



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

PATRÍCIA FERREIRA DAMASCENO ISACKSSON

**EFEITOS DA CLOREXIDINA NANOENCAPSULADA SOBRE A CAVIDADE ORAL
EM HUMANOS**

MACAPÁ / AP

2019

PATRÍCIA FERREIRA DAMASCENO ISACKSSON

**EFEITOS DA CLOREXIDINA NANOENCAPSULADA SOBRE A CAVIDADE ORAL
EM HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração de Ensaios Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

MACAPÁ / AP

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Orinete Costa Souza – CRB-2/1709

Isacksson, Patrícia Ferreira Damasceno.

Efeitos da clorexidina nanoencapsulada sobre a cavidade oral em humanos / Patrícia Ferreira Damasceno Isacksson ; Orientador, Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto; Coorientador, Fernando Antônio de Medeiros. – Macapá, 2019.

59 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Testes para micrônúcleos. 2. Doença periodontal. 3. Citogenética. I. Monteiro Neto, Moacir Bentes de Azevedo, orientador. II. Medeiros, Fernando Antônio de, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

617.6 I74e
CDD. 22 ed.

PATRÍCIA FERREIRA DAMASCENO ISACKSSON

**EFEITOS DA CLOREXIDINA NANOENCAPSULADA SOBRE A CAVIDADE
ORAL EM HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração de Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros

DATA DE APROVAÇÃO: 27 / 05 / 19

Ana Rita Pinheiro Barcessat

Examinadora: Profª Drª: Ana Rita Barcessat
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Alessandra Azevedo do Nascimento
Examinadora: Profª Drª: Alessandra Azevedo do Nascimento
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto
Orientador: Prof Dr: Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Paulo Fabrício Oliveira Ramos
Convidado: Prof Dr: Paulo Fabrício Oliveira Ramos
Dr. em Clínicas Odontológicas - FAMA

Macapá/AP
2019

*À minha família amada por todo o apoio,
especialmente ao meu esposo e aos meus 3
docinhos, brigadeirinho, docinho de côco e
docinho de leite, as quais são minhas fontes
de inspiração e força, e me ajudam a
enfrentar a vida todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu o dom da vida, me guiou nas escolhas e me deu forças para poder seguir.

Ao meu esposo Vandré Dias Isacksson, que sempre acreditou em mim e sempre me apoiou, se fazendo incansável para me ajudar no que eu precisasse.

Às três flores do meu jardim, Nicole, Isabela e Sophia, as quais tive que, mesmo com dor no coração, perder parte de suas infâncias para poder abraçar este projeto. Amo vocês e espero que perdoem minhas ausências.

Aos meus pais, Ray e Carlos, que sempre me ensinaram o valor da educação.

A minha querida, grande amiga e parceira, que tem sonhos tão grandes quanto os meus, Valéria Catarina Sena Gabriel, muito obrigada pelo apoio, orientações e conselhos.

Aos meus maravilhosos e incríveis amigos da turma 2017 do mestrado em Ciências da Saúde da UNIFAP, foi um prazer conhecê-los e uma honra ter a amizade de vocês. Nunca vou esquecer dos momentos de descontração e de parceria pelos quais passamos juntos.

Aos queridos Anderson Jadder Alves Pereira Júnior, Érica Melissa Machado Palmeirim, Éryck Ripke Donin, João Batista Pereira dos Santos Júnior e Raquel Dosares Batista da Silva, por toda a ajuda. Vocês foram simplesmente maravilhosos.

À Dra. Alessandra Azevedo do Nascimento e à Dra Ana Rita Barcessat, pelas sugestões e orientações durante toda a trajetória desta pesquisa.

Ao Dr Francisco Fábio Oliveira de Sousa pela brilhante pesquisa, a qual foi a semente que se transformou em curiosidade, vontade, sonhos, e, ao fim, motivou este estudo.

Ao meu orientador Moacir Bentes de Azevedo Monteiro Neto, obrigada pelo direcionamento e por todos os ensinamentos.

A todos que, direta ou indiretamente, deixaram suas marcas e contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos,

Bati na porta da vida e disse-lhe:

Não tenho medo de vivê-la!”

(Augusto Cury)

RESUMO

A clorexidina é considerada um antisséptico com ação bactericida tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, além de ação bacteriostática, uma vez que impede a proliferação bacteriana. Pode ser empregada para controle de placa supragengival e manutenção da saúde dos dentes e das mucosas teciduais da cavidade oral. Entretanto a utilização dos antissépticos bucais apresenta eficácia controversa, pois, apesar de possuírem uma efetividade no controle de diversas bactérias patogênicas podem apresentar um potencial genotóxico no epitélio da mucosa bucal nos indivíduos que fazem uso desta substância. Esta pesquisa objetivou responder a questão sobre a utilização da clorexidina nanoencapsulada a 0,12% e sua eficácia na cavidade oral em comparação com a clorexidina disponível comercialmente. Tratou-se de um ensaio clínico de prevenção, randomizado-controlado, paralelo, triplo-cego, com quatro braços, com amostra de 32 participantes, separados em 4 grupos com 8 integrantes cada, os quais receberam substâncias diferentes para o bochecho: clorexidina nano, veículo (etanol), clorexidina obtida comercialmente e placebo (zeína). Efetivou-se ainda exame oral, coleta das células epiteliais orais e aplicação de questionários quanti-qualitativos antes e após a utilização dos bochechos e a realização do teste de micronúcleos. Observou-se que a clorexidina nanoencapsulada reduziu sangramento gengival, permitindo também uma redução na presença de bolsas periodontais e não alterou a coloração dental, entretanto favoreceu o acúmulo de cálculo dental e foi a substância que apresentou sabor mais desagradável aos participantes do estudo. Quanto a frequência de micronúcleos, não houve alteração, demonstrando que esta substância não apresenta efeitos genotóxicos no período de 10 dias da realização do estudo.

Palavras-chave: Testes para micronúcleos. Clorexidina. Citogenética.

ABSTRACT

Chlorhexidine is considered an antiseptic with bactericidal action in both gram-positive and gram-negative bacteria, as well as bacteriostatic action, since it prevents bacterial proliferation. It can be used to control supragingival plaque and maintain the health of teeth and oral mucosa tissue. However, the use of oral antiseptics is controversial because, despite their effectiveness in controlling several pathogenic bacteria, they may have a genotoxic potential in the oral mucosa epithelium in individuals who use this substance. This research aimed to answer the question about the use of 0.12% nanoencapsulated chlorhexidine and its efficacy in the oral cavity compared to commercially available chlorhexidine. It was a four-arm, randomized controlled, parallel, triple-blind prevention trial with a sample of 32 participants, separated into 4 groups with 8 members each, who received different mouthwash substances: chlorhexidine nano., vehicle (ethanol), commercially obtained chlorhexidine and placebo (zein). Oral examination, oral epithelial cell collection and quantitative and qualitative questionnaires were performed before and after the use of mouthwash and the micronucleus test. It was observed that nanoencapsulated chlorhexidine reduced gingival bleeding, also allowing a reduction in the presence of periodontal pockets and didn't change the dental color, however favored the accumulation of dental calculus and was the substance that presented the most unpleasant taste to the study participants. As for the frequency of micronuclei, there was no change, showing that this substance has no genotoxic effects within 10 days of the study.

Keywords: Micronucleus tests. Chlorhexidine. Cytogenetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem de célula epitelial oral humana contendo micronúcleos (setas), corada por PAS e Fast Green. Magnificação em 1000 x (microscópio óptico).	17
Figura 2 – Esquema representando nanocápsulas com a substância ativa: (A) adsorvida à parede polimérica, e (B) dissolvida no núcleo oleoso.	21
Figura 3 – Ilustração esquemática demonstrando a Sonda Periodontal Comunitária ou Sonda OMS.	24
Figura 4 – Imagem demonstrando a arcada dentária dividida em sextantes destacando-se os dentes-índices (setas em preto) utilizados no IPC.	24
Quadro 1 – Nanopartículas de Zein. Comparação entre Clorexidina Nanoencapsulada e Nanocapsula em Branco	28
Gráfico 1 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo A (CHX Nano)	34
Gráfico 2 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo B (Veículo).	34
Gráfico 3 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo C (CHX comercial).	35
Gráfico 4 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo D (Branco).	35

LISTA DE TABELAS

	32
Tabela 2 – Índice de Biofilme Visível	33
Tabela 3 – Presença de bolsa periodontal.	36
Tabela 4 – Correlação das médias de Micronúcleos por grupo.	37
Tabela 5 – Representação das médias de MNs por grupo.	38
Tabela 6 – Percepção sobre as substâncias utilizadas.	39
Tabela 7 - Escala de Atribuição de sabor ao produto.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN Ácido desoxirribonucleico
BNp Nanopartículas em Branco
CAAEE Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP Comitê de Ética e Pesquisa
CEO-D Dentes Cariados, Esfoliados e Obturados
CHX Clorexidina
CHX Nano Clorexidina Nanoencapsulada
CNS Conselho Nacional de Saúde
IPC Índice Periodontal Comunitário
CPO-D Dentes Cariados Perdidos e Obturados
IBV Índice de Biofilme Visível
IMMES Instituto Macapaense do Melhor Ensino Superior
ISG Índice de Sangramento Gengival
MN Micronúcleo
MNs Micronúcleos
nm Nanômetro
OMS Organização Mundial de Saúde
pDI Índice de Polidispersão
qsp Quantidade Suficiente Para
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNIFAP Universidade Federal do Amapá
WHO World Health Organization
CPITN Community Periodontal Index of Treatment Needs

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 TESTE DO MICRONÚCLEO	17
3.1.1 Análise de Micronúcleos para Monitoramento da Carcinogênese	18
3.1.2 Análise de Micronúcleos em Células Epiteliais	18
3.2 AGENTES GENOTÓXICOS	19
3.3 CLOREXIDINA	20
3.3.1 Nanocapsula	21
3.4 BIOFILME	22
3.5 DOENÇA PERIODONTAL	22
3.6 ÍNDICES ODONTOLÓGICOS	23
3.6.1 Índice de Biofilme Visível - IBV	23
3.6.2 Índice Periodontal Comunitário – IPC	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 INDIVÍDUOS	25
4.2 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO	26
4.3 EXAME ODONTOLÓGICO	26
4.3.1 Índice de Biofilme Visível - IBV	26
4.3.2 Índice Periodontal Comunitário – IPC	27
4.3.3 Periograma	27
4.4 TRATAMENTO	28
4.5 COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS	29
4.6 PREPARO DAS LÂMINAS	29
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRONÚCLEOS	30
4.8 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 PERFIL DAS AMOSTRAS	32
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AVALIAÇÕES DOS ÍNDICES.....	32
5.2.1 Índice de Biofilme Visível (IBV)	32

5.2.2 Índice Periodontal Comunitário (IPC)	33
5.3 BOLSA PERIODONTAL	35
5.4 CÉLULAS COM MICRONÚCLEO	36
5.5 PERCEPÇÃO DOS PACIENTES SOBRE AS SUBSTÂNCIAS QUE FORAM UTILIZADAS.....	38
6.CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Apêndice B – Questionário Inicial	
Apêndice C - Questionário Final	
Apêndice D - Ficha para levantamento Periodontal	
Apêndice E - Periograma	
Anexo A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	

1 INTRODUÇÃO

As condições da saúde oral acarretam grande impacto na saúde geral e na qualidade de vida dos pacientes, e o cirurgião dentista exerce um papel de importância fundamental na prevenção de complicações. É de fundamental importância a manutenção da saúde bucal, uma vez que a ocorrência de determinados microrganismos pode favorecer o surgimento de diversas patologias orais, dentre elas, cárie, abscessos, cistos, dor, perda óssea e halitose.

