

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANA CAMA RAMACCIATO

CIRURGIÃ - DENTISTA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES À BASE DE
ALHO (*Allium sativum*), ÓLEO DE MELALEUCA
(*Melaleuca alternifolia*) E CLOREXIDINA SOBRE
MICROORGANISMOS TOTAIS E ESTREPTOCOCOS
DO GRUPO *MUTANS*. ESTUDO *IN VIVO*.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Odontologia - Área de
Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

PIRACICABA - SP

2000

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANA CAMA RAMACCIATO

CIRURGIÃ - DENTISTA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES À BASE DE
ALHO (*Allium sativum*), ÓLEO DE MELALEUCA
(*Melaleuca alternifolia*) E CLOREXIDINA SOBRE
MICRORGANISMOS TOTAIS E ESTREPTOCOCOS
DO GRUPO *MUTANS*. ESTUDO *IN VIVO*.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Banca examinadora: Prof. Dr. Antonio Carlos Pereira

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol

PIRACICABA - SP

2000

DEDICATÓRIA

A DEUS, POR ILUMINAR MINHA VIDA;

A meus queridos pais ANTONIO E MÁRCIA que me deram todas as oportunidades e incentivo para crescer no caminho certo;

Ao meu irmão RICARDO e aos meus familiares pelo incentivo e confiança;

Ao meu noivo LEANDRO pela paciência, amor, ajuda, companhia e estímulo;

Ao OTTO pelo carinho e companhia

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, por meio do Reitor:
HERMANO DE MEDEIROS FERREIRA TAVARES;

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP-UNICAMP),
por meio do diretor: ANTÔNIO WILSON SALLUM;

Ao Departamento de ciências Fisiológicas da FOP, por meio de seu
Chefe de Departamento: MARIA CRISTINA VOLPATO;

À coordenação Geral dos cursos de Pós-Graduação de FOP, por meio
de sua coordenadora: ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY;

À coordenação do programa de pós-graduação em odontologia, por
meio de seu coordenador: PEDRO LUIZ ROSALEN;

A FRANCISCO CARLOS GROPPPO, meu orientador, minha enorme gratidão e admiração, pela participação direta e ajuda irrestrita neste trabalho, pelo seu exemplo de caráter, incentivo, amizade e por me impulsionar nesta carreira;

Aos DOCENTES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA, ANESTESIOLOGIA E TERAPÊUTICA DA FOP - UNICAMP: EDUARDO DIAS DE ANDRADE, JOSÉ RANALI, MARIA CRISTINA VOLPATO, PEDRO LUIZ ROSALEN E THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, pela formação profissional e pessoal, pela amizade e incentivo;

Às amigas FLÁVIA e YNARA por me acolherem, pela convivência, por todas as aventuras juntas, por toda ajuda incondicional, pelos bons e maus momentos e pela verdadeira amizade.

Ao meu amigo GUTO, pelos momentos de descontração nas horas difíceis e pelo companheirismo;

À amiga ALINE, pela amizade sempre demonstrada e aos meus companheiros de pós-graduação ROBERTA, RODRIGO, REGINA, FERNANDA, ROSANA e LUCIANE, por tudo que vivemos juntos e por muitas vezes me ajudarem nas fases laboratoriais;

A Srta. MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica pela amizade e por sua eficiência que torna tudo mais fácil;

Ao Srs. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, técnico do Laboratório de Farmacologia, pelo auxílio na fase experimental;

A ADILSON, MARILI e VERA do CPQBA-UNICAMP pela análise cromatográfica dos compostos utilizados neste trabalho e por tudo que nos ensinaram;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho;

À ÉRICA ALESSANDRA PINHO e SÔNIA MARIA LORDELLO, secretárias da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP - UNICAMP, pelo profissionalismo e ajuda prestada;

A todos os meus VOLUNTÁRIOS que tornaram possível este trabalho;

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram para que este trabalho fosse realizado;

SUMÁRIO

	página
1. LISTAS	2
1.1. LISTA DE ILUSTRAÇÕES	2
1.2. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
2. RESUMO	5
3. ABSTRACT	7
4. INTRODUÇÃO	9
5. REVISÃO DA LITERATURA	11
5.1. CLOREXIDINA	11
5.2. O ALHO (<i>Allium sativum</i>)	17
5.3. <i>Melaleuca alternifolia</i>	19
6. PROPOSIÇÃO	24
7. MATERIAL E MÉTODO	25
7.1. MATERIAL	25
7.1.1. MEIOS DE CULTURA	25
7.2. MÉTODO	26
7.2.1. SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS	26
7.2.2. SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA	28
7.2.3. PRIMEIRA SEMANA – VALORES BASAIS	29
7.2.4. SEGUNDA SEMANA – SOLUÇÃO CONTROLE	29
7.2.5. TERCEIRA SEMANA – SOLUÇÕES TESTE	31
7.2.6. QUARTA E QUINTA SEMANAS – RETORNO AOS VALORES BASAIS	34
7.2.7. QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	35
7.2.8. MEDIÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS	37
7.2.9. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
8. RESULTADOS	40
9. DISCUSSÃO	50
10. CONCLUSÃO	56
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
12. ANEXOS	67
12.1. ANEXO 01 – COMITÊ DE ÉTICA	67
12.2. ANEXO 02 – TERMO DE CONSENTIMENTO	68
12.3. ANEXO 03 – INSTRUÇÕES	79
12.4. ANEXO 04 – QUESTIONÁRIO	80
12.5. ANEXO 05 – TABELA 3	81
12.6. ANEXO 06 – TABELA 4	82
12.7. ANEXO 07 – TABELA 5	83
12.8. ANEXO 08 – TABELA 6	84

1. LISTAS

1.1. Lista das ilustrações

	página
Figura 1	28
Distribuição do período de tempo com relação a procedimentos realizados	
Figura 2	36
Esquema da metodologia de colheita	
Figura 3	40
Cromatograma do óleo de melaleuca	
Figura 4	41
Cromatograma do extrato aquoso de alho	
Gráfico 1	42
Médias de redução de estreptococos do grupo mutans	
Gráfico 2	43
Médias (\pm epm) de ufc de <i>S. mutans</i> sp./mL do grupo da clorexidina	
Gráfico 3	43
Médias (\pm epm) de ufc de <i>S. mutans</i> sp./mL do grupo do alho	
Gráfico 4	44
Médias (\pm epm) de ufc de <i>S. mutans</i> sp./mL do grupo da melaleuca	
Gráfico 5	45
Médias de redução de microrganismos totais	
Gráfico 6	46
Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais/mL do grupo da clorexidina	
Gráfico 7	46
Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais/mL do grupo do alho	

LISTAS

Gráfico 8	Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais /mL do grupo da melaleuca	47
Gráfico 9	Percentagens dos efeitos colaterais com o uso da solução controle	48
Gráfico 10	Percentagem de alteração de cor	48
Gráfico 11	Percentagem de alteração no hálito	48
Gráfico 12	Percentagem de ardência	48
Gráfico 13	Percentagem de gosto desagradável	48
Gráfico 14	Percentagem de efeitos sistêmicos	48
Tabela 1	Relação dos constituintes do óleo de melaleuca	40
Tabela 2	Relação dos constituintes do extrato de alho	41
Tabela 3	Médias de ufc de estreptococos/mL	81
Tabela 4	Médias de ufc de microrganismos totais/mL	82
Tabela 5	Dados obtidos com a aplicação de questionário	83
Tabela 6	Percentagem de redução com o uso das 3 soluções	84

1.2. Lista de abreviaturas e siglas

%	por cento
&	e
±	mais ou menos
<	menor
>	maior
=	igual
OMS	Organização Mundial da Saúde
ATCC	American Type Culture Collection (coleção de culturas padrão americana)
spp.	espécies de microrganismos
epm	erro padrão da média
CBM	concentração bactericida mínima
CIM	concentração inibitória mínima
MSB	ágar Mitis Salivarius com bacitracina
et al.	e outros
°C	graus Celsius
CO ₂	dióxido de carbono
h	hora
min	minuto
s	segundo
g	grama
mg	miligrama
ml	mililitro
µL	microlitro
ppm	partes por milhão
cm	centímetro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
u.f.c./µL	unidades formadoras de colônias por microlitro
u.f.c./ml	unidades formadoras de colônias por mililitro
ml/min	mililitros por minuto
mg/ml	miligramas por mililitro
U/l	unidades por litro
± epm	± erro padrão da média

