilutions were placed in duplicate on MSB agar for MS quantification and on brain-heart infusion agar (Difco, USA), supplemented with 5% sheep blood and 1% K-hemin vitamin (BHI) to determine the total bacterial viable counts. The MSB plates were incubated microaerophilically at 37°C for 48 h and BHI plates were incubated in 95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 7 days. MS were identified on the basis of colonial morphology and confirmed with biochemical tests (28). MS counts were expressed as colony forming units per milliliter of saliva (CFU/ml saliva) and colony forming units per milligram of dental biofilm (CFU/mg dental biofilm). All counts were blindly performed by the same researcher (LGMR).

## Statistical analysis

The zones of microbial growth inhibition were evaluated by *t*-test. Prior to statistical analysis, the bacterial counts were transformed to  $\log_{10}(\text{CFU} + 1)$ . The results were evaluated using ANOVA for repeated measures and a Tukey test (SAS, 9.1). The level of significance was set at 5%.

## Results

### Antibacterial activity of CHX varnish

The antibacterial activity of 1% CHX varnish was confirmed *in vitro*. The mean and standard deviation of the zones of microbial growth inhibition was  $3.20 \pm 0.40$  mm for the 1% CHX varnish and  $3.18 \pm 0.20$  mm for the 1% CHX solution. There was no difference between these substances ( $p = 0.45$ ). The placebo varnish showed no antibacterial activity.

### Saliva

At baseline, there was no statistically significant difference between the groups as far as salivary levels of MS. No changes could be observed in the placebo varnish group at any point during the experiment. After 1 week, a slight reduction was observed in groups A, B, and C ( $-0.70$ ,  $-0.90$ , and  $-0.41 \log_{10}$  CFU/ml saliva; respectively), however, only groups A and B showed a significant difference in relation to baseline ( $p < 0.05$ ). After 4 weeks, the salivary levels of MS returned to baseline values. No difference was observed in the salivary levels of MS between the experimental groups (A, B, C) during the different experimental periods (Table 1). After 1 week, 43%, 36%, and 67% of the subjects (groups A, B, and C, respectively) showed that the salivary levels of MS were unaffected or exhibited increased values (Fig. 1a).

## **Dental biofilm**

At baseline, there was no statistically significant difference between the groups as far as total viable bacterial counts (Table 2) and MS levels (Table 3) in the dental biofilm. No changes in total viable bacterial counts and MS levels could be observed in the placebo varnish group at any point during the experiment. In the first week after treatment, the experimental groups showed a slight increase in the total viable bacterial counts in the dental biofilm, statistically significant only for groups B and C ( $p < 0.05$ ). However, all experimental groups displayed significantly higher counts of total viable bacteria compared to the placebo group. After 1 week, only group A showed a statistically significant decrease in the levels of MS in the dental biofilm ( $p < 0.05$ ). Considerable individual variation in the treatment outcome following CHX varnish application was observed. After 1 week, 64%, 79%, and 93% of the subjects (groups A, B, and C, respectively) exhibited levels of MS in the dental biofilm similar or higher than those observed in baseline (Fig. 1b).

## **Discussion**

The present study was performed to evaluate the effect of different regimens of a varnish containing 1% CHX on the levels of MS in the saliva and dental biofilm. Three regimens were tested: (i) single application; (ii) once daily application, on 3 consecutive days; (iii) 3 applications with an interval of 4 days between each. The MS suppression was slight and short-lasting. No difference could be observed between the different treatments.

The 1% CHX varnish has been applied in intensive modes with 2-3 applications within a 2-week period (2, 7, 14, 32-34) or once a month (3, 5, 13, 17). However, only one study was specifically designed to compare its effects on the levels of MS (31). Intensive short-term CHX gel application (3-4 daily applications on 2 consecutive days) (23, 27) showed MS reduction similar to less intensive treatment for a prolonged period of time (10-14

days) (6, 9). Frequent CHX administration has been justified by the speculation that a repeated consecutive treatment strategy could increase the suppressive effect on MS levels by inhibiting re-growth. As a consequence, it would favor tooth surface colonization by other microorganisms, promoting modifications in the dental biofilm composition. With the aim of testing this hypothesis, an intensive 3-consecutive-day regimen of the 1% CHX varnish application was included in the present study. However no additional effect of this mode of treatment was observed.