Os colutórios têm utilização para auxílio da higiene oral para reduzir o biofilme e a gengivite e devem ser empregados de forma adaptada às necessidades específicas dos pacientes (SILVERMAN, WILDER, 2006). Destas substâncias a clorexidina é a mais utilizada e apresenta-se em concentrações de 0,12%, 0,2% ou 2%, entretanto o uso na concentração 0,12% apresenta eficácia e redução de efeitos colaterais em comparação a soluções com maior concentração (MOREIRA et al., 2010) e possui atividade antimicrobiana sobre estreptococos do grupo mutans, leveduras e outros microrganismos, entretanto deve ser utilizada com cautela pois apresenta efeitos adversos (MOREIRA et al., 2008).

A utilização da clorexidina como enxaguante oral pode apresentar algumas implicações adversas, as quais podem ser controladas e prevenidas pela utilização correta desta substância, como modificação da cor dos dentes, restaurações, próteses e inclusive língua, surgimento de cálculos com localização supragengival, podendo ainda causar perda do paladar, gosto desagradável, queimaduras em tecido mole, xerostomia e inclusive dor na cavidade oral (PEGORARO et al., 2014).

As células do epitélio da cavidade oral são importantes para verificação de possíveis alterações ocorridas no ácido desoxirribonucleico (ADN) em decorrência a exposição a agentes carcinógenos, portanto a utilização de uma metodologia simples, com baixo custo e não invasiva permite com que populações expostas constantemente a ação a agentes genotóxicos possam ser monitoradas, permitindo ainda que seja possível associar o estilo de vida aos danos observados nesse epitélio (ANDRADE et al., 2005).

Neste sentido o teste de micronúcleos é empregado para detecção de mutagenicidade porque permite um rastreamento mais simples e muito mais rápido dos danos cromossômicos nas preparações citológicas. A utilização das células esfoliadas apresenta vantagem sobre os linfócitos uma vez que os MNs podem ser analisados a partir de células do provável órgão-alvo, o que favorece o controle citogenético dos grupos com risco de desenvolver câncer (SARTO, 1987).

A observação da quantidade de micronúcleos em células humanas esfoliadas pode demonstrar as consequências da ação de agentes genotóxicos e carcinogênicos sobre os tecidos alvos (SOUTO et al., 2010)

A nanotecnologia permite a inclusão de substâncias ativas que, ao invés de estarem na forma livre, ou seja, serem adicionadas diretamente ao veículo, estão na forma encapsulada, em vesículas nanométricas, chamadas de nanocápsulas (SCHMALTZ, DOS SANTOS, GUTERRES, 2005). Neste sentido a nanotecnologia fornece uma diversidade de vantagens como a melhora do índice terapêutico e fornecimento de soluções para problemas de entrega de determinados fármacos, através da utilização das nanocápsulas (MORADI, 2004).

Portanto, como a utilização de antissépticos bucais apresenta eficácia controversa uma vez que pode colaborar para a elevação do câncer bucal, devido ao álcool na sua composição (MARINHO, ARAUJO, 2007), e exibe potencial em induzir danos genéticos (WILTGEN, 2007; DÓREA, 2008) este estudo foi motivado visando verificar os efeitos da clorexidina nanoencapsulada a 0,12% sobre a cavidade oral por meio da observação da influência desta substância sobre o epitélio oral e dentes, comparando-a ainda com o digluconato de clorexidina a 0,12%, disponível comercialmente. Se a clorexidina nanoencapsulada demonstrar reduzir a placa bacteriana e não alterar a frequência de MNs, então poderá ser utilizada como antisséptico bucal.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos de diferentes formulações de clorexidina na cavidade oral bem como suas atuações sobre as células epiteliais orais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a quantidade de micronúcleos nas células bucais com clorexidina a 0,12% antes e após bochecho;
2. Observar a quantidade de micronúcleos nas células bucais com nanopartículas de clorexidina a 0,12% antes e após bochecho;
3. Analisar a presença de placa bacteriana e doença periodontal no início e fim da pesquisa, bem como a percepção dos participantes sobre possíveis efeitos da clorexidina nanoencapsulada na mucosa oral, como alterações na cor dos dentes ou alteração no paladar.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TESTE DO MICRONÚCLEO

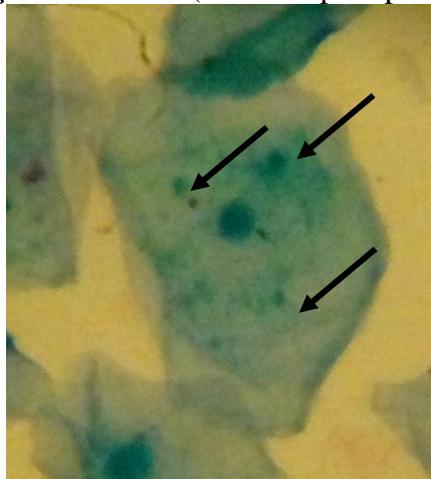
No início do século vinte os micronúcleos puderam ser observados pelo pesquisador Howell no citoplasma de eritrócitos, o qual os denominou de “fragmentos de material nuclear, entretanto, somente por volta da década de 70, quando K. Boller e W. Schmid observaram *in vivo* a medula de roedores é que foi utilizado pela primeira vez o termo Teste do Micronúcleo (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

Os micronúcleos (MNs) são estruturas que podem ser visualizadas na região do citoplasma de células que estão em intérfase e resultam de fragmentos cromossômicos os quais surgem devido alguma ruptura no cromossomo, ou ainda a partir de cromossomos inteiros, por algum distúrbio no fuso (HEDDLE et al., 1983).

Eles têm sua origem a partir de regiões cromossômicas atrasadas ou irregulares durante o processo da anáfase, podendo também derivar de cromátides acêntricas ou de fragmentos cromossômicos produzidos por uma ruptura no cromossomo (SARTO, 1987).

Os MNs podem ser únicos ou múltiplos e devem possuir estrutura da cromatina com semelhança e com intensidade de cor similar ou mais fraca do que a apresentada pelo núcleo principal apresentar borda evidente, com a presença de membrana nuclear; exibir um formato arredondado; ter localização intracitoplasmática e diâmetro menor do que 1/5 ao apresentado pelo núcleo principal (Figura 1) (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992).

Figura 1 – Imagem de célula epitelial oral humana contendo micronúcleos (setas), corada por PAS e Fast Green. Magnificação em 1000 x (microscópio óptico).



Fonte: Própria do estudo, 2019.

3.1.1 Análise de micronúcleos para monitoramento da carcinogênese

A observação dos micronúcleos é amplamente empregada para verificação de mutagenicidade porque permitem um rastreamento mais simples e muito mais rápido dos danos cromossômicos nas preparações citológicas quando comparado com os ensaios na verificação das aberrações cromossômicas. A realização do teste de micronúcleo, em células esfoliadas da cavidade oral humana, tem demonstrado ser suficientemente validada e sensível, pois apresenta a capacidade de detectar as consequências na mucosa, mesmo em baixas doses de carcinógenos ambientais (SARTO, 1987).

Através do teste do micronúcleo pode-se avaliar o quanto a mucosa oral está comprometida, como também pode-se observar a eficiência de protocolos de prevenção. A vantagem desse teste é que este apresenta capacidade de observação, *in vivo*, do estado de uma mucosa oral que está sendo exposta a agentes carcinógenos, co-carcinógenos e antioxidantes, o que torna difícil em reproduzir *in vitro* (ANDRADE et al., 2005).

3.1.2 Análise de micronúcleos em células epiteliais

A vantagem da utilização das células esfoliadas epiteliais sobre os linfócitos deve-se ao fato dos micronúcleos poderem ser analisados nas células do provável órgão-alvo, facilitando a observação citogenética dos grupos com um risco elevado de desenvolver por exemplo câncer da cavidade oral (SARTO, 1987).

A aplicação do teste da frequência de MNs em odontologia serve como indicador para possibilitar a avaliação, de maneira sensível, da ação genotóxica de agentes que apresentam intimidade com o epitélio oral. Possivelmente o aumento na frequência de MNs pode ser induzido devido a ação de algum agente químico genotóxico. Qualquer tecido, desde que possa realizar a multiplicação celular, pode apresentar aberrações cromossômicas. Portanto, o teste de micronúcleos tornou-se um instrumento amplamente empregado nas pesquisas para verificar a segurança de diversas substâncias, classificando-as desta forma, como carcinogênicas ou não (KERN, 2006).

A formação de MNs deve ser considerada um dano citogenético agudo e localizado (SUHAS et al., 2004).

O teste do micronúcleo demonstra ser um admirável marcador intermediário para avaliação do grau de exposição da mucosa oral a agentes carcinógenos. Por apresentar uma metodologia não invasiva, simples e de baixo custo, além de possuir capacidade em monitorar

os resultados de constantes exposições, de programas de interferência com micronutrientes antioxidantes, bem como por avaliar, em indivíduos que já tiveram câncer na região de cabeça e pescoço, o comprometimento de outros sítios com possibilidade de alteração celular. Este teste demonstra clinicamente grande importância, uma vez que a quantificação de células apresentando micronúcleos, obtidas por meio de citologia esfoliativa, pode indicar a eliminação de hábitos e auxiliar terapias antioxidantes em pessoas expostas aos fatores de risco do câncer de boca, mas que ainda não possuem sinais clínicos de alterações nas células (ANDRADE et al., 2005).

3.2 AGENTES GENOTÓXICOS

Apesar do teste de MN apresentar diversas vantagens, a cavidade bucal possui uma diversidade de fatores que podem agir e provocar alterações celulares e moleculares alterando a frequência basal e induzindo ao aumento do número de MN (NOVAIS, 2014).

Existe uma diversidade de agentes considerados como fatores de risco para o desenvolvimento de lesões malignas na cavidade oral, pois apresentam potencial genotóxico, como fumo, álcool, mate, medicações e alimentos (DIETZ et al., 2000). Os fatores de estilo de vida que podem influenciar a frequência dos MN na cavidade oral incluem a dieta, o tabaco e o consumo de álcool (KASHYAP, REDDY, 2012).

Uma das principais fontes de exposição do indivíduo a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos é a dieta, seja pela própria composição do alimento ou modo de preparo com utilização de corantes, temperos ou contaminantes que englobam uma mistura diversa de agentes químicos (DUSMAN et al., 2012). Para redução da frequência de MNs a combinação de múltiplos nutrientes parece apresentar maior eficácia quando os índices de folato e vitamina B12 estão normais, se comparados com efeitos individuais dos micronutrientes (THOMAS et al., 2011).

O tabaco contém uma diversidade de produtos químicos no seu fumo, sendo alguns causadores de genotoxicidade, como a nicotina, o alcatrão e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, antecessores de químicos que elevam o risco para o câncer (CHATTERJEE et al., 2009). Verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre o tabaco e a frequência de MNs e indivíduos que fumam um maior número de cigarros (mais de 40 cigarros por dia) têm um aumento estatisticamente significativo de MNs quando comparado com os não fumantes (BLOCHING et al., 2008).

Em estudos com células clinicamente normais esfoliadas da cavidade oral de pessoas alcoolistas e observou-se que, mesmo de forma isolada, o álcool provoca aumento na frequência de MNs (REIS et al., 2002). Devido ao fato das células orais serem as primeiras a entrarem em contato direto com o álcool ingerido, o consumo do álcool é um dos fatores avaliados para determinar a influência na frequência de MNs em células esfoliadas da cavidade oral (NOVAIS, 2014).

O álcool é encontrado em muitos dos colutórios e a associação observada entre uso de antisséptico bucal e desenvolvimento de câncer bucal pode ser devida a esse componente (MCCULLOUGH, FARAH, 2008). Com a utilização aumentada dos bochechos há um maior tempo de exposição da mucosa oral ao álcool, apontando que os colutórios bucais com alto teor de álcool podem estabelecer lesões hiperqueratinizadas tanto em animais de laboratório quanto em seres humanos (PELÁEZ et al., 2004).