2. RESUMO

A microbiota oral, em particular os estreptococos do grupo mutans, está intimamente relacionada à formação do biofilme bacteriano e das doenças dele decorrentes. Uma redução do número destes microrganismos implica, portanto, em prevenção e controle destas doenças. Neste trabalho foram testadas três soluções: clorexidina a 0,12% (controle positivo) e soluções aquosas de alho (*Allium sativum*) a 2,5% e óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) a 0,2%. Trinta voluntários sadios foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com a solução em teste. Amostras de saliva foram colhidas, diluídas e inoculadas (5µL) em placas contendo ágar sangue e MSB. Todas as placas foram incubadas sob atmosfera de 10% CO₂ por 48 horas. Em seguida, as placas de agar sangue foram incubadas sob condições de aerobiose por mais 24 horas. Após estes procedimentos foram obtidos os números de unidades formadoras de colônias de microrganismos totais e do grupo mutans, considerando os valores iniciais (sem a utilização das soluções), com o uso das soluções controle (apenas o veículo das soluções), com o uso das soluções em teste e uma e duas semanas após os tratamentos. O grau de desconforto e possíveis efeitos colaterais das soluções foram avaliados através de um questionário. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa, em nível de 5%, no efeito de redução entre as três soluções testadas tanto sobre microrganismos totais (clorexidina 30,3%, óleo de melaleuca 39,8% e

RESUMO

solução de alho 25,4%) como para estreptococos do grupo mutans (clorexidina 51,6%, óleo de melaleuca 47,3% e solução de alho 51,5%). A redução do número de microrganismos nas duas semanas subseqüentes ao uso das soluções foi observada somente com uso das soluções de alho e óleo de melaleuca. O maior grau de desconforto foi proporcionado pela solução de alho a 2,5%. Os desconfortos relatados foram (em % do total de respostas): gosto ruim (clorexidina 40%, melaleuca 30%, alho 100%), ardência (clorexidina 40%, melaleuca 60%, alho 100%), mau hálito (clorexidina 40%, melaleuca 20%, alho 90%) e náusea (clorexidina 0%, melaleuca 10%, alho 30%). Desta forma, foi possível concluir que, embora a solução de alho tenha apresentado efeitos indesejáveis, esta solução bem como a de óleo de melaleuca podem ser utilizadas como alternativa a clorexidina.

PALAVRAS-CHAVE: clorexidina, Alho, óleo essencial, anti-sépticos orais, antibacterianos.

3. ABSTRACT

The oral microbiota has a strong relationship with plaque formation and dental caries. Therefore, a reduction in the number of oral microorganisms is important to prevent oral diseases. A five-week study was carried out with thirty subjects. The first week was considered base-line; in the second week a placebo mouthrinse was used by all of the subjects, and in the third week they were randomly divided into three groups. Clorhexidine 0.12% mouthrinse was used as positive control for the first group, 2.5% garlic (*Allium sativum*) mouthrinse for the second one, and 0.2% tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) mouthrinse for the third one. Two saliva samples were collected during this period and in the following two weeks (post-treatment). Five microliters were inoculated on plates containing blood agar and MSB. All the plates were incubated under 10% CO₂ conditions for 48 hours. After this period, blood agar plates were incubated under aerobiosis condition for 24 hours. Total microorganisms and mutans streptococci were counted. The results did not show significant differences among the tested solutions in the reduction of total microorganisms (clorhexidine 37.2%, *M. alternifolia* 41%, garlic 30.6%) and in the reduction of mutans streptococci (clorhexidine 68.4%, *M. alternifolia* 63.6%, garlic 53.5%). Lower levels of microorganisms in the post-treatment period were observed only when garlic and *M. alternifolia* solutions were used. The related discomforts were (in % of total

ABSTRACT

answer) unpleasant taste (clorhexidine 40%, *M. alternifolia* 30%, garlic 100%), ardency (clorhexidine 40%, *M. alternifolia* 60%, garlic 100%), bad breath (clorhexidine 40%, *M. alternifolia* 20%, garlic 90%) and nausea (clorhexidine 0%, *M. alternifolia* 10%, garlic 30%). It was concluded that garlic and *M. alternifolia* could be used as alternatives to clorhexidine, in spite of the related discomforts.

KEY-WORDS: Clorhexidine, tea tree oil, garlic, antiseptic, essential oil.

4. INTRODUÇÃO

O uso de fitoterápicos tem sido muito mais difundido e pesquisado em Medicina do que sobre outras áreas de saúde, como a Odontologia. Entretanto, atualmente tem se observado uma crescente demanda comercial destes produtos. É provável que muitas das propriedades verificadas em pesquisas de cunho médico pudessem também ser aplicadas à Odontologia. Muitos fitoterápicos podem exercer, por exemplo, inibição no crescimento ou desenvolvimento de bactérias que fazem parte do biofilme dentário humano.

Segundo a OMS, 80% da população mundial usa a medicina popular, principalmente através do uso de plantas medicinais, para suprir as necessidades de assistência médica primária (ELISABETSKY, 1987).

Cerca de 74% das 119 drogas desenvolvidas a partir de plantas até 1985, foram obtidas através de estudos que avaliavam o uso popular de espécies bem conhecidas (FARNSWORTH, 1985; ELISABETSKY, 1987).

Uma análise feita no sistema "MEDLINE" em 1997, usando como palavra-chave "medicinal" e "plant", revelou que, em 30 anos, foram publicados 13.339 trabalhos (SOUCCAR & LAPA, 1997). Em novembro de 1999, em repetindo-se este procedimento, encontrar-se-ia 16.352 artigos, ou seja, um crescimento de 22% em dois anos. Deste último total, 299 artigos são ligados às propriedades

INTRODUÇÃO

antimicrobianas, sendo 40 deles publicados em 1998 e 1999, o que revela um aumento crescente por fitoterápicos com propriedades antimicrobianas.

Novos produtos, com a finalidade de reduzir o número de bactérias que colonizam a cavidade oral são colocados no mercado a cada dia. A maior parte deles é derivada de uma substância: a clorexidina. Reconhecida, tanto pela sua eficácia, quanto por seus efeitos adversos (BOWDEN, 1996).

Alguns agentes fitoterápicos têm como característica algumas das vantagens da clorexidina, tais como seu poder antimicrobiano. A utilização deles poderia contribuir de maneira incisiva no tratamento e prevenção das patologias orais, como a cárie e a doença periodontal.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. CLOREXIDINA

Os estreptococos do grupo mutans, particularmente o *S. mutans* e o *S. sobrinus*, são associados com cárie dentária humana (GIBBONS & van HOUTE, 1975; LOESCHE et al., 1975; DASANAYAKE et al., 1995; BOWDEN, 1996). Juntamente com os *Lactobacillus* spp., eles são considerados como odontopatógenos significantes. Devido a sua associação com a cárie, uma avaliação do número destes estreptococos no biofilme dentário e na saliva pode ser útil como auxiliar no diagnóstico da atividade da doença. Em conjunto com este conceito, o controle e prevenção de cáries têm sido relacionados a uma redução do número de bactérias que colonizam a cavidade oral de um indivíduo (ZICKERT et al., 1982; ZICKERT et al., 1983; GISSELSSON et al., 1988; LINDQUIST et al., 1989; ISOKANGAS et al., 1991; BOWDEN, 1996).

Um dos principais métodos de quantificação destas bactérias é realizado em amostras de saliva estimulada colhidas de voluntários que se submetem a algum tratamento (DASANAYAKE et al., 1995). Este procedimento é justificado pela relação direta entre o número de estreptococos na saliva e o número de sítios intra-orais colonizados (TOGELIUS et al., 1984; DASANAYAKE et al., 1995).

Desta forma, um controle apropriado do biofilme bacteriano é o fator chave para a prevenção das doenças dentais (LÖDAL et al., 1961; SUOMI et al., 1971; AXELSSON et al., 1991).

A remoção mecânica do biofilme bacteriano por escovação, utilizando-se dentifrícios é a forma mais comum de controle de cárie dentária no mundo desenvolvido (FRANSEN, 1986). Entretanto, os pacientes têm dificuldade em manter um nível aceitável de higiene oral, o qual é dificilmente atingido pelo método mecânico e, por isso, agentes antimicrobianos estão sendo incorporados em soluções para bochecho e dentifrícios, como suplementos a higienização tradicional (LINDHE et al., 1984; RAMBERG et al., 1992; OWENS, 1997).

Os enxagüatórios orais devem ser considerados como coadjuvantes na higiene oral sendo utilizados antes ou após a escovação (OWENS et al, 1997).

Muito destes agentes vêm sendo estudados com o objetivo de reduzir os níveis de estreptococos orais. A clorexidina é um dos mais seguros e efetivos (PUCHER & DANIEL, 1992; JENKINS et al., 1993; RENTON-HARPER et al., 1996; HILDEBRANDT, 1996). Seu uso como substituto da escovação ocorre exclusivamente quando a limpeza mecânica é muito difícil ou impossível (ADDY,1986).

A clorexidina é quimicamente uma bisguanida catiônica, sendo mais estável na forma de sal (FARDAL & TURNBULL, 1986). O mecanismo de ação da

clorexidina que resulta em efeito antimicrobiano começa com sua adsorção na superfície da célula bacteriana, provocando pequenas rupturas na membrana citoplasmática, o que afeta a permeabilidade celular e permite que a droga entre na célula precipitando seu citoplasma (HENNESSEY, 1973). Devido ao caráter catiônico a clorexidina tem forte afinidade por ânions, tais como os íons fosfato da parede celular da microbiota oral que normalmente coloniza as superfícies dentais (HUGO & LONGWORTH, 1966) reduzindo, assim, a habilidade de aderência e colonização das superfícies dentais. Provavelmente, este é o efeito antiplaca mais significativa da clorexidina (AXELSSON, 1993).