When analyzing different CHX varnish treatment regimens, two important aspects should be considered, i.e., the level and the period of time for which the MS are maintained reduced. The present study, as well as the great majority of the investigations, showed a statistically significant but slight reduction of MS after 1% CHX varnish application. Only one study found no detectable levels of MS in the dental biofilm (1). In the present investigation, MS reduction after intensive treatment lasted 1 week. A short-term reduction of 2 weeks (32) and 3 weeks (30) has also been observed. However, these treatments display controversial results, ranging from 3 days to 3 months (2, 14, 25, 29). This investigation could not differentiate between a single application and the two intensive treatments. This result was unexpected. Conflicting results were also observed using a 1% CHX varnish application. Twetman and Petersson (1997a) observed a significant reduction in MS levels in the dental biofilm after 1 application. Subsequent monthly applications had no effect.

Different methods can be used for MS quantification: the simplified method and the standard method. The simplified method (Dentocult SM<sup>®</sup> Strip Mutans) consists of a plastic strip treated to simulate the tooth surface in a way to facilitate MS adhesion. After a period of incubation, different MS levels are grouped into categories according to a chart model. In most studies to evaluate the effect of 1% CHX varnish on MS levels, the simplified method has been employed. The standard method is a more accurate and laborious one for MS



quantification and consists of cultivating appropriate dilutions of the samples on an agar medium. Results from a great number of 1% CHX varnish studies using the simplified method have demonstrated a significant MS suppression for a period of 3 months (14, 25, 31, 33, 34). Most CHX varnish studies employing the standard method have demonstrated only a short-term suppression of MS levels, with reduction periods ranging from 3 days to 1 month (7, 29, 30, 37). Some studies have used both methods for quantification of MS and have demonstrated that the simplified method yields a longer inhibitory effect than methods based on cultivation on agar plates (24, 26). It was also observed that in some samples from the subjects treated with chlorhexidine, MS did not grow on the strip, although these microorganisms were found in large numbers on the MSB agar plates (38). These results suggest the presence of a measurement bias in the simplified method and might explain the long-term effect that has been found by others. In the present study, a standard cultivation method was also used, yielding a short-term effect.

The salivary levels of MS are generally thought to reflect the number and level of colonized tooth surfaces in the oral cavity (20). Thus, as the sampling and processing procedures for saliva are less complicated than those for dental biofilm, saliva samples have been used to monitor treatment effects on MS levels. In the present study, it was found that the reduction in salivary levels of MS were not mirrored in the dental biofilm in groups B (once daily CHX varnish applications on 3 consecutive days) and C (3 CHX varnish applications, at 4-day intervals). The slight reduction observed during the experiment could explain these apparently conflicting results. Attin et al. (2) have also demonstrated a 4-week significant decrease in MS counts in the dental biofilm and a 12-week decrease in salivary levels.

Considerable individual variation in the treatment outcome following varnish application was observed. Interestingly, as many as 64%–93% of the subjects were non-

responders to the given treatments. Other studies have demonstrated that 24%-53% of the interdental sites were unaffected or exhibited increased levels of MS after varnish treatments (14, 32). This finding suggests that the antibacterial effects of CHX varnish should be evaluated shortly after treatment.

The present study demonstrated that 1% CHX varnish caused a slight, short-term reduction in MS levels. Repeated applications of 1% CHX varnish do not increase its effects. The great variation observed among the subjects after CHX varnish application suggests that the treatment should always be individually monitored.

**Table 1** - Mean  $\pm$  standard deviation of MS in saliva at baseline and 1, 4 and 8 weeks after different 1% CHX varnish regimens and placebo varnish application ( $\log_{10}$  CFU + 1/ml saliva).

Group	Baseline	1 wk	4 wk	8 wk
A	5.63 $\pm$ 0.31 <sup>Aa</sup>	4.94 $\pm$ 0.70 <sup>Bab</sup>	5.45 $\pm$ 0.60 <sup>ABa</sup>	5.79 $\pm$ 0.59 <sup>Aa</sup>
B	5.64 $\pm$ 0.36 <sup>Aa</sup>	4.74 $\pm$ 0.80 <sup>Bb</sup>	5.38 $\pm$ 0.77 <sup>Aa</sup>	5.40 $\pm$ 0.58 <sup>Aa</sup>
C	5.69 $\pm$ 0.44 <sup>Aa</sup>	5.28 $\pm$ 0.54 <sup>Aab</sup>	5.42 $\pm$ 0.58 <sup>Aa</sup>	5.46 $\pm$ 0.75 <sup>Aa</sup>
D	5.61 $\pm$ 0.26 <sup>Aa</sup>	5.65 $\pm$ 0.45 <sup>Aa</sup>	5.68 $\pm$ 0.50 <sup>Aa</sup>	5.93 $\pm$ 0.48 <sup>Aa</sup>