3.3 CLOREXIDINA

O gluconato de clorexidina foi sintetizado por pesquisadores que procuravam um agente para curar a malária no fim dos anos 40. Somente em 1954 descobriu-se que se tratava de uma importante substância antisséptica, com ação bactericida para controle de bactérias gram-positivas, gram-negativas, e fungos, além de ação bacteriostática, uma vez que impedia proliferação bacteriana. A clorexidina possui duas principais formas de atuação: o digluconato (antimicrobiano) e o dicloridrato (age por contato na parede do intestino, recuperando e estabilizando a integridade da microbiota intestinal) (DA ROCHA, 2009).

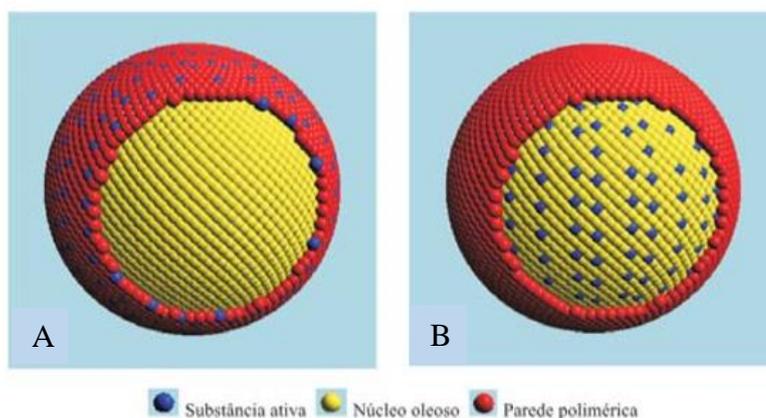
A clorexidina apresenta vantagens sobre os demais agentes químicos na odontologia, o que a coloca em destaque e permite sua utilização como padrão-ouro para o controle químico da placa bacteriana (ZANATTA; RÖSING, 2007).

Possíveis efeitos colaterais são conferidos ao uso prolongado da clorexidina em colutórios, como o surgimento de manchas acastanhadas nos elementos dentais, em restaurações ou no dorso da língua, descamação gengival e perda da sensibilidade oral, presença de gosto amargo e interferência na percepção gustativa. Ainda que existam comercialmente preparações em que a clorexidina está presente na concentração de 2%, a utilização da clorexidina a 0,12% é a mais indicada para bochechos, uma vez que, nessa concentração, são atenuados os efeitos adversos das soluções mais concentradas, conservando desta maneira a eficácia contra os microrganismos da cavidade oral (GEBRAN, GEBERT, 2002) comentaram sobre.

3.3.1 Nanocápsula

As nanocápsulas são estruturas vesiculares constituídas por um fino envoltório polimérico biodegradável e uma cavidade central com um núcleo oleoso onde a substância ativa encontra-se dissolvida (Figura 2). São consideradas um sistema reservatório com diâmetro submicrométrico, com variação entre 10 a 1000 nm, onde o componente ativo pode mostrar-se dissolvido na região central oleosa ou fixado ao envoltório polimérico. Geralmente revelam-se como suspensões líquidas (SOPPIMATH et al., 2001).

Figura 2 – Esquema representando nanocápsulas com a substância ativa: (A) adsorvida à parede polimérica, e (B) dissolvida no núcleo oleoso.



Fonte: SCHMALTZ; DOS SANTOS; GUTERRES, 2005.

O desenvolvimento das nanoformulações é uma opção que possibilita o aprimoramento da farmacodinâmica e farmacocinética dos fármacos (OJEWOLE et al., 2008), uma vez que as vesículas nanométricas protegem e favorecem a entrega destes (RAWAT et al., 2006).

Moléculas com relevância terapêutica são transportadas em nanopartículas para que possa haver liberação controlada destas e com isso haja influência nos processos biológicos. As nanocápsulas são carregadas com grandes quantidades de moléculas, porém promovem uma entrega controlada e direcionada (ABOU NEEL et al., 2015).

Muitas pesquisas estão em desenvolvimento para ampliar o conhecimento acerca das formulações que sejam capazes de atenuar efeitos colaterais, disfarçar sabores desagradáveis bem como reduzir o número de doses que levem ao efeito desejado dos fármacos (FEITOSA et al., 2008), e a evolução tecnológica tem contribuído para que haja o aumento da eficácia e estabilidade destes (SCHMALTZ, DOS SANTOS, GUTERRES, 2005).

Contudo, apesar de ser uma tecnologia que proporciona tantos benefícios, ainda faz-se necessário um maior estudo sobre o impacto que possa causar ao organismo (EMANUELLI, 2015).

3.4 BIOFILME

O crescimento microbiano em superfícies ocorre por dois motivos, o primeiro deve-se ao fato dos nutrientes se fixarem às superfícies, o segundo deve-se ao fato de que as superfícies são campos em que os microrganismos podem aderir-se, permitindo com que estes permaneçam em um habitat favorável. À medida em que há crescimento de microrganismos nas superfícies estas apresentam tendência a formar biofilmes, os quais são verdadeiras comunidades microbianas funcionais, com crescimento contínuo, que servem para autodefesa, pois apresentam resistência às forças físicas, à fagocitose por células pertencentes ao sistema imune, bem como a entrada de moléculas tóxicas, como os antibióticos, permitindo com que os microrganismos permaneçam em um nicho mais favorável (MADIGAN, 2010).

O biofilme formado ao redor da superfície dental é considerado a principal causa de cárie, doença periodontal, infecções ao redor de implantes odontológicos e estomatites (ROSAN, LAMONT, 2000).

3.5 DOENÇA PERIODONTAL

Podem-se definir doenças periodontais como processos inflamatórios crônicos de origem infecciosa que podem ocorrer tanto em sítios individuais quanto em múltiplos, causados por bactérias presentes no biofilme dental as quais são o fator primário para instalação e desenvolvimento desta condição, podendo ainda esta doença acometer os tecidos gengivais, nas chamadas gengivites, e/ou os tecidos de suporte dos dentes, onde se denominam periodontites (CARRANZA et al., 2012).

Os microrganismos são essenciais para desencadear a doença periodontal, no entanto, a interação bactéria e hospedeiro determina a natureza resultante da doença, logo, a suscetibilidade do hospedeiro relaciona-se ao progresso e a extensão do dano. A gravidade e a extensão do processo podem estar associadas a aspectos comportamentais e alterações sistêmicas (LINDHE, LANG, KARRING, 2010; CAFIERO, MATARASSO, 2013).

3.5 ÍNDICES ODONTOLÓGICOS

Conforme (BRASIL, 2008) dentre os agravos mais comuns que afetam a cavidade oral da população podemos verificar a cárie dental e a doença periodontal (gingivite e periodontite).

A observação da condição periodontal pode ser realizada por meio do IPC (Índice Periodontal Comunitário) e apresenta como referência o exame da cavidade oral por sextantes (BRASIL, 2012).

3.6.1 Índice de Biofilme Visível - IBV

É importante realizar o registro do índice de placa exibido pelo paciente na consulta inicial bem como ao final do seu período de atendimento, por dois motivos, para dar ciência ao profissional sobre a necessidade individual do paciente em melhorar o seu controle de placa e para servir como padrão de avaliação do avanço do seu desempenho e, numa abordagem coletiva, servir como avaliador da eficácia de programas de promoção de saúde (SILVEIRA, OLIVEIRA, PADILHA, 2002).

O biofilme dental é agente determinante tanto da cárie dentária quanto das periodontopatias sendo utilizados procedimentos de natureza mecânica (escova e fio dental) para o seu combate. Embora seja conhecido o controle químico do biofilme dental com o emprego de várias substâncias, nenhuma delas mostrou-se capaz de substituir a escova e o fio dental (OPPERMANN, 1994).

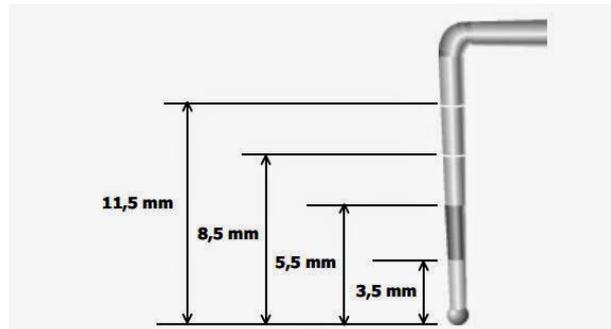
3.6.2 Índice Periodontal Comunitário – IPC

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a utilização do Índice Periodontal Comunitário (IPC) para avaliação da condição periodontal de populações em estudos epidemiológicos (WHO, 1997). Este índice originou-se do Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN), no entanto, a fundamental alteração gerada foi não mais classificar as necessidades de tratamento tendo como embasamento o código apontado pelo exame clínico (AINAMO et al., 1982; WHO, 1997).

O IPC considera 3 (três) indicadores da condição de saúde periodontal: o sangramento na gengiva, a presença de cálculo na cavidade oral e a presença de bolsas

periodontais. Para que seja possível a realização deste exame divide-se a cavidade oral em sextantes e, emprega-se a sonda periodontal desenvolvida pela OMS (Figura 3).

Figura 3 – Ilustração esquemática demonstrando a Sonda Periodontal Comunitária ou Sonda OMS.

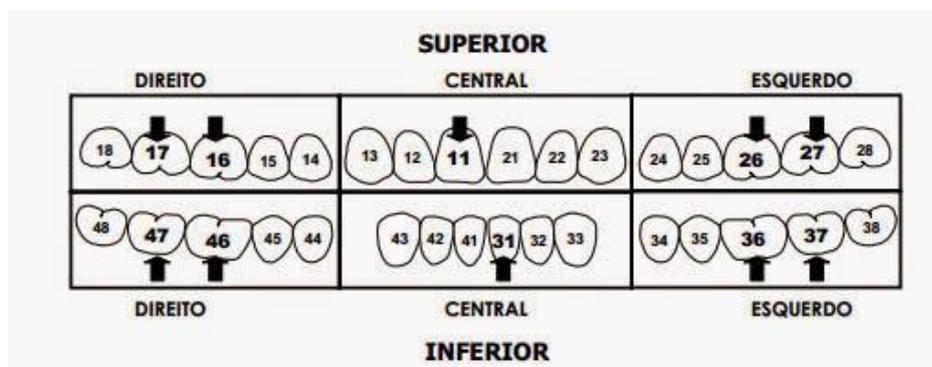


Fonte: BRASIL (2001).

Um exame parcial é obtido em adultos com idade acima de 20 anos por meio de 10 dentes-índices (Figura 4). As condições clínicas observadas são examinadas e classificadas por códigos que variam de zero a quatro: sextante hígido (0); sextante com sangramento (1); ao sextante com cálculo dentário em qualquer quantidade (2); ao sextante com presença de bolsa periodontal rasa, ou seja de 4 a 5mm (3) e ao sextante com presença de bolsa periodontal profunda com 6mm ou mais (4) (BRASIL, 2001).

O resultado do exame dar-se-á através de registro em um quadro onde apenas um único código único deve ser conferido para cada sextante, elegendo-se o dente que apresentar a maior severidade (CHALUB, PÉRET, 2010).

Figura 4 – Imagem demonstrando a arcada dentária dividida em sextantes destacando-se os dentes-índices (setas em preto) utilizados no IPC.



Fonte: BRASIL (2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Tratou-se de um ensaio clínico de prevenção, randomizado-controlado, paralelo, triplo-cego, com quatro braços.