A clorexidina tem mostrado efeito bactericida contra cepas gram-positivas e negativas, fungos e leveduras, aeróbicas facultativas e anaeróbicas (EMILSON, 1977). Apesar de ser um agente antimicrobiano de largo espectro, os estreptococos do grupo mutans são mais fortemente afetados que os outros membros da microbiota oral (EMILSON, 1977; MALTZ-TURKIENICZ et al., 1980; SCHAEKEN et al., 1984).

A concentração mínima das soluções à base de clorexidina que produz inibição bacteriana é 0,12%. Concentrações inferiores falham em reduzir a contagem de mutans na saliva (CLARK & GUEST, 1994).

NETUSCHIL et al. (1989) observaram uma redução de 22 a 40% no número de microrganismos viáveis no biofilme bacteriano após 1 hora de um

bochecho com clorexidina a 0,1%. Entre 6 e 8 horas o número de microrganismos havia voltado aos patamares originais.

CLARK & GUEST (1994) mostraram redução significativa (mais de 10 vezes o número inicial) de *S. mutans* e lactobacilos, em pacientes idosos submetidos a bochechos únicos, diários, de clorexidina a 0,12%. Os autores observam que a utilização de um bochecho diário poderia ser suficiente para promover baixos níveis de microrganismos dentro da cavidade oral.

Após 3 dias de bochechos diários com clorexidina 0,2% foi observado que houve redução de mais de 99,99% das células viáveis/mm² com relação ao controle, sendo que o composto fenólico Listerine[®] produziu redução de 97%. O número de bactérias totais foi 99% e 80% menor, com relação ao controle, para a clorexidina e Listerine[®], respectivamente (NETUSCHIL et al., 1995).

Um fato raramente considerado é a possibilidade de interações entre os componentes dos enxagüatórios e do dentifrício utilizado na escovação (BARKVOLL et al., 1988; BARKVOLL et al., 1989).

O lauril sulfato de sódio (LSS) é um dos detergentes sintéticos mais utilizados em dentifrícios (WELLS & LUBOWE, 1964; GRAMLING, 1971), com concentração variando de 0,5% a 2,0% (BARKVOLL et al., 1989). Este detergente e a clorexidina não são compatíveis em solução aquosa (BONESVOLL, 1977), pois, sendo a última um composto catiônico, formará sais de baixa solubilidade com

ânions como sulfatos, fosfatos e carboxilas (KIRKEGAARD et al., 1974; RØLLA et al., 1970; RØLLA & MELSEN, 1975; BARKVOLL et al., 1988). O efeito antimicrobiano apresenta-se reduzido em suspensões contendo ambos (BARKVOLL et al., 1989).

O intervalo recomendado entre a escovação com dentifrício contendo LSS e um bochecho com clorexidina, deve ser superior a 30 minutos ou preferencialmente próximo de 2 horas após a escovação (BARKVOLL et al., 1989).

O monofluorofosfato de sódio (MFP) é uma forma de flúor comumente utilizada em dentifrícios e que também interage com a clorexidina formando sais de baixa solubilidade e diminuindo assim a ação de ambos. A clorexidina e o monofluorofosfato de sódio, em concentrações clinicamente relevantes, não são compatíveis (BARKVOLL et al., 1988).

Entretanto, o fluoreto de sódio (NaF) é compatível com a clorexidina e podem ser utilizados em conjunto sem prejuízo da atividade de ambos (CURY et al., 1994). Quando combinados, a clorexidina e o fluoreto de sódio apresentam efeito tóxico sinérgico no citoplasma bacteriano e nas enzimas responsáveis pela fermentação de carboidratos, diminuindo a formação de ácido pelos microrganismos (LUOMA, 1972; McDERMID et al., 1985; MEURMAN, 1988).

O uso clínico da clorexidina pode ocasionar efeitos colaterais (GREENSTEIN et al., 1986). O manchamento dentário é bem documentado e,

provavelmente, o mais problemático efeito adverso do uso destes produtos orais (NORDBO, 1971; PRAYITNO & ADDY, 1979). Não há dúvidas que estes anti-sépticos catiônicos podem precipitar ou ligar-se a superfícies aniônicas cromogênicas contidas em alimentos e bebidas (JENKINS et al., 1993; LEARD & ADDY, 1997), que podem provocar ou aumentar as manchas.

Outros efeitos colaterais, como gosto desagradável e alterações de paladar ou até mesmo a inflamação gengival, apresentam-se como desconfortos também relatados (BOWDEN, 1996).

Além de seu uso como anti-séptico oral a clorexidina também é extensamente utilizada com o mesmo fim em feridas. Entretanto, apesar de uma solução a 0,002% desta droga, mostrar mínima citotoxicidade, ela é capaz de suprimir a divisão celular humana quase completamente, afetando também a contração do colágeno e a síntese protéica total. Isto significa que, embora tida como anti-séptico seguro, a clorexidina poderia atrapalhar o processo de reparo em feridas (PUCHER & DANIEL, 1992).

5.2. O ALHO (*Allium sativum*)

A utilização de substâncias naturais no tratamento das mais diversas patologias é antiga e vem reflorescendo com grande força no presente. Um estudo conduzido por FRATE et al. (1996) mostrou que mais de 70% da população de uma região central do Mississippi, fez uso de pelo menos uma “planta medicinal” em 1995. Dentre elas, uma das mais utilizadas era o alho.

O alho é um alimento utilizado como fitoterápico, sendo mencionado em 1500 a.C. em uma receita egípcia, o *Papyrus Ebers* (BIEDERMANN, 1995). É conhecido por suas propriedades medicinais desde tempos remotos, sendo utilizado popularmente para uma grande variedade de problemas, desde picadas de cobras até doenças da pele (VENUGOPAL & VENUGOPAL, 1995). Pesquisas têm sido desenvolvidas buscando aplicações práticas desta substância, calcadas em sua capacidade de inibição de crescimento e lise bacteriana, sendo que seus maiores componentes inibitórios, a alicina e tiosulfonatos, já foram definidos (GONZÁLES-FANDOS et al., 1994).

Um estudo comparativo entre a ação de um extrato de alho puro (0,5g/mL) e cloridrato de tetraciclina (0,4mg/mL), em concentrações tidas como equivalentes, sobre bactérias do ceco humano, mostrou que o alho foi mais efetivo como agente antimicrobiano (SHASHIKANTH et al., 1984).

Sobre *Candida albicans*, um fungo oral oportunista, o efeito de um extrato aquoso de alho mostrou inibição da síntese de proteínas, de ácidos nucléicos e de lipídios do fungo, traduzindo-se em um potente efeito fungicida (ADETUMBI et al., 1986).

VENUGOPAL & VENUGOPAL, em 1995, observaram a ação do alho em 88 dermatófitos isolados da pele humana, através da técnica de diluição em ágar. Os resultados mostraram que extratos aquosos, diluídos em 1:150 e 1:100, inibiram 50 e 90%, respectivamente, das cepas testadas.

CELLINI et al. (1996) investigaram o efeito do extrato aquoso de duas variedades de alho frente a cepas de *Helicobacter pylori* e observaram que a concentração necessária para a inibição do crescimento era de 2 a 5mg/ml, sendo que esta última concentração, inibiu 90% (CIM₉₀) das cepas testadas. A concentração bactericida mínima (CBM) foi igual ou 2 vezes maior que a concentração inibitória mínima (CIM).

Em 1983, ELNIMA et al. estudaram a atividade de extratos de alho e cebola (*Allium cepa*) sobre a microbiota oral de voluntários, bem como sua atividade antimicrobiana, *in vitro*, sobre várias outras cepas. Ambos os extratos mostraram atividade sobre Gram-positivos, Gram-negativos e sobre fungos, sendo que o alho mostrou-se sempre mais eficiente do que a cebola. Dentre os enxagüatórios utilizados pelos autores, aquele que apresentava 10% de alho e um

quarto de solução de Ringer produziu uma redução significativa no número de bactérias orais.

5.3. *Melaleuca alternifolia*

As árvores de *Melaleuca alternifolia*, da família das mirtáceas (*Myrtaceae*), podem atingir 7 metros de altura, tem uma casca fina e folhas longas e pontiagudas que, quando partidas, emitem um aroma forte. Podem ser cortadas após 15 meses do cultivo e recortadas a cada ano, pois o crescimento é rápido e podem sobreviver ao fogo e a inundações, sendo o óleo produzido estável e facilmente estocado e transportado. As grandes plantações australianas têm garantido um suprimento de óleo em grande quantidade e de boa qualidade (WILLIANS et al., 1990).

O óleo obtido das folhas pode conter quantidades variadas de terpenos (pireno, terpineno e cimeno), terpinenol (terpinen-4-ol), sesquiterpenos e cineol (ALTMAN, 1989) que são os constituintes mais importantes relacionados à atividade antimicrobiana. O comitê australiano de padronização estabelece que o óleo deve conter quantidades de cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30% para que tenha eficácia mínima como anti-séptico (AUSTRALIAN STANDARD AS 2782-85).