Group A: 1 varnish application; group B: once daily, 3 consecutives days; group C: 3 times, at 4-day intervals; group D: placebo varnish. Means  $\pm$  standard deviation followed by different capital letters (line) and small letters (column) differ significantly, ANOVA for repeated measures and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** - Mean  $\pm$  standard deviation of total viable bacterial counts in dental biofilm at baseline and 1, 4 and 8 weeks after different 1% CHX varnish regimens and placebo varnish application ( $\log_{10}$  CFU + 1/mg dental biofilm).

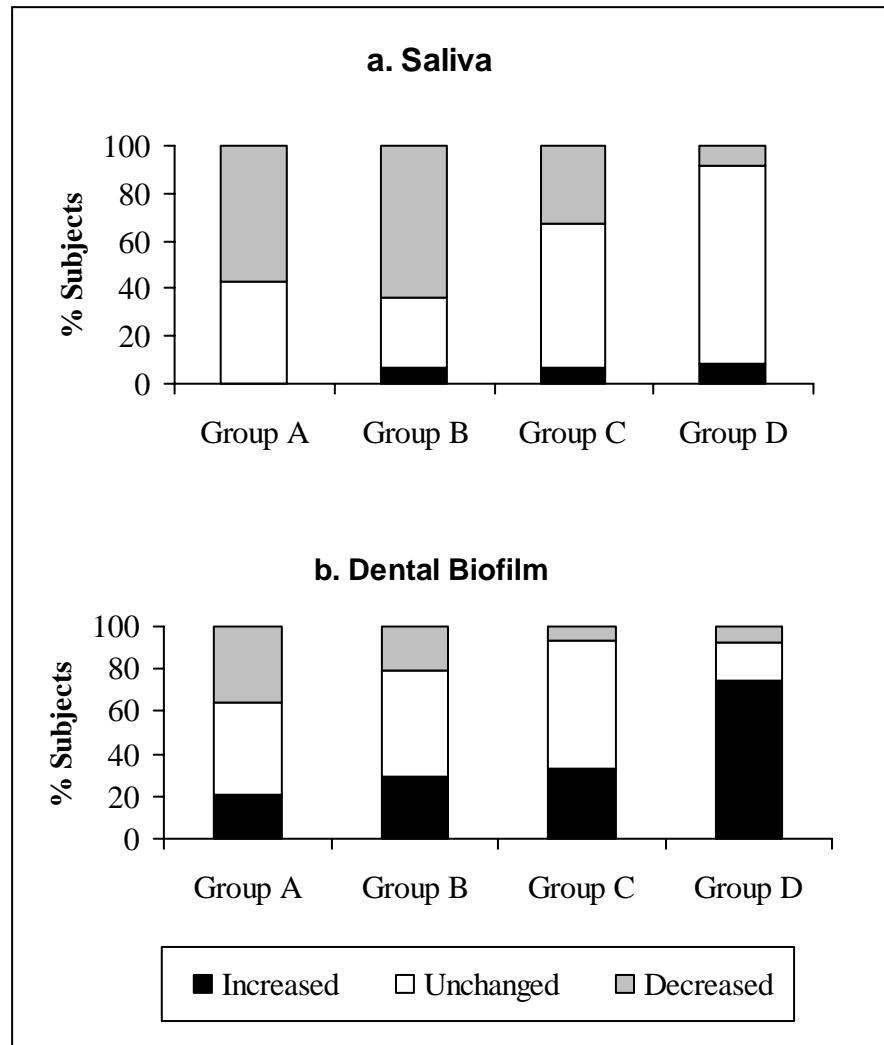
Group	Baseline	1 wk	4 wk	8 wk
<b>A</b>	7.85 $\pm$ 0.19 <sup>Aa</sup>	8.04 $\pm$ 0.20 <sup>Aa</sup>	7.93 $\pm$ 0.28 <sup>Aa</sup>	7.75 $\pm$ 0.15 <sup>Aa</sup>
<b>B</b>	7.69 $\pm$ 0.30 <sup>ACa</sup>	8.17 $\pm$ 0.33 <sup>Ba</sup>	7.95 $\pm$ 0.25 <sup>ABa</sup>	7.62 $\pm$ 0.16 <sup>Ca</sup>
<b>C</b>	7.69 $\pm$ 0.25 <sup>Aa</sup>	8.22 $\pm$ 0.29 <sup>Ba</sup>	7.86 $\pm$ 0.24 <sup>Aa</sup>	7.75 $\pm$ 0.13 <sup>Aa</sup>
<b>D</b>	7.68 $\pm$ 0.27 <sup>Aa</sup>	7.68 $\pm$ 0.20 <sup>Ab</sup>	7.78 $\pm$ 0.13 <sup>Aa</sup>	7.67 $\pm$ 0.15 <sup>Aa</sup>