4.1 INDIVÍDUOS

Participaram deste estudo 32 (trinta e dois) voluntários, de ambos os sexos, os quais procuraram atendimento em uma faculdade particular do município de Macapá no estado do Amapá. Estes indivíduos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos que receberam produtos diferentes para bochechos: clorexidina nano, zeína, clorexidina obtida comercialmente e somente o veículo qsp. O veículo utilizado foi o etanol 12,5%.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Incluíram-se neste estudo pessoas de ambos os sexos, com mais de 18 anos, que se referiram sem comprometimento sistêmico, e que apresentaram mucosa jugal íntegra e sem alterações patológicas. Foram excluídas pessoas que afirmaram serem diabéticas, cardíacas e com comprometimento sistêmicos e com alterações na mucosa jugal.

Como toda pesquisa que envolve seres humanos este estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFAP sob o Parecer: 2900.823 (Anexo A).

A amostra foi de conveniência, baseada na livre demanda. Fizeram parte dela 32 pessoas. O cálculo amostral foi realizado segundo Barbetta 2014:

N = Tamanho da população

E_0 = erro amostral tolerável

n_0 = primeira aproximação do tamanho da amostra

n = tamanho da amostra

Determinou-se 5% de erro amostral para este estudo. Logo,

$$5\% = 5/100 = 0,05$$

Aplicando na fórmula:

$$\boxed{n_0 = \frac{1}{E_0^2}} = \frac{1}{0,05^2} = \frac{1}{0,0025} = 400 \text{ participantes na primeira aproximação da amostra}$$

O número de pessoas que procuraram atendimento na faculdade de odontologia por dia, em uma clínica de odontologia, foi de 34 pessoas. Transpondo para a fórmula, teremos:

Então:

$$n = \frac{N \cdot n0}{N + n0} = \frac{34 \cdot 400}{34 + 400} = \frac{13.600}{434} = 31,33 \text{ participantes}$$

Logo, fez-se necessário uma amostra constituída por 32 participantes

4.2 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO

Foram utilizados como instrumento para coleta de dados um questionário quanti-qualitativo, com 15 perguntas, referente aos dados sócio-epidemiológicos dos participantes (Apêndice B) validado e modificado de Monteiro Neto, 2007, antes da coleta das células epiteliais orais e outro, com 5 questões, também quanti-qualitativo, para verificação da opinião dos participantes do estudo sobre os efeitos sentidos durante o período de utilização do produto empregado para bochecho (Apêndice C).

4.3 EXAME ODONTOLÓGICO

Um único examinador realizou observação dos pacientes e os dados foram registrados em ficha adaptada do Projeto SB 2000 (BRASIL, 2001), sendo assinalados os índices de Biofilme Visível - IBV e Periodontal Comunitário – IPC, bem como os valores para o preenchimento do periograma e cor dos elementos dentais.

O exame clínico odontológico foi realizado antes e depois da utilização do produto para bochecho e se deu por inspeção visual, feita com auxílio de luminária da cadeira odontológica, utilização de espátula de madeira descartável e jogos de instrumentais clínicos odontológicos esterilizados.

4.3.1 Índice de Biofilme Visível - IBV

Para verificação do Índice de Biofilme Visível individual (IBV ind) observou-se a superfície dental de cada pesquisado por meio de ficha adaptada para levantamento periodontal (Apêndice D). Realizou-se a somatória das superfícies com presença de placa e o valor foi representado em porcentagem, como representado na fórmula seguinte:

$$IBV \text{ individual} = \frac{\text{Total de dentes do participante adulto (máximo 32 dentes)} \text{-----} 100\%}{\text{Total de dentes com placa} \text{-----} x}$$

Após o levantamento do índice de placa visível individual calculou-se o Índice de Biofilme Visível da população total (IBV coletivo) que compôs a amostra por meio da soma do total dos dentes da população estudada do n amostral e do total de dentes com placa bacteriana, em seguida aplicou-se regra de três, e o resultado expressou a prevalência de placa da população estudada, conforme fórmula abaixo demonstrada:

$$IBV\ coletivo = \frac{\text{Total de dentais da amostra} \dots\dots\dots 100\%}{\text{n}^\circ \text{ de dentes com presença de placa} \dots\dots\dots x}$$

4.3.2 Índice Periodontal Comunitário - IPC

O índice periodontal comunitário foi realizado por meio da verificação de dentes índices (17, 27, 11, 26, 27, 37, 36, 31, 46, 47), informando a pior condição encontrada por sextante. O registro foi efetuado com utilização de sonda IPC ou OMS, recomendada pela American Dental Association e American Association of Periodontology e os dados anotados em ficha adaptada parlevantamento periodontal (Apêndice D).

A presença de apenas um elemento dental ou ausência completa de dentes no sextante ou configurou a exclusão do mesmo.

Os dados foram anotados de acordo com valores determinados para verificação deste índice, onde 0 representa sextante com estruturas de suporte hígidos; 1 demonstra sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem); 2 indicar presença de cálculo, com qualquer quantidade; 3 caracteriza bolsa periodontal com 4 a 5 mm; e 4 marca a presença de bolsa periodontal com 6 mm ou mais de profundidade no sextante (BRASIL, 2001).

Os sextantes examinados que apresentaram menos de dois elementos dentários remanescentes foram cancelados, registrado no local a letra “X” conforme Brasil (2001) e Brasil (2012).

4.3.3 Periograma

O periograma foi preenchido anotando-se os valores de profundidade inicial e final de sondagem com mais de 3mm dos dentes de cada participante da amostra (Apêndice E).

4.4 TRATAMENTO

Os participantes do estudo foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, onde cada grupo recebeu uma substância diferente: Grupo A - Clorexidina Nano (Digluconato de clorexidina 0,12%; zeina 0,07%; veículo qsp 25ml); Grupo B - Grupo Branco (veículo qsp 25 ml); Grupo C - Clorexidina disponível comercialmente (Digluconato de clorexidina 0,12%); Grupo D - zeina 0,07%.

Cada pesquisado recebeu um frasco descartável contendo 200 ml com uma das substâncias, identificado com as orientações a serem seguidas, título do estudo, nome da pesquisadora e telefone para contato.

Os participantes foram orientados a realizar bochecho trinta minutos após a escovação normal, com 10 ml de substância, 2 vezes ao dia, durante 30 segundos, por 10 dias, de forma que não houvesse influência dos produtos contidos nos dentifrícios, com o agente de cada grupo.

Todas as formulações de clorexidina utilizadas neste estudo foram disponibilizadas pelo Laboratório de Controle de Qualidade Bromatologia e Microbiologia da UNIFAP, exceto a clorexidina 0,12% utilizada comercialmente, a qual foi obtida comercialmente para inclusão neste estudo.

As nanopartículas de zeina (Sigma-aldrich®, Saint Louis, Missouri) contendo digluconato de clorexidina (0,125%) (CHX Nano 0,125) foram preparadas por nanoprecipitação da proteína. Nanopartículas em branco (BNp) foram preparadas da mesma maneira, exceto pela ausência de droga. O tamanho, índice de polidispersão (pdI) e potencial z para as nanopartículas estão descritas no Quadro 1. Foram preparadas antes da coleta, e armazenadas hermeticamente, permanecendo estáveis por 90 dias em condições de temperatura ambiente.

Quadro 1 – Nanopartículas de Zein. Comparação entre Clorexidina Nanoencapsulada e Nanocapsula em Branco

Formulação	Tamanho	Polidispersão (pdI)	Potencial z
CHX Nano 0,125	387,4 ± 7,8 nm	0,220	23,9 ± 0,5
BNp	328,3 ± 7,8nm	0,153	35,1 ± 0,9

Fonte: Própria do estudo, 2019.

Maiores informações sobre a CHX Nano utilizada neste estudo não podem ser disponibilizadas devido a mesma estar em processo de patente: Nanopartículas poliméricas de digluconato de clorexidina. N°BR10201801349.

4.5 COLETA DAS CÉLULAS EPITELIAIS

Antes do tratamento foram realizadas as coletas de células epiteliais da mucosa oral adaptando o protocolo realizado por Kern, 2006 e Souto et al., 2010.

Inicialmente as coletas foram realizadas no momento do preenchimento do questionário inicial para obtenção do controle negativo. Após período de 10 dias de utilização da substância determinada no estudo foram realizadas as coletas finais.

Previamente à realização da coleta das células epiteliais da mucosa oral dos pacientes participantes do estudo foi solicitado que enxaguassem a boca com água corrente para eliminar a presença de possíveis restos de alimentos e diminuir a concentração bacteriana nas lâminas dos esfregaços. Procedeu-se a uma leve raspagem em mucosa jugal, com movimento de cinco rotações em sentido único e suave pressão manual, utilizando-se espátula de madeira.

As lâminas foram devidamente limpas com álcool 99,5°GL e em seguida com um abaixador de língua, em madeira, umedecido em água, as células da mucosa oral foram raspadas e espalhadas sobre as lâminas que continham 1 gota de soro fisiológico a 0,9%. Cada coleta foi realizada em duplicata.

As lâminas contendo as células foram secas em temperatura ambiente e todo o material coletado foi encaminhado ao Laboratório do Grupo de Pesquisa Citogenética e Biomolecular- GPCBIO para identificação, em prazo de até 2 horas.

4.6 PREPARO DAS LÂMINAS

Foi realizada no Laboratório do Grupo de Pesquisa Citogenética e Biomolecular- GPCBIO.

O material coletado contido nas lâminas foi fixado com solução de metanol / ácido acético na proporção 3:1 e após 24h foi realizado a hidrólise com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 N por 15 minutos. Em seguida procedeu-se a lavagem das lâminas com água destilada por três vezes. Em seguida o material foi corado com a Coloração de Schiff e contra-coloração de Fast Green.

- Coloração de Schiff (PAS)

- 1- Lâminas foram cobertas com reagente A por 10 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada e removidos os excessos de água contidos nas lâminas.
- 2- Em seguida as lâminas foram cobertas com o reagente B, por 15 minutos, e posteriormente lavadas em água corrente por 2 minutos e em água destilada onde procedeu-se a remoção dos excessos de água.
- 3- Com o reagente C as lâminas foram cobertas por 2 minutos e lavadas em água corrente e destilada.

- Coloração de Fast Green

Colocou-se 5g de Fast Green em um recipiente contendo 500ml de etanol 95%. As lâminas foram coradas com esta solução de Fast Green por 30 segundos e em seguida foram enxaguadas em álcool a 70%. As lâminas após a coloração passaram por uma bateria de etanol à 95% por 1 minuto, butanol por 1 minuto, butanol/xileno (mistura 50:50) por 1 minuto e xileno, deixando no xileno até a montagem com o Entellan®.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRONÚCLEOS

Tanto a classificação quanto a contagem dos micronúcleos para os dois métodos utilizados neste estudo seguiram o protocolo de Tolbert et al. de 1992:

- Para a contagem das células foram incluídas as células com núcleos normais e intactos, apresentando perímetro nuclear liso e distinto e com citoplasmas intacto, excetuando-se as células com pequenas dobras e pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes.

- Foram considerados micronúcleos:

1. As estruturas que possuíram halo circundante alusivo a uma membrana, menor que 1/3 do diâmetro do núcleo associado, bem como ausência de sobreposições ou pontes com o núcleo.
2. A estrutura de cromatina com intensidade de cor semelhante ou mais fraca que as do núcleo principal;
3. As bordas eram distintamente reconhecíveis, sugerindo a presença de uma membrana nuclear;
4. Apresentavam formato "arredondado";

5. Estavam incluídos no mesmo citoplasma celular.

Nesta pesquisa considerou-se apenas a detecção de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal humana, excluindo-se células de avaliação submetidas a qualquer tipo de degeneração nuclear (cariólise, cariorrexe, picnose e fragmentação nuclear).

Para cada amostra foi realizada a contagem de 1000 células epiteliais por lâmina dos obtida de cada pesquisado. Na contagem foram incluídas as células com citoplasmas íntegros e sem sobreposições de outras células.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico em aumento de 100x.

4.8 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram tabulados em planilhas no Microsoft Excel-2010, para análise e tratamento dos dados descritivos das variáveis foram utilizadas a média, mediana, máximo, mínimo, e o desvio padrão.