Estes níveis mínimos e máximos são indicados principalmente porque o cineol é um conhecido irritante da pele e o terpinen-4-ol é apontado como sendo o maior contribuinte da atividade antimicrobiana dentre os componentes. O óleo tido como sendo de qualidade superior contém entre 2 e 5% de cineol e entre 40 a 47% de terpinen-4-ol (WILLIANS et al., 1990).

Existem evidências que os aborígenes australianos esmagavam folhas de *M. alternifolia* para obter cataplasmas de ação antibacteriana séculos antes do conhecimento científico sobre os microrganismos (WILLIANS et al., 1990).

O óleo da *M. alternifolia* não mancha, tem boas propriedades de penetração tecidual e é compatível com sabões, sendo considerado um solvente poderoso. Penfold, em 1929, foi o primeiro a detectar as suas propriedades antimicrobianas. É ativo contra uma ampla gama de bactérias Gram positivas/negativas e fungos. A CIM contra os patógenos mais comuns situa-se entre 0,5 a 1% (ALTMAN, 1989).

Soluções aquosas do óleo da *M. alternifolia* podem ser obtidas adicionando-se agentes emulsificantes tradicionalmente utilizados pela indústria de cosméticos como o Tween 20 ou Tween 80, os quais não interferem com qualquer propriedade antimicrobiana do óleo (WILLIANS et al., 1990).

HAMMER et al. (1998) observaram *in vitro* que o fungo *Candida albicans* ATCC 10231 e 81 outras cepas deste microrganismo foram inibidas numa

concentração de 0,25%, sugerindo sua utilidade no tratamento tópico de infecções superficiais provocadas pelo fungo. Conclusão semelhante à encontrada anteriormente por NENOFF et al. (1996).

Outros autores testaram o óleo contra *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypsum*. Encontraram uma atividade antimicrobiana significativa contra todas elas, exceto ao *E. floccosum* e sugeriram que o óleo poderia ser útil no tratamento de infecções fúngicas da pele (CONCHA et al., 1998).

HAMMER et al. (1996) observaram sensibilidade ao óleo, de microrganismos encontrados na pele, tais como a *Serratia marcescens* (CIM=0,25%), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM=3%), *Klebsiella pneumoniae* (CBM=0,25%) e *Staphylococcus capitis* (CBM=8%). Concluíram que o óleo poderia ser útil removendo a microbiota oportunista da pele e suprimir, sem remover, a microbiota residente.

CARSON et al. (1995a) testaram a atividade *in vitro* do óleo contra 66 cepas de *S. aureus*, sendo 64 delas resistentes a metilina (MRSA) e encontraram uma CIM de 0,25%. Em um estudo similar, outros autores examinaram a sensibilidade bacteriana de cepas de *Escherichia coli* e *S. aureus* ao óleo e observaram CIM de 0,25% para a primeira e 0,5% para a segunda. Relataram

sucesso no uso do detergente Tween 80 para aumentar a solubilidade do óleo (CARSON et al., 1995b).

WALSH & LONGSTAFF (1987) obtiveram CIM de 400 ppm para estreptococos *mutans* e de 200 ppm para várias bactérias anaeróbias orais à exceção de cepas de *A. viscosus* (800ppm), sugerindo a utilização do agente contra bactérias periodontopatogênicas.

JACOBS & HORNFEELDT (1994) relataram um caso de intoxicação de um menino de dois anos que apresentou como sintomas confusão mental e impossibilidade de locomoção, 30 min após ingerir uma quantidade menor do que 10 mL de um produto contendo 100% do óleo, tornando-se assintomático após 5 horas da ingestão.

JANDOUREK et al. (1998) conduziram um estudo clínico onde avaliaram a eficácia de uma solução oral de óleo de melaleuca em pacientes aidéticos apresentando candidose orofaríngea refratária ao fluconazol. Os pacientes fizeram uso de 15 mL de uma solução de melaleuca, através de bochecho e gargarejo, 4 vezes ao dia, durante 2 a 4 semanas. Concluíram que a solução pode ser um regime alternativo para esta patologia.

RAMACCIATO et al. (1999) testaram as propriedades antimicrobianas do óleo da *M. alternifolia* sobre cepas padrões de estreptococos orais e *S. aureus*, *in vitro*. Os resultados observados para as cepas de estreptococos do grupo *mutans*

REVISÃO DA LITERATURA

foram CIM<0,0125% e CBM₁₀₀ =0,2%, para as cepas de estreptococos do grupo *oralis* foram CIM<0,05% e CBM₁₀₀ = 0,4% e para o *S. aureus* foram CIM = 0,1% e CBM₁₀₀ = 0,2%. O teste de aderência em superfície de vidro para os microrganismos orais mostrou que a concentração de 0,1% foi suficiente para inibir totalmente a aderência bacteriana.

6. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Observar o efeito de uma solução aquosa de alho a 2,5%, de óleo de melaleuca a 0,2% e de clorexidina 0,12%, na forma de bochechos, sobre a microbiota oral total e de estreptococos do grupo *mutans*, em voluntários sadios;
2. Observar o nível de efeitos colaterais ou indesejáveis devido ao uso das soluções.

7. MATERIAL E MÉTODO

7.1. MATERIAL

7.1.1. MEIOS DE CULTURA

Para a determinação da contagem de microrganismos totais foram utilizadas placas de Petri (5 x 2 cm), contendo 5 mL de ágar base¹ com sangue de carneiro desfibrinado e estéril a 5%. Para a contagem parcial de estreptococos do grupo *mutans* foram utilizadas placas de igual tamanho e mesma quantidade de MSB¹ (ágar Mitis Salivarius com bacitracina² 200 U/L, 15% de sacarose³ e telurito de potássio² a 1%), que é o meio seletivo para estreptococos do grupo *mutans* (GOLD et al., 1973).

Para cada diluição, obtida através das amostras coletadas, foram feitas duplicatas, isto é, cada diluição foi semeada em duas placas de ágar sangue e em duas placas contendo MSB.

¹ Difco Co.

² Sigma Co

³ Merck do Brasil

7.2. MÉTODO

7.2.1. SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Conforme definido na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi submetida ao Comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (CEP-FOP-UNICAMP) e só foi realizada após aprovação pelo mesmo (número do protocolo 35/99 – Anexo 01).

Cada voluntário recebeu um termo de consentimento (Anexo 02) onde constavam todos os detalhes do projeto de pesquisa. Somente após a anuência do voluntário, através da assinatura do termo, sem qualquer espécie de coação e com o esclarecimento de possíveis dúvidas, este foi considerado como participante da pesquisa.

Foram utilizados 30 (trinta) indivíduos selecionados através de anamnese e exame clínico com as seguintes características:

1. Estudantes universitários de graduação e pós-graduação, sendo 14 Homens e 16 mulheres com idade entre 18 e 35 anos;
2. Saudáveis, isto é, sem apresentar patologias sistêmicas, que poderiam impedir a utilização das substâncias em estudo;

MATERIAL E MÉTODO

3. Não poderiam ter feito uso de nenhum enxagüatório bucal ou substância antimicrobiana, há pelo menos duas semanas antes do início do estudo;
4. Sem ausência de qualquer elemento dentário (à exceção dos terceiros molares) ou presença de próteses;
5. Sem histórico de alergia ou outros problemas decorrentes do uso de qualquer um dos componentes de quaisquer das soluções que seriam utilizadas.

O tipo de dentifrício utilizado pelos indivíduos foi padronizado durante o período de uso das soluções controle e teste, sendo utilizado o creme dental Tandy com fluoreto de sódio (NaF) a 1100 ppm.

MATERIAL E MÉTODO

7.2.2. SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

A Figura 1 representa a distribuição do período de tempo do estudo com relação aos procedimentos realizados.