Group A: 1 varnish application; group B: once daily, 3 consecutives days; group C: 3 times, at 4-day intervals; group D: placebo varnish. Means followed by different capital letters (line) and small letters (column) differ significantly, ANOVA for repeated measures and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** - Mean  $\pm$  standard deviation of MS in dental biofilm at baseline and 1, 4 and 8 weeks after different 1% CHX varnish regimens and placebo varnish application ( $\log_{10}$  CFU + 1/mg dental biofilm).

Group	Baseline	1 wk	4 wk	8 wk
<b>A</b>	5.05 $\pm$ 0.76 <sup>Aa</sup>	4.03 $\pm$ 1.84 <sup>Bb</sup>	4.65 $\pm$ 0.85 <sup>ABa</sup>	5.16 $\pm$ 0.78 <sup>Aa</sup>
<b>B</b>	5.02 $\pm$ 0.82 <sup>Aa</sup>	5.03 $\pm$ 0.64 <sup>Aab</sup>	4.81 $\pm$ 0.94 <sup>Aa</sup>	5.22 $\pm$ 0.59 <sup>Aa</sup>
<b>C</b>	4.87 $\pm$ 1.03 <sup>Aa</sup>	4.93 $\pm$ 0.69 <sup>Aab</sup>	4.78 $\pm$ 0.55 <sup>Aa</sup>	5.25 $\pm$ 0.67 <sup>Aa</sup>
<b>D</b>	4.60 $\pm$ 0.71 <sup>Aa</sup>	5.31 $\pm$ 0.60 <sup>Aa</sup>	4.75 $\pm$ 0.66 <sup>Aa</sup>	5.31 $\pm$ 0.73 <sup>Aa</sup>

Group A: 1 varnish application; group B: once daily, 3 consecutives days; group C: 3 times, at 4-day intervals; group D: placebo varnish. Means followed by different capital letters (line) and small letters (column) differ significantly, ANOVA for repeated measures and Tukey test ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1-** Percentage of subjects with alterations on MS levels in saliva (a) and dental biofilm (b) after 1 week in relation to baseline in groups treated with different 1% CHX varnish regimens and placebo varnish. Group A: 1 varnish application; group B: once daily, 3 consecutives days; group C: 3 times, at 4-day intervals; group D: placebo varnish. Increased:  $> \log 0.5$ ; unchanged:  $\pm \log 0.5$ ; decreased:  $< \log 0.5$ .

**Acknowledgements**

The authors thank the schoolchildren and their parents for their valuable participation. We are grateful to staffs of Rio Branco School and Pão dos Pobres Foundation for their collaboration. Thanks for Ivoclar-Vivadent (Schaan, Lichtenstein) for the supply of Cervitec and placebo varnish. This study was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil). The manuscript was based on a thesis submitted by the first author to Faculty of Dentistry, UFRGS (Porto Alegre, RS / Brazil), as a partial fulfillment of the requirements of the Master Program in Dentistry (Cariology).