Para a caracterização da estatística inferencial dos dados, utilizou-se o programa Graphic Prism. Todas as variáveis quantitativas apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro Wilk ($p < 0,05$). Assim, para variável quantitativa idade, utilizou-se a Correlação de spearman para correlacionar idade e as células micronucleadas. Para as variáveis quantitativas realizou-se a comparação das médias através do teste t de Student.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DAS AMOSTRAS

Dos 32 participantes, 53% (n=17) eram do sexo masculino e 34% (n=11) apresentaram faixa etária entre 30 a 39 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização das amostras

Variáveis		n	%
Sexo	Masculino	17	53
	Feminino	15	47
Idade	18 – 23	6	19
	24 – 29	5	16
	30 – 39	11	34
	40 – 49	6	19
	50 – 59	2	6
	60 – 69	2	6
	> 70 anos	0	0

Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

Os 32 pacientes foram divididos em quatro grupos, com oito indivíduos, e as respectivas substâncias para a realização do bochecho: substância A (CHX Nano), B (Veículo – Etanol 12,5%), C (CHX comercial) e D (Zeína). A seguir os resultados serão descritos em tópicos comparando os quatros grupos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AVALIAÇÕES DOS ÍNDICES

5.2.1 Índice de Biofilme Visível (IBV)

O uso das substâncias A, B, C, D quanto ao IBV estão descritas na Tabela 2. Observou-se que o Grupo D (Zeína) demonstrou uma diminuição da média entre Biofilme Visível de inicial para final maior em relação aos demais. A maior média foi apresentada pelo Grupo A (CHX Nano), onde teve uma diferença na média de IBV inicial e final ($p < 0,05$).

Da Rocha (2009) referiu os efeitos do digluconato de clorexidina como importantes para que este seja considerado como uma substância antisséptica, pois este atua sobre os microrganismos da placa bacteriana o que foi possível observar neste estudo, uma vez que, tanto a CHX comercial quanto a CHX Nano demonstraram redução no IPV inicial – final (4,32 e 0,76, respectivamente) e no IBV coletivo, que passou 13,74% no início da pesquisa para 11,23% no final do estudo.

Entretanto, não há como assegurar o efeito somente das substâncias utilizadas neste estudo, uma vez que, os participantes, por estarem sendo monitorados, podem ter melhorado a técnica ou tempo de escovação, o que também permitiria uma redução da presença do biofilme.

Tabela 2 – Índice de Biofilme Visível

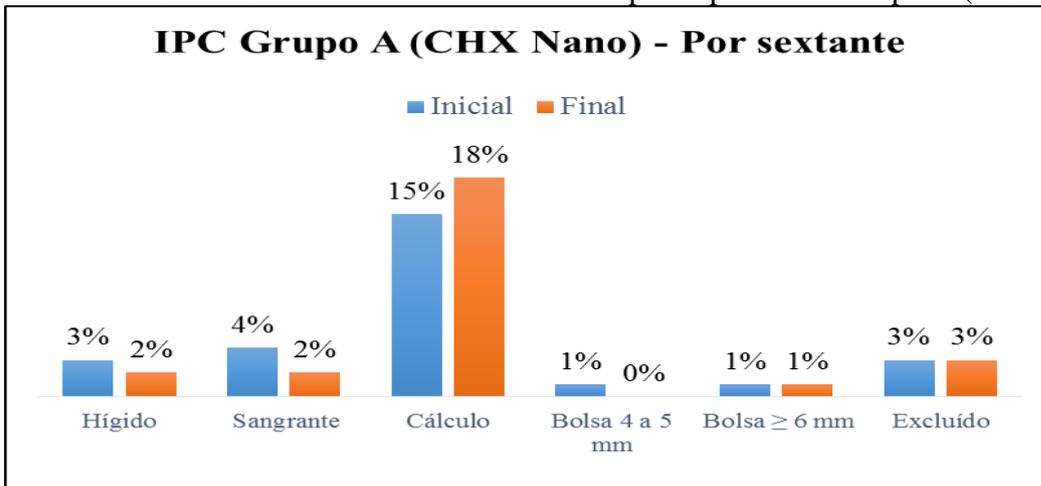
GRUPO	I.B.V	Média (±)	Mínimo	Máximo	Diferença Inicial-final	<i>p</i>
A	Inicial	17,46 (5,9)	9,65	32,5	0,76	0,01
	Final	16,70 (4,7)	4,82	25,71		
B	Inicial	11,4 (0)	5	24,82	3,2	0,01
	Final	8,2 (2,2)	3,75	12,4		
C	Inicial	16,19 (4)	3,75	29,42	4,32	<0,05
	Final	11,87 (0)	3,22	18,09		
D	Inicial	14,85 (4,7)	5,6	30,37	4,55	0,01
	Final	10,3 (4)	4,13	15		

Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

5.2.2 Índice Periodontal Comunitário (IPC)

No Gráfico 1 trata-se do IPC, por sextante, do Grupo A (CHX Nano), onde os sextantes Hírido, Sangrante e com Bolsa de 4 a 5 mm apresentaram diminuição na porcentagem inicial e final, enquanto os sextantes com Cálculo demonstram um aumento do percentual inicial para o final. Para MEYER et al., 2007, a utilização do dentifício contendo clorexidina quando utilizado de forma prolongada pode numentar a formação de cálculos supragengivais. Portanto faz-se necessário maiores pesquisas para verificar o aumento de cálculo ocasionado pela CHX Nano no período de 10 dias.

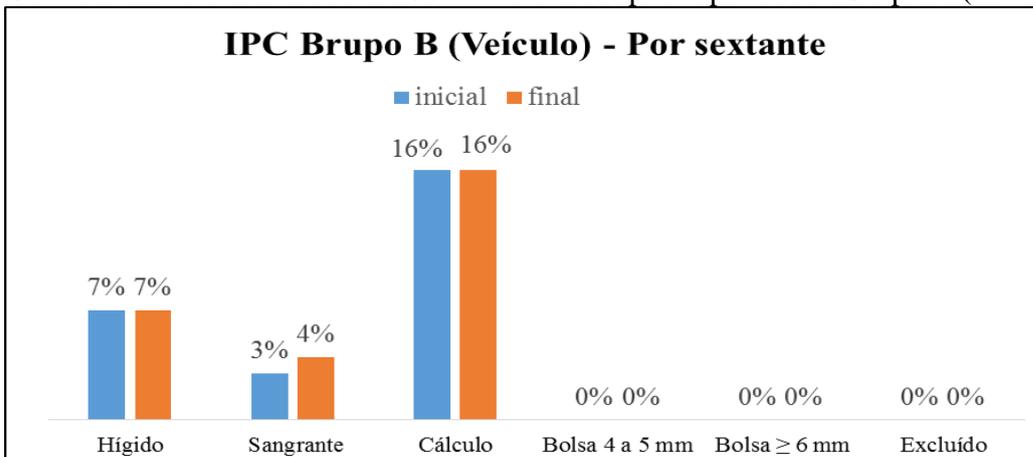
Gráfico 1 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo A (CHX Nano)



Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

No Grupo B (veículo), o Sextante Sangrante apresentou um aumento, enquanto todos os demais sextantes mantiveram os valores percentuais iniciais e finais no IPC (Gráfico 2).

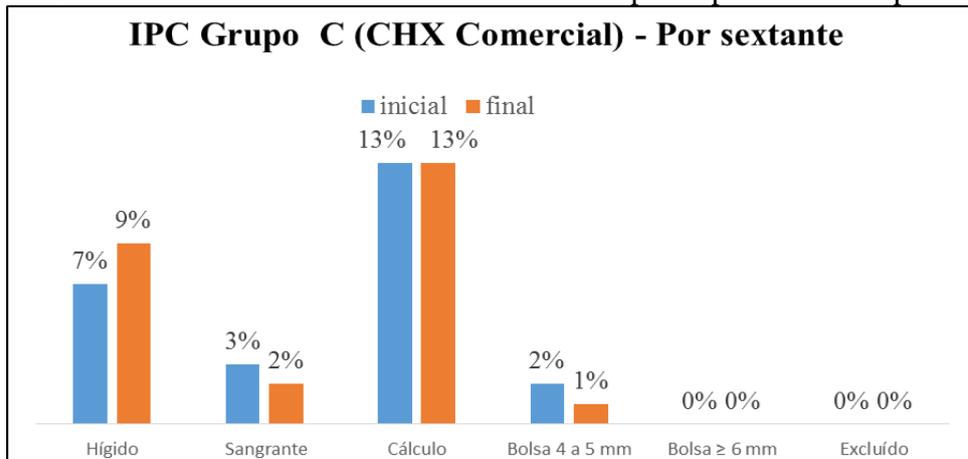
Gráfico 2 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo B (Veículo).



Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

Para o Grupo C (CHX comercial), no IPC, o Sextante Hígido mostrou aumento percentual (de 7% a 9%). Houve redução percentual nos sextantes Sangrante e com bolsa de 4 a 5 mm (Gráfico 3). Entretanto, apesar de ser possível a observação de efeitos da clorexidina sobre algumas bolsas periodontais, Hortese et al.(2010) referiram que esta substância não apresenta efetividade quando há presença de periodontite, com bolsas periodontais já instituídas, provavelmente por isso não foi possível verificar efeitos da CHX comercial em bolsas com mais de 5mm.

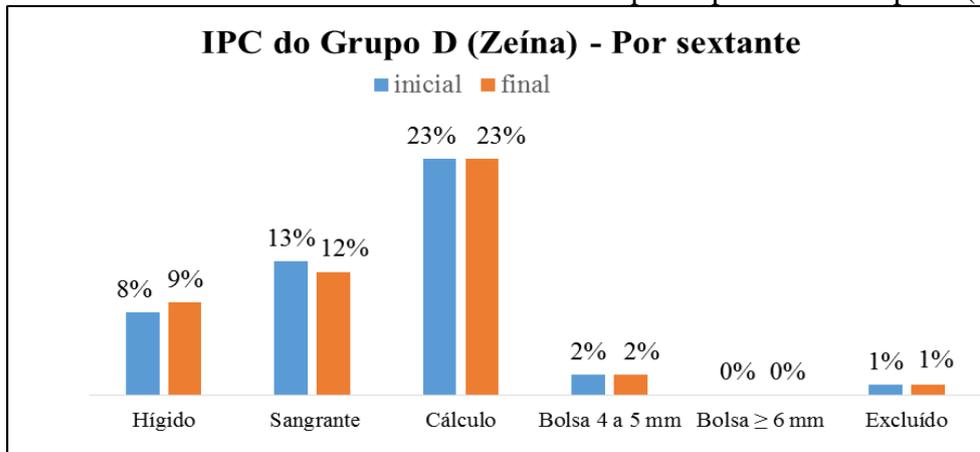
Gráfico 3 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo C (CHX comercial).



Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

O Grupo D (Zeína), demonstrou redução no sextante Sangrante e aumento no sextante Hígido, permanecendo constante os valores percentuais dos demais sextantes analisados (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Índice Periodontal Comunitário dos participantes do Grupo D (Branco).



Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

5.3 BOLSA PERIODONTAL

Segundo Gebran, Gebert, (2002) os agentes químicos dos antissépticos e dentifrícios só agem na placa supragengival não alcançam o sulco gengival ou a bolsa periodontal, entretanto, têm sido empregados mecanismos para liberação de antibióticos e antissépticos de forma lenta para o interior de bolsas mais profundas para tratamento de sítios ativos da doença periodontal, o que pode ser confirmado neste estudo, onde a maior média de presença de bolsa periodontal inicial foi observada no grupo A (CHX Nano), com 4 mm, e média 6 mm,

diminuindo para uma média final de 1mm. Entretanto não foi verificado efeitos da CHX Nano em bolsas periodontais com 6mm. Apesar disto seu efeito foi melhor que a CHX comercial, uma vez que a CHX Nano conseguiu atingir bolsas mais profundas. Nenhum grupo apresentou bolsa periodontal com 7 mm (Tabela 3).