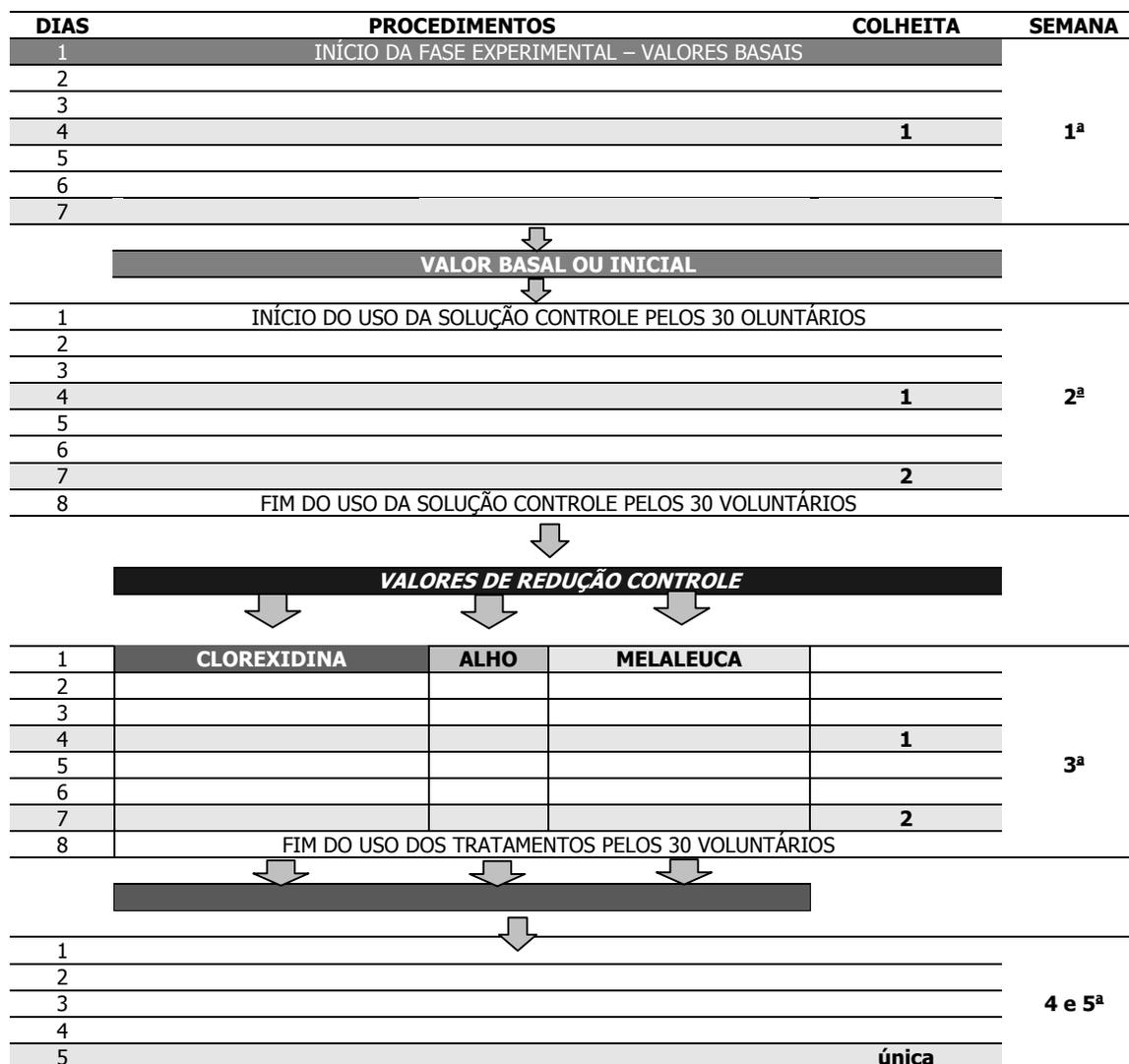


Figura 1 - Distribuição do período de tempo do estudo com relação aos procedimentos realizados.

7.2.3. PRIMEIRA SEMANA - VALORES BASAIS

Na primeira semana de estudo, os voluntários não foram submetidos à padronização de dentífrício ou a qualquer tratamento com soluções para bochecho, as colheitas foram realizadas nas condições habituais, a fim de verificar a microbiota normal de cada voluntário.

Nesta semana, todos os voluntários compareceram duas vezes, com espaçamento de dois dias, no período da manhã (até às 9:00h), à área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba para a colheita de amostras de saliva e quantificação de microrganismos totais e *mutans*. A média individual dos resultados obtidos com as duas medidas foi considerada como valor basal do número de microrganismos totais e de *mutans* de cada voluntário e serviu como referência (linha base) para comparação com as demais condições do estudo.

7.2.4. SEGUNDA SEMANA - SOLUÇÃO CONTROLE

Na semana seguinte a que foram verificados os valores basais, o dentífrício utilizado foi padronizado para todas as escovações do dia e todos os 30 indivíduos selecionados receberam uma solução controle⁴ contendo o veículo utilizado nas soluções em teste (água destilada, esterilizada adicionada de essência

MATERIAL E MÉTODO

de hortelã a 5% e sorbitol a 2%). Cada um dos 30 voluntários recebeu um frasco plástico contendo 300 mL da solução controle com as instruções, por escrito, de como utilizá-la (Anexo 03).

Diariamente, durante 7 dias consecutivos, uma hora após a última higienização bucal do dia, os voluntários bochechavam 10 mL da solução por 1 minuto. Após o bochecho, os voluntários eram orientados à não beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, três e seis dias após o início da utilização da solução controle e sem que o indivíduo interrompesse o uso desta, foram colhidas amostras de saliva e quantificados os microrganismos totais e *mutans*. Os resultados obtidos com este procedimento foram considerados como o valor do número de microrganismos totais e de *mutans*.

Decorrida a semana de uso da solução controle, os voluntários foram divididos aleatoriamente em grupos de 10 e cada grupo foi submetido a um dos três tratamentos com as soluções teste, clorexidina, óleo de melaleuca e alho.

⁴ Fornecido pela farmácia de manipulação da rede Drogal[®]

7.2.5. TERCEIRA SEMANA – SOLUÇÕES TESTE

SOLUÇÃO DE ALHO A 2,5%

A variedade de alho (*Allium sativum*) branca⁵ (grupo branco, subgrupo nobre, classe quatro, tipo especial, de procedência brasileira) foi obtida no mercado local.

Para a confecção do extrato de alho, a casca seca ao redor dos bulbos era totalmente removida e somente aqueles que se apresentassem intactos, sem qualquer sinal de infecção por fungos ou qualquer outra anomalia, eram utilizados.

Uma vez selecionados, 100 g de bulbos eram triturados em um liquidificador durante 10 min, com adição de 100 mL de água destilada. O produto resultante passava por uma dupla filtragem a vácuo⁶ com filtro de papel, sendo posteriormente esterilizado através da passagem por um novo filtro de membrana⁷ de 0,2 µm de diâmetro de poro (ELNIMA et al., 1983).

O extrato resultante apresentou uma concentração de 25% cuja composição foi analisada através de cromatografia gasosa (aparelho HP5890, com temperatura de 280°C, gás hélio, fluxo 1mL/min, coluna HP5 e biblioteca de compostos NIST98) no Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da UNICAMP (CPQBA-UNICAMP). O extrato era fornecido para a farmácia de

⁵ Nossoalho, KALIR & Ormeles Ltda.

⁶ Bomba de vácuo Marconi com sistema de filtragem de membrana marca Sartorius

MATERIAL E MÉTODO

manipulação⁸, sendo então diluído no veículo (solução controle) até atingir uma concentração de 2,5%.

Cada um dos 10 voluntários recebeu um frasco plástico contendo 300mL desta solução, juntamente com as instruções por escrito de como utilizá-la (Anexo 03). Diariamente, durante sete dias consecutivos, uma hora após a última higienização do dia, os voluntários bochechavam 10 mL da solução por 1 minuto. Após o bochecho, os voluntários foram orientados a não beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, três e seis dias após o início da utilização das soluções em teste e sem que o indivíduo interrompesse o uso delas, foram colhidas amostras de saliva e quantificados os microrganismos totais e *mutans*.

SOLUÇÃO DE ÓLEO DE MELALEUCA A 0,2 %

O extrato utilizado para este estudo era importado da Austrália, sendo obtido por uma farmácia de manipulação⁹ cuja composição foi analisada através de cromatografia gasosa (aparelho Kovatz 1M., com temperatura de 240°C, gás hélio, fluxo 1mL/min, coluna DB1 e biblioteca de compostos NIST98) no Centro de

⁷ Minisart, Sartorius

⁸ Farmácia de manipulação da rede Drogal[®]

⁹ Galena farmácia de Manipulação Ltda.

MATERIAL E MÉTODO

Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da UNICAMP (CPQBA-UNICAMP), para o controle de qualidade do óleo.

Uma vez comprovada a qualidade do extrato (WILLIANS et al.,1990), este foi enviado para a farmácia de manipulação¹⁰ que, a exemplo das outras soluções, fazia a diluição do óleo usando o veículo (solução controle), com a adição de Tween 80 a 0,5%, até atingir uma concentração de 0,2%.

Cada um dos 10 voluntários recebeu um frasco plástico contendo 300mL desta solução com as instruções por escrito de como utilizá-la (Anexo 03). Diariamente, durante sete dias consecutivos, uma hora após a última higienização do dia, os voluntários bochechavam 10 mL da solução por 1min. Após o bochecho, os voluntários foram orientados à não beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, três e seis dias após o início da utilização das soluções em teste e sem que o indivíduo interrompesse o uso delas, foram colhidas amostras de saliva e quantificados os microrganismos totais e *mutans*.

SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA A 0,12 %

A solução teste de clorexidina¹⁰ foi feita a partir de 120 mg de gluconato

¹⁰ Fornecida pela farmácia de manipulação Drogal[®]

MATERIAL E MÉTODO

de clorexidina diluída em 100 mL de água destilada, deionizada e esterilizada, adicionando-se sorbitol a 2% e essência de hortelã a 5 %, concentração final de 0,12%.