## References

1. Araujo AM, Naspitz GM, Chelotti A, Cai S. Effect of Cervitec on mutans streptococci in plaque and on caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. *Caries Res* 2002; **36**: 373-376.
2. Attin R, Tuna A, Attin T, Brunner E, Noack MJ. Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing Mutans streptococci and lactobacilli counts. *Arch Oral Biol* 2003; **48**: 503-509.
3. Baca P, Munoz MJ, Bravo M, Junco P, Baca AP. Effectiveness of chlorhexidine-thymol varnish for caries reduction in permanent first molars of 6-7-year-old children: 24-month clinical trial. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; **30**: 363-368.
4. Balanyk TE, Sandham HJ. Development of sustained-release antimicrobial dental varnishes effective against *Streptococcus mutans* in vitro. *J Dent Res* 1985; **64**: 1356-1360.
5. Bratthall D, Serinirach R, Rapisuwon S, Kuratana M, Luangjarmekorn V, Luksila K, Chaipanich P. A study into the prevention of fissure caries using an antimicrobial varnish. *Int Dent J* 1995; **45**: 245-254.
6. Clark DC, Morgan J, MacEntee MI. Effects of a 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. *Spec Care Dentist* 1991; **11**: 101-103.
7. Ekenback SB, Linder LE, Lonnie H. Effect of four dental varnishes on the colonization of cariogenic bacteria on exposed sound root surfaces. *Caries Res* 2000; **34**: 70-74.
8. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977; **85**: 255-265.
9. Emilson CG. Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand J Dent Res* 1981; **89**: 239-246.
10. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003; **14**: 58-62.
11. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; **18**: 1357-1364.
12. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; **44**: 331-384.
13. Haukali G, Poulsen S. Effect of a varnish containing chlorhexidine and thymol (Cervitec) on approximal caries in 13- to 16-year-old schoolchildren in a low caries area. *Caries Res* 2003; **37**: 185-189.
14. Heintze SD, Twetman S. Interdental mutans streptococci suppression in vivo: a comparison of different chlorhexidine regimens in relation to restorative material. *Am J Dent* 2002; **15**: 103-108.
15. Hoffmann T, Bruhn G, Richter S, Netuschil L, Brex M. Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Investig* 2001; **5**: 89-95.



16. Ie YL, Schaeken MJ. Effect of single and repeated application of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in plaque from fissures of premolar and molar teeth. *Caries Res* 1993; **27**: 303-306.
17. Joharji RM, Adenubi JO. Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. *J Dent* 2001; **29**: 247-254.
18. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 2003; **17**: 337-343.
19. Lindquist B, Edward S, Torell P, Krasse B. Effect of different carriers preventive measures in children highly infected with mutans streptococci. *Scand J Dent Res* 1989; **97**: 330-337.
20. Lindquist B, Emilson CG, Wennerholm K.. Relationship between mutans streptococci in saliva and their colonization of the tooth surfaces. *Oral Microbiol Immunol* 1989; **4**: 71-76.
21. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; **50**: 353-380.
22. Maltz-Turkienicz M, Krasse B, Emilson CG. Effects of chlorhexidine and iodine on in vitro plaques of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Scand J Dent Res* 1980; **88**: 28-33.
23. Maltz M, Zickert I, Krasse B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. *Scand J Dent Res* 1981; **89**: 445-449.
24. Ostela I, Karhuvaara L, Tenovuo J. Comparative antibacterial effects of chlorhexidine and stannous fluoride-amine fluoride containing dental gels against salivary mutans streptococci. *Scand J Dent Res* 1991; **99**: 378-383.
25. Petersson LG, Maki Y, Twetman S, Edwardsson S. Mutans streptococci in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren. *Oral Microbiol Immunol* 1991; **6**: 284-287.
26. Pienihakkinen K, Soderling E, Ostela I, Leskela I, Tenovuo J. Comparison of the efficacy of 40% chlorhexidine varnish and 1% chlorhexidine-fluoride gel in decreasing the level of salivary mutans streptococci. *Caries Res* 1995; **29**: 62-67.
27. Rocha EP, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Cury JA. Longitudinal study of the influence of removable partial denture and chemical control on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva. *J Oral Rehabil* 2003; **30**: 131-138.
28. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1974; **19**: 1079-1081.
29. Skold-Larsson K, Borgstrom MK, Twetman S. Effect of an antibacterial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. *Clin Oral Investig* 2001; **5**: 118-121.
30. Twetman S, Hallgren A, Petersson LG. Effect of an antibacterial varnish on mutans streptococci in plaque from enamel adjacent to orthodontic appliances. *Caries Res* 1995; **29**: 188-191.
31. Twetman S, Petersson LG. Effect of different chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in interdental plaque and saliva. *Caries Res* 1997; **31**: 189-193.