Foi discutido por Hortense et al. (2010) que apesar das soluções com clorexidina a 0,12% até 0,2% serem consideradas como Padrão Internacional, e com maior utilização para a prevenção do biofilme e da gengivite, estas não possuem efetividade em situações em que verifiquem a presença de bolsas já instituídas, entretanto neste estudo observou-se um efeito na alteração de bolsa periodontal com o emprego da substância C (CHX Comercial) em bolsas periodontais até 5mm.

Tabela 3 – Presença de bolsa periodontal.

GRUPO		Média da Presença de Bolsa Periodontal				
		4mm (±)	5mm	6mm	7mm	Mais de 8mm
A (CHX Nano)	Inicial	6 (7)	2 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)
	Final	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)
B (Veículo)	Inicial	1 (0)	4 (1)	0	0	0
	Final	1 (0)	4 (1)	0	0	0
C (CHX Comercial)	Inicial	1 (0)	2 (0)	0	0	0
	Final	0	2 (0)	0	0	0
D (Zeína)	Inicial	4 (1)	4 (1)	2 (0)	0	1(0)
	Final	4,5 (0,9)	3 (1)	2 (0)	0	1(0)

Fonte: Instrumento da Coleta, 2019.

5.4 CÉLULAS COM MICRONÚCLEO

Na comparação entre as médias, através do Teste t, o Grupo A (Cloreridina Nano) demonstrou a maior média de redução de micronúcleos ($p < 0,05$). Assim como quando correlacionado com os outros grupos, o grupo C (Clorexidina Comercial) e D (Zeína) demonstraram uma correlação positiva e proporcional com o grupo A, quanto maior foi a diminuição de micronúcleo, maior diminuição também ocorreu nos demais grupos ($p < 0,05$). Não foram encontradas correlações com o grupo B inicial ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Correlação das médias de Micronúcleos por grupo.

	MÉDIA DE MICRONÚCLEO			
	INICIAL		FINAL	
	média	p(t)	média	p(t)
A	71,25	-	55	-
B	40,75	<0,05	34,75	<0,05
C	32,5	<0,05	27,75	<0,05
D	32,75	<0,05	33	<0,05
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
	r	p	r	p
B	0	>0,05	0,8	<0,05
C	0,8	<0,05	0,6	<0,05
D	0,7	<0,05	0,5	<0,05

Fonte: Resultado do estudo, 2019.

Ainda conforme a tabela 4, em relação aos efeitos das substâncias sobre as células, por meio do resultado do teste de MN, o grupo A (CHX nano) demonstrou não aumentar a frequência de MNs, evidenciando que a Clorexidina Nanoencapsulada não possui genotoxicidade sobre as células da cavidade oral. Este resultado está em concordância com os estudos de KERN (2006), que referiu que a ação de agentes genotóxicos aumenta a frequência de MNs.

O tempo de realização da pesquisa foi de apenas 10 dias, e neste período não foram observadas alterações no aumento da frequência de MNs com a utilização da clorexidina comercial (Grupo C), o que corrobora com os estudos de Zamora-Perez et al. (2013), onde o aumento da frequência de MNs e alterações nucleares em células da cavidade oral podem ser verificadas quando da utilização desta substância por um período superior a 30 dias. McCullough e Farah (2008) asseguraram que há evidências de risco de desenvolvimento de câncer na cavidade oral aumentado com o uso de enxaguatórios bucais principalmente contendo álcool na composição, recomendando que a utilização destes seja restrita a um prazo curto, por isso faz-se necessário realização da pesquisa por um período de tempo mais longo.

Neste estudo foi possível observar a presença de altas frequências de MNs nas mucosas orais dos pesquisados, situação em consonância com o estudo realizado por Novais (2014), o qual assegurou que, para medir lesões no DNA em humanos, a realização do teste de MNs em células epiteliais orais é um dos métodos menos invasivos, entretanto, pela existência na cavidade oral de uma diversidade de fatores que podem atuar e ocasionar alterações celulares e moleculares, modificando a frequência e induzindo ao aumento do

número de MNs, faz-se necessário conhecer quais fatores são capazes de interferir com a frequência basal e o seu grau de influência ao surgimento dos MNs (Tabela 5).

Assim como para Kashyap, Reddy (2012), os quais referiram que os fatores de estilo de vida podem influenciar a frequência dos MNs na cavidade oral, e dentre estes temos o tabaco, o consumo de álcool e a dieta (como por exemplo nas deficiências vitamínicas), portanto fazem-se necessários novos estudos para associar os resultados obtidos com a utilização da clorexidina nanoencapsulada ao estilo de vida do pesquisado, uma vez que este estudo limitou-se a observar a frequência de MNs.

Tabela 5 – Representação das médias de MNs por grupo.

	Média inicial	Média final	Diferença entre médias
A	71,25	55	63,125
B	40,75	34,75	37,75
C	32,5	27,75	30,125
D	32,75	33	32,875

Fonte: Resultado do estudo, 2019.

5.5 PERCEPÇÃO DOS PACIENTES SOBRE AS SUBSTÂNCIAS QUE FORAM UTILIZADAS.

A Tabela 6 apresenta questões referentes à percepção que os pacientes possuíram sobre as substâncias utilizadas. A coloração do elemento dental, após uso da substância, não teve nenhuma alteração, em nenhum dos grupos, uma vez que 100% da amostra não demonstrou variação na coloração dos dentes,

Os participantes referiam maiores alterações gengivais após utilização da clorexidina disponível comercialmente (80%) em comparação à clorexidina nanoencapsulada (37%). Corroborando com este resultado Gebran, Gebert (2002), comentaram sobre possíveis efeitos colaterais os quais são conferidos ao uso prolongado da clorexidina como colutório, como o surgimento de manchas acastanhadas nos elementos dentais, em restaurações ou no dorso da língua, descamação gengival e perda da sensibilidade oral, presença de gosto amargo e interferência na percepção gustativa.

Com relação a percepção e alteração na cor dos elementos dentais, 25% dos pesquisados que usaram CHX Comercial relataram alguma alteração e metade (50%) dos que

utilizaram a CHX Nano referiu perceber modificação na cor, isto provavelmente deveu-se ao fato de que esse grupo apresentou elevação no acúmulo de cálculo dental, demonstrando a necessidade de maiores estudos para verificar o motivo deste aumento, visto que em nenhum grupo houve alteração na coloração do elemento dental. A presença de tártaro foi observada por 75% no grupo C (CHX Comercial).

Tabela 6 – Percepção sobre as substâncias utilizadas.

Cor do elemento dental após uso da substância para bochecho	Com alteração (n)	Sem alteração(n)
Grupo A	0	100% (8)
Grupo B	0	100% (8)
Grupo C	0	100% (8)
Grupo D	0	100% (8)
Participante percebeu alteração na gengiva durante o período do uso da substância de bochecho	Sim	Não
Grupo A	37% (3)	63% (5)
Grupo B	36% (4)	64% (7)
Grupo C	80% (6)	20% (2)
Grupo D	63% (3)	37% (1)
Sensação de alteração no sabor dos alimentos	Sim	Não
Grupo A	50% (4)	50% (4)
Grupo B	25% (2)	75% (6)
Grupo C	25% (2)	75% (6)
Grupo D	10% (1)	90% (7)
Percepção de alteração de cor nos dentes	Sim	Não
Grupo A	50% (4)	50% (4)
Grupo B	10% (1)	90 (7)
Grupo C	25% (2)	75% (6)
Grupo D	25% (2)	75% (6)
Considerou aumentar depósitos calcificados (tártaros)	Sim	Não
Grupo A	12% (1)	88% (7)
Grupo B	0	100% (8)
Grupo C	75% (6)	25% (2)
Grupo D	0	100% (0)

Fonte: Instrumento de coleta. 2019.

Em relação a escala de sensação de sabor da substância utilizada, o Grupo B demonstrou maior média (9,3), seguido pelo grupo C com 8,4. O grupo A foi o apresentou menor média (4,5) entre os grupos pesquisados (Tabela 7), isto provavelmente porque esta substância foi disponibilizada aos participantes na formula pura, sem adição de substâncias que pudessem melhorar o sabor, tornando-a mais agradável. Conforme Feitosa et al. (2008), diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas buscando ampliar o conhecimento acerca de

formulações com capacidade de atenuar efeitos colaterais, disfarçar sabores desagradáveis bem como reduzir o número de doses que levam ao efeito desejado dos fármacos.

Tabela 7 – Escala de Atribuição de sabor ao produto.

Escala de atribuição de sabor ao produto	
	Média (±)
Grupo A	4,5 (3)
Grupo B	9,3 (2)
Grupo C	8,4 (1)
Grupo D	6,6 (2)

Fonte: Instrumento de coleta. 2019.

6 CONCLUSÃO

Verificou-se, ao final do estudo, que em todos os grupos houve redução da frequência de Micronúcleos ($p < 0,05$). Esta pesquisa evidenciou, portanto, que a quantidade de MNs após utilização da CHX Nano não demonstrou elevação, indicando que esta substância não apresenta genotoxicidade no período de 10 dias.

Em todos os grupos houve redução no IPV ($p < 0,05$) após utilização dos bochechos.

Com a utilização da Clorexidina Nano, por meio do emprego do IPC, observou-se uma redução no sangramento gengival (de 4% para 2%), entretanto a presença de cálculo passou de 15% para 18%, necessitando de maiores estudos para esclarecimentos dos motivos. Com relação às bolsas periodontais a clorexidina nanoencapsulada demonstrou maior efetividade do que a clorexidina disponível comercialmente, uma vez que demonstrou agir em bolsas periodontais com até 6mm de profundidade.

A clorexidina Nano foi a substância que apresentou menor média de sabor (4,5) dentre as substâncias empregadas neste estudo, isto provavelmente porque estava disponibilizada em sua fórmula pura, sem adição de substâncias para melhorar o sabor.

Portanto, a clorexidina nanoencapsulada demonstrou reduzir biofilme, não alterar a coloração dental, não elevar a frequência de micronúcleos e reduzir sangramento e bolsas periodontais com até 6mm, indicando que sua utilização na odontologia é promissora e pode contribuir para o tratamento das doenças periodontais na população.

REFERÊNCIAS

ABOU NEEL, A. et al. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 6371-6394, 2015.

AINAMO, J. et al. Development of the World Health Organization (WHO) Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN). **International Dental Journal**, v. 32, p. 281-91, 1982.

ANDRADE, M. G. S. et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 48, p.137-141, 2005.

BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às ciências sociais**. 9. ed. Santa Catarina: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. 320 p. ISBN: 9788532806666.

BLOCHING, M. et al. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. **Oral Oncology**, v. 44, n. 3, p. 220-6, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB2000**: condições de saúde bucal da população brasileira no ano de 2000: manual de calibração de examinadores. Brasília: Ministério da Saúde, 31p. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde Bucal. Normas e Manuais Técnicos. **Cadernos de Atenção Básica**, n. 17. Série A. 1 ed. (reimpressão). Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **SB Brasil 2010**. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados Principais. Distrito Federal, Brasília, 2012.

CAFIERO, C.; MATARASSO, S. Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: 'the 5Ps age' has already started. **The European Association for Predictive Preventive and Personalised Medicine Journal**, v. 4, n 1, p.1-29, 2013.

CARRANZA, Jr. et al. **Periodontia Clínica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 1164 p.

CHALUB, L. L. F.; AMÉDÉE PÉRET, A. C. Desempenho do índice periodontal comunitário (CPI) na determinação da condição periodontal: enfoque no exame parcial. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, v. 6, n. 3, p. 155-62, 2010.