Cada um dos 10 voluntários recebeu um frasco plástico contendo 300mL desta solução com as instruções por escrito de como utilizá-la (Anexo 03). Diariamente, durante sete dias consecutivos, uma hora após a última higienização do dia, os voluntários bochechavam 10 mL da solução por 1min. Após o bochecho, os voluntários foram orientados à não beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, três e seis dias após o início da utilização das soluções em teste e sem que o indivíduo interrompesse o uso delas, foram colhidas amostras de saliva e enumeradas as quantidades de microrganismos totais e *mutans*.

7.2.6. QUARTA e QUINTA SEMANAS – PÓS-TRATAMENTO

Decorrida a semana de uso da solução teste de cada grupo, o uso delas e do dentífrico padronizado foi suspenso, sendo cada voluntário orientado a voltar aos seus hábitos normais prévios ao experimento. Uma vez por semana, nas duas semanas seguintes (quarta e quinta semanas do estudo) à interrupção dos

tratamentos, foram colhidas novas amostras de saliva, sendo quantificados os microrganismos totais e *mutans* de cada indivíduo.

Os resultados obtidos com este procedimento foram comparados com o número de microrganismos totais e de *mutans* do valor de referência obtido na primeira semana para verificar se o voluntário havia voltado à sua condição inicial.

7.2.7. QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Nos dias marcados para a colheita das amostras de saliva, os voluntários recebiam 2g de parafina sólida para mastigar durante 2 min, estimulando a formação salivar (DASANAYAKE et al., 1995). Todos eram orientados a desprezar a saliva assim obtida e, em seguida, aproximadamente 1 mL de saliva de cada voluntário era colhida em um tubo de ensaio de 130x10 mm, com tampa de rosca, autoclavado. Uma ponteira descartável de 1mL foi adaptada a cada tubo, de forma a facilitar a colheita. Os tubos com as amostras eram submetidos à dispersão num sonicador¹¹ com amplitude a 5% e 6 pulsos com ciclo total de 59s (9,9s de pulso e 5s de intervalo). As amostras eram diluídas 100 e 1000 vezes, com a adição de soro fisiológico esterilizado em tubo tipo Eppendorf. As amostras de saliva restantes eram identificadas com um código e armazenadas em geladeira.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras diluídas eram pipetadas e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski esterilizada (alíquotas de 5 μ L), nas em duas placas de Petri contendo os meios (MSB e ágar sangue).

Após estes procedimentos, todas as placas eram depositadas em estufa¹² com 10% de pressão de CO₂ e a 37°C de temperatura, por 48 horas.

As placas de MSB eram quantificadas enquanto as placas de ágar sangue permaneciam por mais 24 horas na estufa de cultura¹³ para só após este período serem quantificadas.

A Figura 2 representa o esquema da metodologia de colheita.

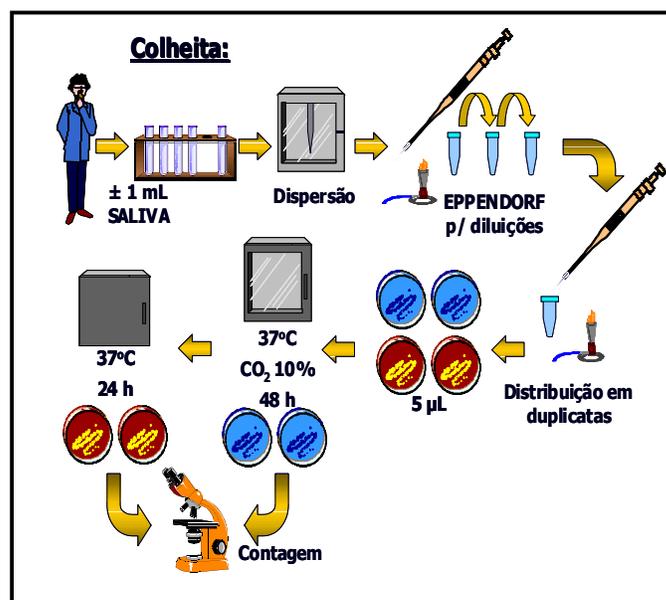


Figura 2. Esquema da metodologia de colheita.

¹¹ Vibra Cell 400w, Sonics & Materials Inc

¹² IG 150, Jovan

¹³ 002 CB, Fanem Ltda.

7.2.8. MEDIÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS

Nos dias de colheita das amostras de saliva, cada voluntário recebia um formulário (Anexo 04), indagando sobre o gosto e odor das soluções além de possíveis alterações no paladar, hálito ou qualquer outro efeito desagradável, ocasionado pelo uso das soluções controle ou teste. Neste formulário, cada sensação descrita poderia ser quantificada aleatoriamente numa escala analógica na qual a medida (X), era enquadrada na seguinte definição:

0 – Nenhuma alteração/sensação;

$0 < X \leq 2,5$ – Sensação leve;

$2,5 < X \leq 5,5$ – Sensação moderada;

$5,5 < X \leq 8,5$ – Sensação grave e

$8,5 < X \leq 10$ – Sensação severa.

Após o término do experimento, cada sujeito era submetido, segundo a sua vontade, a uma profilaxia profissional, com auxílio de taça de borracha e pedra pomes, procedimento que seria executado pelos pesquisadores.

7.2.9. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Três médias de percentagens individuais de redução de microrganismos, foram consideradas:

1. Aquelas do grupo controle considerando o valor inicial como sendo 100%;
2. Aquelas dos grupos de tratamento durante a semana do seu uso, considerando o seu valor controle como sendo 100% e;
3. Aquelas dos grupos de tratamento após 1 e 2 semanas do término do seu uso, considerando o valor durante a fase de tratamento como sendo 100%.

As médias do número ufc/ μ L, observadas após a utilização das soluções nas diversas fases do estudo (basal, médias provenientes do controle, médias provenientes da utilização das soluções-teste e primeira/segunda semanas após o término) e os dados referentes aos questionários sobre efeitos indesejáveis (em nível ordinal) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%¹⁴.

¹⁴ Software Bioestat for Windows, versão 1.0

8. RESULTADOS

A Figura 3 e Tabela 1 mostram, respectivamente, o cromatograma e a constituição (através da comparação com a biblioteca de compostos do aparelho) do óleo de melaleuca utilizado neste estudo.

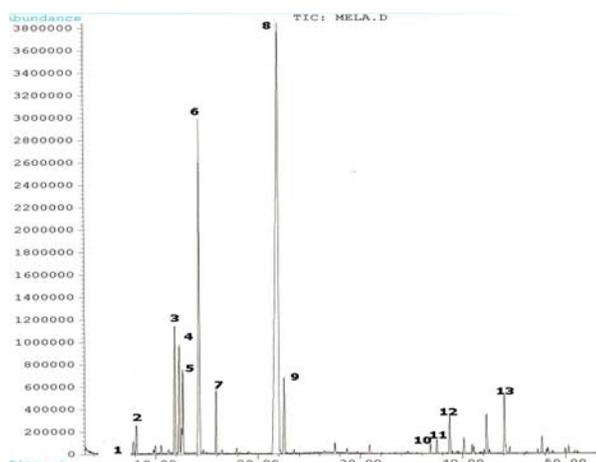


Figura 3. Cromatograma do óleo de melaleuca utilizado.

Tabela 1

Relação dos elementos constituintes do óleo.

pico	substância	área do pico	% da área	% provável
1	alfa thujeno	7712714	0,55	0,5
2	alfa pineno	20002350	1,42	1
3	alfa terpineno	83249552	5,92	5
4	1 metil 4 - 1 metil etil benzeno	64121071	4,56	4
5	1,8 cineol	48775574	3,47	3
6	gama terpineno	224383620	15,95	16
7	alfa terpinoleno	31717949	2,25	2
8	terpinen-4-ol	717128700	50,97	50
9	alfa terpineol	50359663	3,58	3
10	alfa gujuneno	4870053	0,34	< 0,2
11	trans caryofileno	7092865	0,5	0,5
12	+ aromadendreno	22574822	1,6	1
13	delta cadineno	38700407	2,75	2,5

RESULTADOS

A Figura 4 e Tabela 2 mostram, respectivamente, o cromatograma e a constituição (através da comparação com a biblioteca de compostos do aparelho) do extrato aquoso de alho utilizado neste estudo.

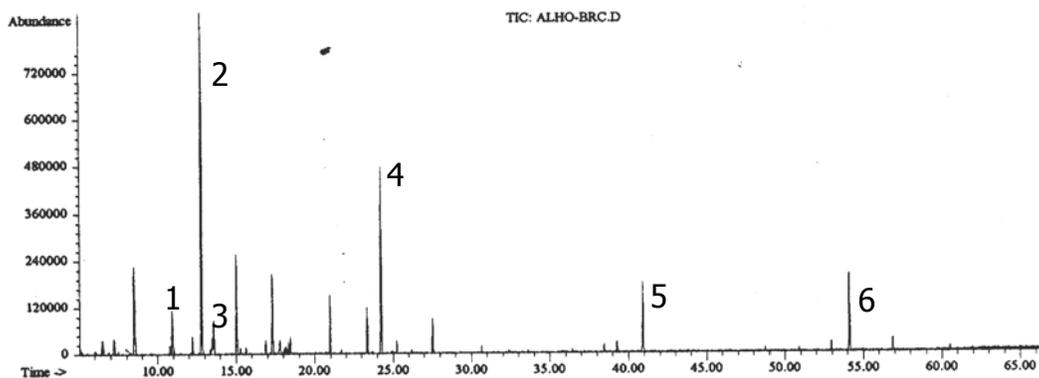


Figura 4. Cromatograma do extrato aquoso de alho.