32. Twetman S, Petersson LG. Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of mutans streptococci. *Caries Res* 1997; **31**: 361-365.
33. Twetman S, Petersson LG. Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res* 1998; **32**: 113-118.
34. Twetman S, Petersson LG. Interdental caries incidence and progression in relation to mutans streptococci suppression after chlorhexidine-thymol varnish treatments in schoolchildren. *Acta Odontol Scand* 1999; **57**: 144-148.
35. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; **73**: 672-681.
36. van Rijkom HM, Truin GJ, van 't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; **75**: 790-795.
37. Wallman C, Birkhed D. Effect of chlorhexidine varnish and gel on mutans streptococci in margins of restorations in adults. *Caries Res* 2002; **36**: 360-365.
38. Wallman C, Krasse B, Birkhed D, Diacono S. The effect of monitored chlorhexidine gel treatment on mutans streptococci in margins of restorations. *J Dent* 1998; **26**: 25-30.
39. Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 1978;**7**: 82-83
40. Zanela NL, Bijella MF, Rosa OP. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesqui Odontol Bras* 2002; **16**: 101-106.
41. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1982; **27**: 861-868.

## ANEXO

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

**Efeito de diferentes posologias do verniz de clorexidina nos estreptococos do grupo mutans da cavidade bucal.**

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof<sup>ª</sup>. Marisa Maltz, Prof<sup>ª</sup>. Lina N. Hashizume e Luciana G. Maia**

A cárie é causada por bactérias que colonizam as superfícies dentais (formando a placa dental) e produzem ácidos que pode ocasionar perda de mineral da superfície dental (podendo formar cavidades nos dentes) com o decorrer do tempo. As principais bactérias responsáveis pelo aparecimento da cárie são sensíveis ao tratamento com um anti-séptico chamado clorexidina. Aplicações de clorexidina são capazes de reduzir o número destas bactérias na saliva e na placa dental, por um longo período de tempo, contribuindo assim na prevenção da cárie dental. No entanto, não existe na literatura um consenso sobre qual é a melhor forma de aplicação do verniz de clorexidina a 1%.

**Objetivo do estudo:** Estudar diferentes posologias do verniz de clorexidina a 1% após aplicação tópica nas superfícies dentais.

**Distribuição dos Grupos:** **Grupo A:** 1 aplicação do verniz de clorexidina a 1%; **Grupo B:** 1 aplicação diária do verniz de clorexidina a 1% em 3 dias consecutivos; **Grupo C:** 3 aplicações do verniz de clorexidina a 1% com intervalo de 4 dias entre cada aplicação; **Grupo D:** 3 aplicações do verniz de placebo (sem clorexidina) em 3 dias consecutivos. A distribuição dos pacientes será realizada na forma de sorteio. O grupo placebo receberá tratamento com verniz de clorexidina no término do experimento.

**Aplicação do Verniz:** antes da aplicação do verniz será realizada a profilaxia de todos os dentes e uso de fio-dental no espaço interproximal. A aplicação do verniz *Cervitec*<sup>®</sup> será realizada em todos os dentes, com o auxílio de pincéis, fornecidos pelo fabricante. Após a aplicação será necessário ficar sem se alimentar por até 3 horas e a escovação dos dentes neste dia não deverá ser realizada.

**Coleta de Saliva e Placa dental:** amostras da saliva e da placa dental serão coletadas e analisadas no início do estudo, uma semana após o término da aplicação do verniz clorexidina 1% e uma vez por mês até que o número de estreptococos do grupo mutans retorne ao valor inicial ou até o período máximo de seis meses. Será necessário ficar 2 dias sem escovar os dentes posteriores antes de cada consulta.

**Acompanhamento e Assistência:** O participante do estudo receberá atendimento odontológico durante o período do experimento.

**Direito de desistência:** O paciente pode desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem qualquer ônus para si.

**Sigilo:** Todas as informações obtidas neste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, sem divulgação dos nomes das pessoas envolvidas.

**Consentimento:** Declaro ter lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este formulário, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste termo. Assim, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, permito a participação do meu filho(a) neste estudo.

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do Responsável:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do Pesquisador:** \_\_\_\_\_

Este consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa, e outra de propriedade dos pesquisadores responsáveis.