CHATTERJEE, S. et al. Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: The micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 19, n. 6-7, p. 427–33, 2009.

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. Porto Alegre: **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 207-11, 2000.

DÓREA, L.T.M. **Danos Cromossômicos e Apoptose em células esfoliadas do epitélio bucal: associação do habito de fumar e as lesões pré malignas e malignas do epitélio oral**. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

DÜSMAN, E. et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p. 66-81, mai./ago. 2012.

EMANUELLI, Juliana. **Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo saquinavir planejadas para administração oral**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

FEITOSA, A. C. et al. Terapia anti-retroviral: fatores que interferem na Adesão de crianças com HIV/AIDS. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 515-21, 2008.

GEBRAN, M.P; GEBERT, A.P.P. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, Curitiba, n. 26, v. 3, p. 45- 58, jan. 2002.

HEDDLE, J. A. et al. A report os the environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HORTENSE, S. R. et al. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. **Revista de odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.

KERN, Ricardo. **Avaliação de micronúcleos em células epiteliais bucais de estudantes de odontologia**. 2006. Dissertação (Mestrado em Odontologia em Clínica Integrada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

KASHYAP, B.; REDDY, P. S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. v. 8, n. 2, p. 184–91, apr-jun 2012.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p.153-163, 2003.

LINDHE, J.; LANG, N. P; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1304p.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010, 1160 p.

MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, Recife, v. 6, n. 4, p. 124-131, out./dez. 2007.

McCULLOUGH, M. J.; FARAH, C. S. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. **Australian Dental Journal**, v. 53, n. 4, p. 302-305, 2008.

MEYER, A. C. A. et al. Avaliação clínica e microbiológica do uso de um creme dental contendo clorexidina a 1%. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 3, p. 255-260, 2007.

MONTEIRO NETO, Moacir de Azevedo Bentes. **Análise da frequência de aberrações cromossômicas em trabalhadores de curtumes de Franca-SP ocupacionalmente expostos a produtos químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Franca, São Paulo, 2007.

MORADI, Michael. **The impact of nanotechnology in drug delivery**: Global developments, market analysis and future projects, dec. 2004. Disponível em: https://www.pharmamanufacturing.com/assets/Media/MediaManager/NanoMarkets_Drug_Delivery_122004.pdf. Acesso em: 27 jul 2019.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2010.

MOREIRA, A. C. A. et al. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 7, n. 3, p. 266-272, set./dez. 2008.

NOVAIS, Anita Raquel dos Santos. **Micronúcleos das células esfoliadas da mucosa oral como potencial biomarcador oncológico**. Relatório de atividade clínica mestrado integrado

em medicina dentária. Universidade do Porto, 2014. Disponível em: https://sigarra.up.pt/ffup/pt/pub_geral.show_file?pi_doc_id=25584. Acesso em 27 jul. 2019.

OJEWOLE, E. et al Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 697-710, 2008.

OPPERMANN, R. V. Diagnóstico Clínico e Tratamento das Doenças Cárie e Periodontal. In: Mezzomo, Elio e Cols. **Reabilitação oral para o clínico**. 3. ed. São Paulo: Santos; 1994. cap. 2, p. 07-49.

PEGORARO, J. et al. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0,12%. **Journal of Oral Investigations**, v. 3, n. 1, p. 33-37, 2014.

PELÁEZ, M. A. C. et al. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral. Análisis crítico de la literatura. **Medicina y Patología Oral**, v. 9, p. 116-123, 2004.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers. Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REIS, S. R. A. et al. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 221-225, 2002.

Da ROCHA, Adriana Macedo da. **Eficácia do digluconato de clorexidina frente a suspensões de staphylococcus aureus em diferentes líquidos biológicos**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Bacharel em Química) - Centro Universitário La Salle, Unilasalle, Canoas, 2009.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1599-1607, 2000.

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 11-17, jan. 1987.

SCHMALTZ, C.; DOS SANTOS, J. V.; GUTERRES, S. S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v.16, n. 13-14, 2005.

SILVEIRA, J. L. G. C.; OLIVEIRA, V.; PADILHA, W. W. N. Avaliação da redução do índice de placa visível e do índice de sangramento gengival em uma prática de promoção de saúde bucal com crianças. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 2, p. 169-174, 2002.

SILVERMAN, Sol Jr.; WILDER, Rebecca. Antimicrobial mouthrinse as part of a comprehensive oral care regimen Safety and compliance factors. **Journal of the American Dental Association**, v. 137, nov. 2006.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SOUTO, R. et al. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos**, Goiânia, v. 37, n. ¾, p. 297-307, mar./abr. 2010.

SUHAS, S. et al. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 561, n. 1-2, p.15–21, 2004.

THOMAS, P. et al. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 69–76, 2011.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 69-77, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral Health Surveys: Basic Methods**. 4 ed. Geneva, 1997. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41905/9241544937.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 27 jul. 2019.

WILTGEN, A. **Investigação do potencial genotóxico de Anti-sépticos bucais *in situ***. 2007. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2007.

ZAMORA-PEREZ, A. L. et al. Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 255-260, 2013.

ZANATTA FB, RÖSING CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientifica**, v. 1, n. 2, p.35-43, 2007.

APÊNDICE A



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

O (a) sr (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a) do projeto de pesquisa “ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DE DIFERENTES FORMAS E CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA EM MICRORGANISMOS E CÉLULAS EPITELIAIS DA CAVIDADE ORAL”, pelos pesquisadores abaixo assinalados. Este estudo possibilitará verificar a atuação de diferentes formulações e concentrações de clorexidina sobre os microrganismos da boca, causadores de cárie e doença periodontal, bem como seus efeitos às estruturas celulares orais.

A pesquisa seguirá fielmente as normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde-CNS. Caso o (a) sr (a) participe será examinado (a) pela profissional que compõe o corpo do projeto com auxílio de espátula de madeira descartável, e jogos de instrumentais clínicos odontológicos esterilizados. O (A) sr (a) responderá a questionário e receberá uma solução para bochecho, a qual deverá realizar seguindo orientações da pesquisadora. Será realizada coleta do material bucal, antes e após utilização da substância para bochecho, com auxílio de swabs, cones de papel e escovinha citológica, estéreis, para análise em laboratório da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP. Os riscos serão próprios aos de um exame odontológico de rotina, como o estresse de atendimento e a ocorrência de bacteremia local e transitória (bactérias chegam até a corrente circulatória, mas o organismo consegue rapidamente destruir esta invasão), entretanto, não tem significado clínico em pessoas que não apresentam nenhuma condição de alteração sistêmica, havendo comprometimento deste estudo a dispor com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos; de acordo com o item III.1.b da resolução 466/2012 do CNS. Conforme o item V.1, da resolução nº 466/2012, do CNS, os riscos que consistem em desconforto ou possível constrangimento ao responder um questionário são considerados de dimensões mínimas. Portanto, os riscos serão mínimos de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, decorrentes dos procedimentos, de acordo com o item II.22 da resolução 466/2012 do CNS.

O exame pode se compor com fotografias da cavidade oral, as quais não implicarão em riscos biológicos ou de outra espécie, não identificando em nenhum momento o (a) participante conforme o item III.1.i da resolução 466/2012-CNS.

As observações serão anotadas em ficha odontológica adaptada e será preservado o sigilo e não identificação dos (as) examinados (as). A pesquisa tem benefícios diretos, pois, além do diagnóstico da situação clínica odontológica, receberá fornecida instrução sobre cuidados para manutenção de sua saúde bucal.

O (a) sr (a) poderá obter quaisquer esclarecimentos antes, durante ou após a realização da pesquisa bem como poderá não aceitar a sua participação ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo algum. Pela participação no estudo, o (a) sr (a) não receberá valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Após esclarecimento sobre a pesquisa e a participação voluntária, e havendo uma confirmação livre e espontânea para aceitar sua a participação, o (a) sr (a) deverá assinar o final deste documento, em duas vias. Uma das vias ficará em sua posse e a outra permanecerá com os pesquisadores responsáveis.

Termo de consentimento livre, após esclarecimento

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi o objetivo do estudo. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios da pesquisa. Entendi que sou livre para interromper a participação a qualquer momento, sem justificar a decisão. Sei que os nomes não serão divulgados, que não terei despesas e não receberei dinheiro pela participação. Autorizo a divulgação de imagens para fins científicos. Eu concordo e participar da pesquisa.

Assinatura do pesquisado
RG: _____ CPF: _____



Macapá, AP, ___de _____de 2018

Pesquisador Responsável (Orientador)
Prof. Dr. Moacir Monteiro Neto.
Universidade Federal do Amapá- UNIFAP
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde- PPGCS
Fone: (96) 981465449

Pesquisadora (Mestranda)
CD.Patrícia Ferreira Damasceno Isacksson
Universidade Federal do Amapá- UNIFAP
Programa de Pós Graduação em Ciências
da Saúde – PPGCS
Fone: (96) 991234943

Pesquisador (Co-Orientador)
Prof. Dr. Fernando Medeiros
Universidade Federal do Amapá- UNIFAP
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde- PPGCS

APÊNDICE B



Universidade Federal
do Amapá

GRUPO: _____ N° _____

ESTUDO SOBRE O EFEITO DE DIFERENTES FORMAS E CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA EM MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

QUESTIONÁRIO

- 1) Data: _____
- 2) Idade: _____ anos
Data de nascimento: _____
- 3) Sexo: _____
- 4) Nacionalidade: _____
- 5) Naturalidade: _____
- 6) Escolaridade:

Analfabeto:	<input type="checkbox"/>
Fundamental incompleto:	<input type="checkbox"/>
Fundamental completo:	<input type="checkbox"/>
Médio incompleto:	<input type="checkbox"/>
Médio completo:	<input type="checkbox"/>
Superior incompleto:	<input type="checkbox"/>
Superior completo:	<input type="checkbox"/>
- 7) Estado Civil:

Solteiro:	<input type="checkbox"/>
Casado:	<input type="checkbox"/>
Viúvo:	<input type="checkbox"/>
- 8) Número de filhos: _____
- 9) Ocupação: _____
- 10) Turno de trabalho (Manhã/ Tarde/ Noite): _____
- 11) Você é fumante? Sim Não Atualmente Não

Se não:

Há quanto tempo parou de fumar? _____ (anos) _____ (meses)
 Se nunca fumou vá para a questão 12

Se sim:

- a- Durante quanto tempo? _____ (anos) _____ (meses)
 b- Você fuma cigarros? Sim Não
 c- Você fuma quantos cigarros ao dia?

Menos de meio maço
 De meio a um maço
 De 1 a 2 maços
 Mais de 2 maços

d- Você fuma charutos? Sim Não
 Quantos ao dia? _____

f- Você fuma cigarros de palha? Sim Não
 Quantos ao dia? _____

- 12) Você consome bebida alcóolica? Sim Não
 Se nunca utilizou bebida alcóolica vá para a questão 13

Se sim:

- a- Durante quanto tempo? _____ (anos) _____ (meses)
 b- Você consome bebida alcóolica atualmente? Sim Não

- 13) Você já foi ao dentista? Sim Não
 Se nunca consultou um dentista vá para a questão 14

Se sim:

- a- Há quanto tempo foi sua última consulta? _____
 b- Você já consultou com um periodontista? Sim Não
 c- Você costuma ter sangramento gengival? _____
 d- Qual a frequência com que você visita seu dentista? _____

- 14) Você já recebeu orientação quanto à escovação? Sim Não

Se sim:

- a- Qual sua frequência de escovação diária? _____
 b- Você troca sua escova dental a cada quanto tempo? _____

- c- Você costuma utilizar escova dental com cerdas:

Extra macias
 Macias
 Médias
 Duras

- d- Você utiliza fio dental? Sim Não
- e- Você realiza bochechos com enxaguante bucal? Sim Não
Qual? _____
- f- Você utiliza algum outro método para higiene oral? Sim Não
Qual? _____

15) Se você já recebeu orientação sobre alimentação para manutenção da saúde oral:

- a- Você costuma consumir alimentos açucarados? Sim Não
- b- Você costuma comer bombons? Sim Não
- c- Você consome refrigerante? Sim Não
Se sim, qual frequência? _____
- d- Você consome café? Sim Não
Se sim, qual frequência? _____

APÊNDICE C

Universidade Federal
do Amapá

GRUPO: _____ Nº _____

**ESTUDO SOBRE O EFEITO DE DIFERENTES FORMAS E CONCENTRAÇÕES DE
CLOREXIDINA EM MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL**

QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO FINAL

1. Você observou alguma alteração na mucosa bucal (gengiva) durante o período de participação no estudo?

Sim Não
Qual (s)?