Tabela 2

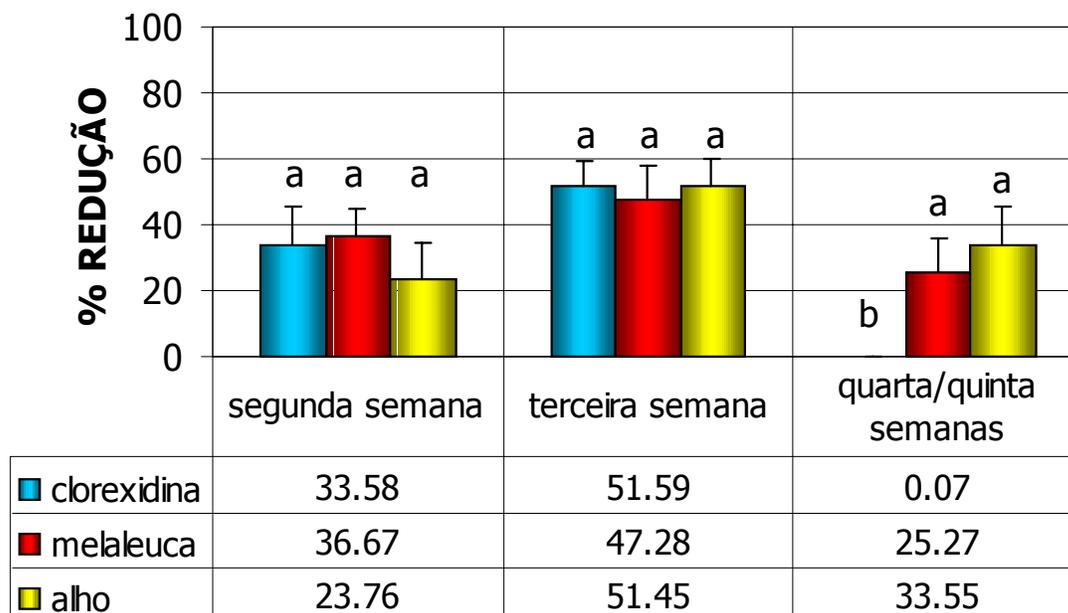
Relação dos elementos constituintes do extrato.

<i>n.o pico</i>	<i>substância</i>	<i>Tempo de</i>	<i>% provável</i>
1	D-limoneno	10,936	3,83
2	Dialil-disulfito	12,814	27,23
3	Alil-dihidropropanoato	13,579	2,67
4	Tetradecano	24,245	12,49
5	Dibutil-ftalato	40,924	5,73
6	Bis (2-etilhexil) ftalato	54,111	6,78

O Gráfico 1 representa as médias de redução de estreptococos do grupo mutans (Anexo 08) dos grupos onde foram utilizadas as soluções controle,

RESULTADOS

clorexidina, alho e óleo de melaleuca, dentro de um mesmo período de estudo (segunda, terceira e quarta/quinta semanas).

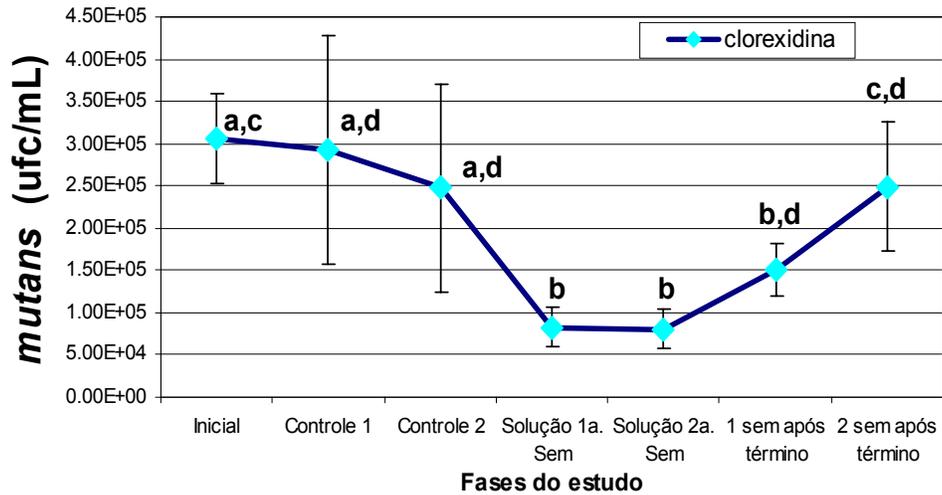


Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) considerando uma mesma semana de estudo.

Gráfico 1. Médias de redução (\pm epm) de estreptococos do grupo mutans.

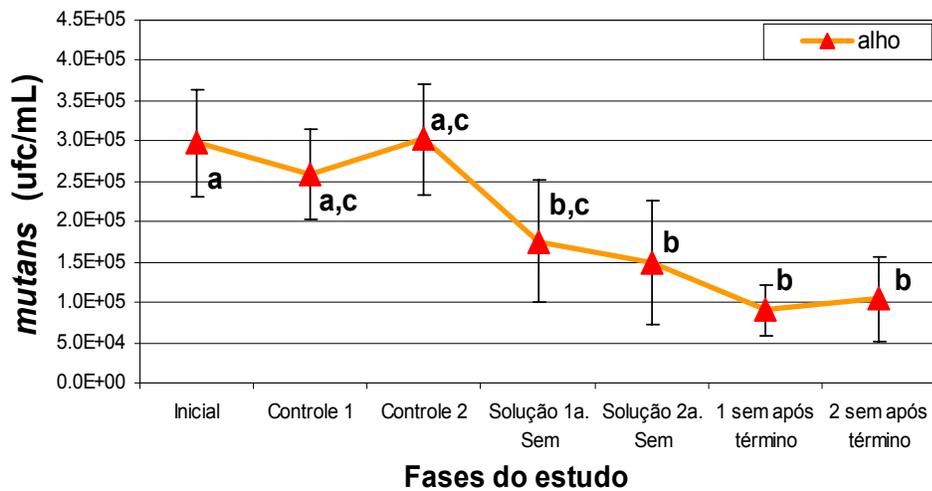
Os Gráficos 2, 3 e 4 representam, respectivamente, as médias de ufc de *S. mutans* sp./mL de (os valores podem ser encontrados no Anexo 05), observadas pela utilização das soluções nas diversas fases do estudo (inicial, primeira e segunda medidas durante a utilização do controle, primeira e segunda medidas durante a utilização das soluções, primeira e segunda semanas após o término).

RESULTADOS



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

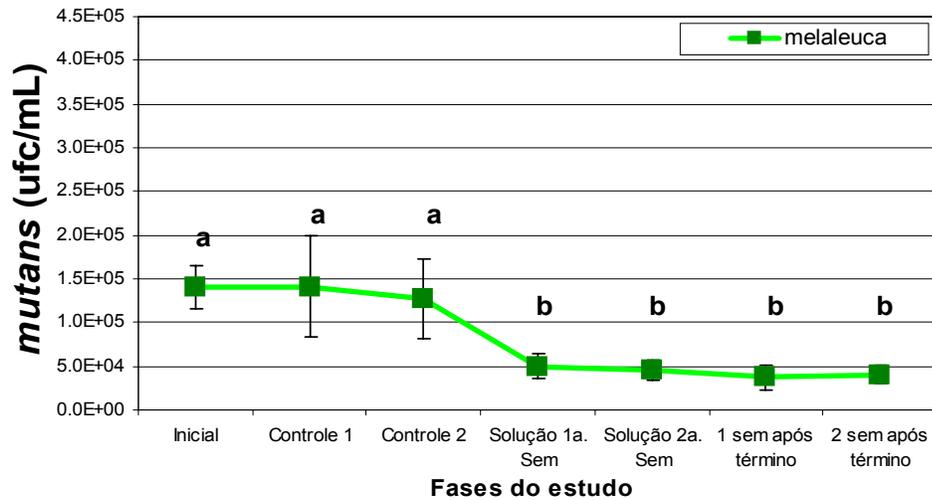
Gráfico 2. Médias (\pm epm) de ufc de *S. mutans* sp./mL do grupo da clorexidina.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 3. Médias (\pm epm) de ufc de *S. mutans* sp./mL do grupo da solução de alho.