2. Você sentiu, durante a participação na pesquisa, alguma alteração no sabor dos alimentos?

Sim Não
Qual (s)?

3. Em escala de 0 a 10, qual valor você atribui ao sabor do produto o qual você utilizou para bochecho? _____

4. Você percebeu alguma alteração de cor nos seus dentes?

Sim Não

5. Você considera que houve surgimento ou aumento dos depósitos calcificados acima da gengiva (tártaros)?

Sim Não

APÊNDICE D



GRUPO: _____ Nº _____

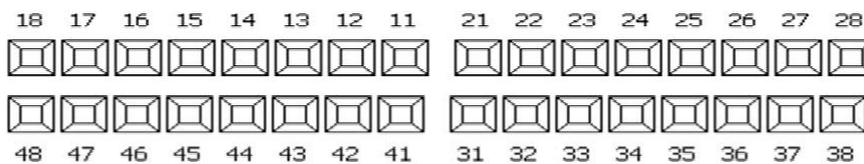
ESTUDO SOBRE O EFEITO DE DIFERENTES FORMAS E CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA EM MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

❖ Ficha para levantamento Periodontal

Avaliação Inicial

DATA: ____/____/____

• **Índice de Biofilme Visível – IBV**



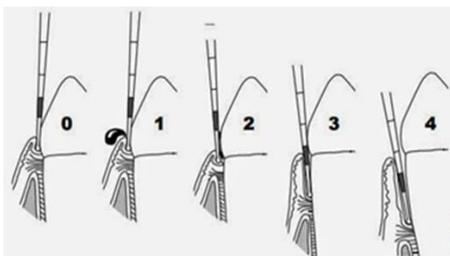
-Deve ser realizado apenas com o espelho.
 -Superfície deve estar seca, com auxílio de seringa tríplice e isolamento relativo.
 -Devem-se pintar as regiões que apresentam presença de placa.

Índice de placa _____ %

• **Índice Periodontal Comunitário (IPC/ CPI)**



- ✓ Se nenhum dos dentes índices estiver presente, examinar todos os dentes do sextante.
- ✓ Apenas 6 anotações são feitas: uma por sextante, relativa a pior situação encontrada.
- ✓ Quando não houver no sextante pelo menos dois dentes remanescentes, cancelar com um “X”.
- ✓ Para pacientes com menos de 20 anos não considerar 17, 27, 37 e 47.



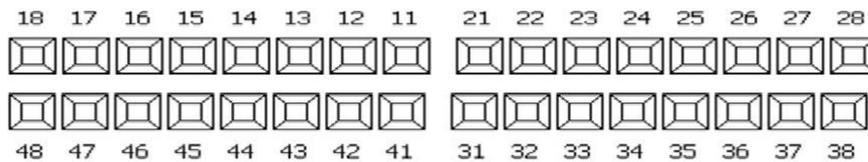
0= sextante hígido
 1=sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem).
 2= cálculo (qualquer quantidade)
 3= bolsa de 4 a 5 mm (margem gengival na área preta da sonda)
 4= bolsa de 6 mm ou mais (área preta da sonda não visível)

Cor dos elementos dentais iniciais iniciais: _____

☐ **Avaliação Final**

DATA: ____/____/____

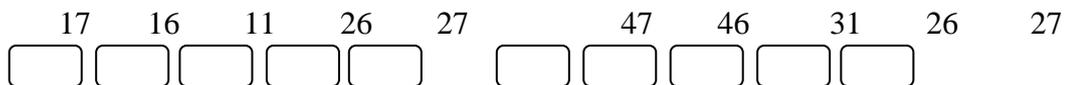
• **Índice de Biofilme Visível – IBV**



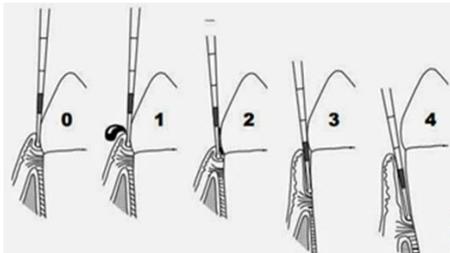
-Deve ser realizado apenas com o espelho.
 -Superfície deve estar seca, com auxílio de seringa tríplice e isolamento relativo.
 -Devem-se pintar as regiões que apresentam presença de

Índice de placa _____%

• **Índice Periodontal Comunitário (IPC/ CPI)**



- ✓ Se nenhum dos dentes índices estiver presente, examinar todos os dentes do sextante.
- ✓ Apenas 6 anotações são feitas: uma por sextante, relativa a pior situação encontrada.
- ✓ Quando não houver no sextante pelo menos dois dentes remanescentes, cancelar com um "X".
- ✓ Para pacientes com menos de 20 anos não considerar 17, 27, 37 e 47.



0= sextante hígido
 1=sextante com sangramento (observado diretamente ou com espelho, após sondagem).
 2= cálculo (qualquer quantidade)
 3= bolsa de 4 a 5 mm (margem gengival na área preta da sonda)
 4= bolsa de 6 mm ou mais (área preta da sonda não visível)

Cor dos elementos dentais finais: _____

APÊNDICE E



Universidade Federal do Amapá

GRUPO: _____ Nº _____

ESTUDO SOBRE O EFEITO DE DIFERENTES FORMAS E CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA EM MICROORGANISMOS DA CAVIDADE ORAL

• **PERIOGRAMA INICIAL**

DATA: ____/____/____

DENTE		18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28						
FACE		D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	
V	bolsa																						
	reces.																						
P	bolsa																						
	reces.																						

MOBILIDADE																	
FURCA																	

DENTE		48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38						
FACE		D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	
V	bolsa																						
	reces.																						
L	bolsa																						
	reces.																						

MOBILIDADE																	
FURCA																	

✓ Valores acima de 3 mm assinalar em vermelho

Observações:

• **PERIOGRAMA FINAL**

DATA: ____ / ____ / ____

DENTE	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		
FACE	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M
V	bolsa																	
	reces.																	
P	bolsa																	
	reces.																	

MOBILIDADE																		
FURCA																		

DENTE	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		
FACE	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M	D	C	M
V	bolsa																	
	reces.																	
L	bolsa																	
	reces.																	

MOBILIDADE																		
FURCA																		

✓ Valores acima de 3 mm assinalar em vermelho

Observações: _____

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAPÁ - UNIFAP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo sobre os efeitos de diferentes formas e concentrações de clorexidina em microrganismos e células epiteliais da cavidade oral

Pesquisador: Patrícia Ferreira Damasceno Isacksson

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 89613018.1.0000.0003

Instituição Proponente: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.900.823

Apresentação do Projeto:

Conforme o parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos deste estudo serão próprios aos de um exame odontológico de rotina, como o estresse de atendimento e a ocorrência de bacteremia local e transitória após a sondagem da bolsa periodontal, entretanto, quando ocorre proveniente de manipulações dentárias esta bacteremia é transitória e não tem significado clínico em indivíduos normais, ou seja, que não apresentam nenhuma condição de alteração sistêmica. Neste estudo não serão incluídos pessoas que apresentem qualquer alteração sistêmica. Apesar disto, entretanto, estes riscos serão mínimos, de dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano conforme o item II.22 da resolução 486/2012 do CNS, decorrentes dos procedimentos realizados na clínica odontológica, durante o atendimento de rotina, sendo, a todo o momento, ponderados ao paciente os riscos e

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade **CEP:** 68.902-280
UF: AP **Município:** MACAPA
Telefone: (96)4009-2805 **Fax:** (96)4009-2804 **E-mail:** cep@unifap.br

Continuação do Parecer: 2.600.823

benefícios, tanto conhecidos como potenciais, individuais ou coletivos, havendo comprometimento deste estudo a dispor com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos; de acordo com o item III.1.b da resolução 466/2012 do CNS. Ainda conforme o item V.1, da resolução nº

466/2012, do CNS, os riscos que consistem em desconforto ou possível constrangimento que possa ocorrer ao responder um questionário são considerados de dimensões mínimas.

O registro do exame bucal será mecânico escrito e visual, através do uso de imagem digital. Portanto, o estudo seguirá o protocolo fotográfico

padrão em odontologia legal (SILVA, 1997), limitando-se a fotografias da cavidade oral, não identificando em nenhum momento o (a) participante,

preservando, portanto, a identidade individual, conforme o item III.2.i da resolução 466/2012 CNS, não implicando em risco biológico ou de outra

espécie, sendo parte do exame odontológico. Será utilizada uma mesma câmera digital para todos os registros fotográficos: Câmera Digital

Samsung Lens 10.2MP 3x Zoom 6.3 Video.

As fotografias serão utilizadas apenas como registros visuais no que tange os indícios de presença de infecção ou alteração nas estruturas da cavidade oral e como registro do protocolo de coleta e cultura de microrganismos e células epiteliais.

Benefícios:

Os benefícios são maiores comparados aos riscos, uma vez que o estudo trará benefícios diretos ao (a) pesquisado (a) mediante o diagnóstico da

situação clínica odontológica atual, orientação sobre higiene oral, condição de cárie, placa bacteriana e doença periodontal. Além de possibilitar que

a população seja alcançada pelos resultados finais da pesquisa, pois colaborará para o surgimento de novos estudos acerca do tema, podendo

contribuir ainda a médio ou longo prazo à diminuição dos índices de SLOMAN e periodontais da população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e exequível

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados de acordo com a resolução 466/2012

Endereço: Rodovia Juscelino Kublitschek de Oliveira - Km.02
 Bairro: Bairro Universidade CEP: 68.902-280
 UF: AP Município: MACAPA
 Telefone: (96)4009-2805 Fax: (96)4009-2804 E-mail: cep@unifap.br

Continuação do Parecer: 2.000.023

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO_1087138.pdf	08/09/2018 23:57:13		Acelto
Outros	Outros_questionarios.pdf	08/09/2018 23:41:20	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Outros	OUTROS____.pdf	08/09/2018 23:23:40	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao.bmp	08/09/2018 23:21:40	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Outros	OUTROS.pdf	08/09/2018 23:18:47	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Outros	OUTROS_.jpg	08/09/2018 23:14:00	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Outros	OUTROS.jpg	08/09/2018 23:13:05	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Outros	Outros_.jpg	08/09/2018 23:12:26	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	08/09/2018 19:49:51	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCE.pdf	08/09/2018 19:42:34	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	17/04/2018 20:48:59	Patricia Ferreira Damasceno Isackson	Acelto

Endereço: Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira - Km.02
 Bairro: Bairro Universidade CEP: 68.902-280
 UF: AP Município: MACAPÁ
 Telefone: (96)4009-2805 Fax: (96)4009-2804 E-mail: cep@unifap.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAPÁ - UNIFAP



Continuação do Parecer: 2.950.823

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MACAPA, 18 de Setembro de 2018

Assinado por:

RAPHAELLE SOUSA BORGES
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira - Km.02
Bairro: Bairro Universidade **CEP:** 68.902-280
UF: AP **Município:** MACAPA
Telefone: (96)4009-2905 **Fax:** (96)4009-2804 **E-mail:** cnp@unifap.br