RESULTADOS

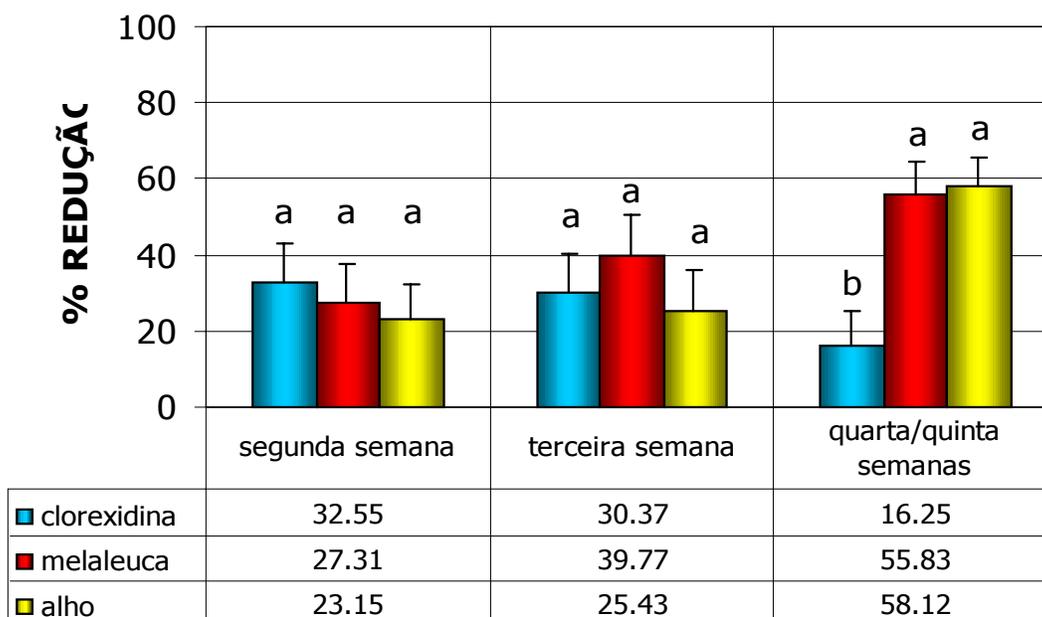


Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 4. Médias (\pm epm) de ufc de *S. mutans* sp./mL do óleo de melaleuca a 0,2%.

O Gráfico 5 representa as médias de redução de microrganismos totais (Anexo 08) os grupos onde foram utilizadas as soluções controle, clorexidina, alho e óleo de melaleuca, dentro de um mesmo período de estudo (segunda, terceira e quarta/quinta semanas).

RESULTADOS

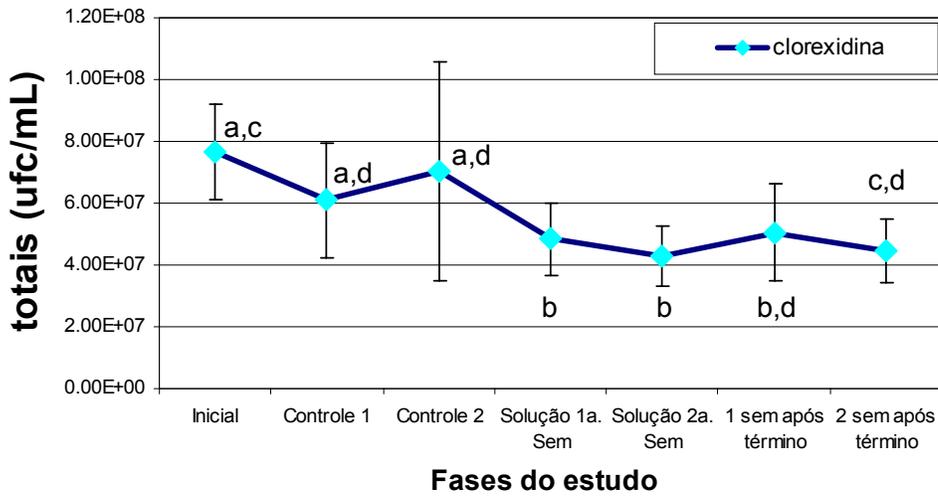


Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) considerando uma mesma semana de estudo.

Gráfico 5. Médias (\pm epm) de redução de microrganismos totais.

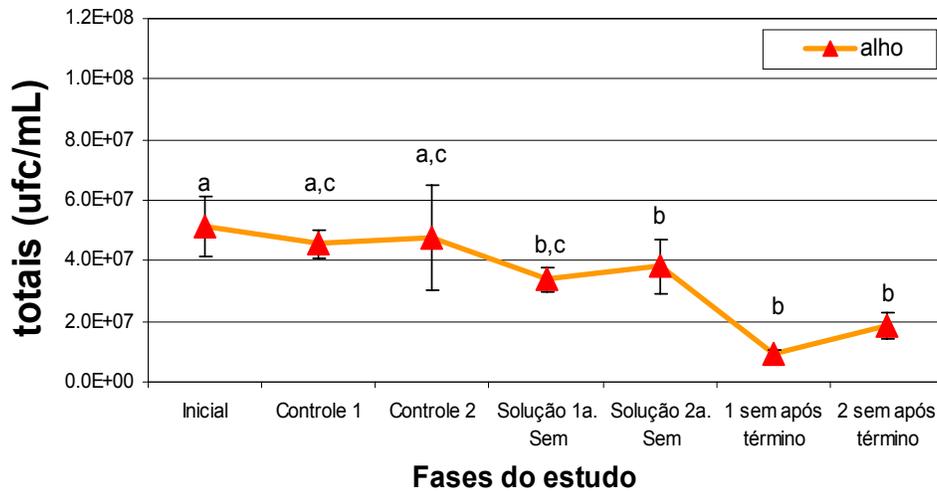
Os Gráficos 6, 7 e 8 representam, respectivamente, as médias do número de unidades formadoras de colônia (ufc/mL) de microrganismos totais (os valores podem ser encontrados no Anexo 06), observadas pela utilização das soluções nas diversas fases do estudo (basal, primeira e segunda medidas durante a utilização do controle, primeira e segunda medidas durante a utilização das soluções, primeira e segunda semanas após o término).

RESULTADOS



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

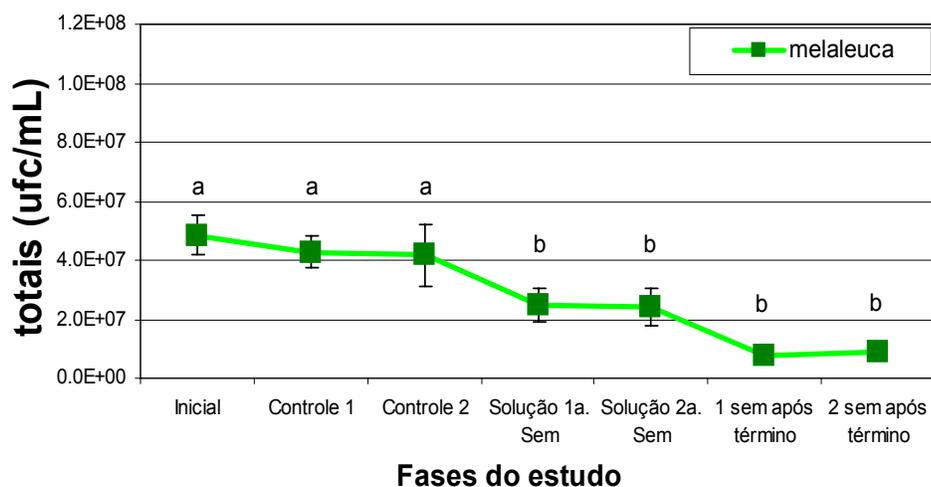
Gráfico 6. Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais/mL no grupo da clorexidina.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 7. Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais/mL no grupo de alho.

RESULTADOS



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Gráfico 8. Médias (\pm epm) de ufc de microrganismos totais/mL no grupo da melaleuca.

Os Gráficos 9 a 14 representam, respectivamente, as percentagens dos efeitos colaterais observados pela utilização das soluções controle (Gráfico 9), clorexidina, óleo de melaleuca e extrato de alho.

RESULTADOS

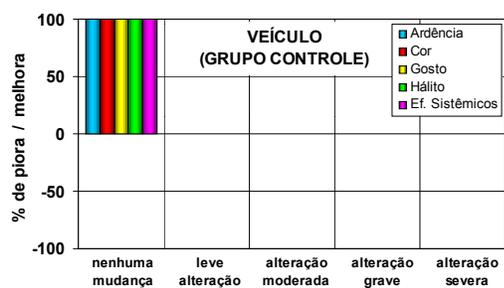


Gráfico 9. Grupo controle.

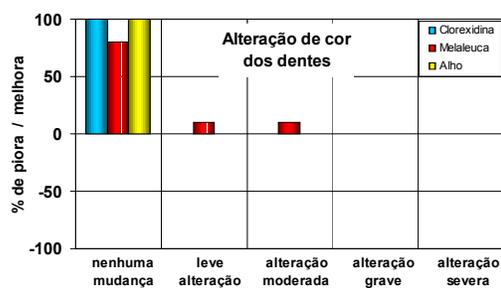


Gráfico 10. Alteração de cor dos dentes.

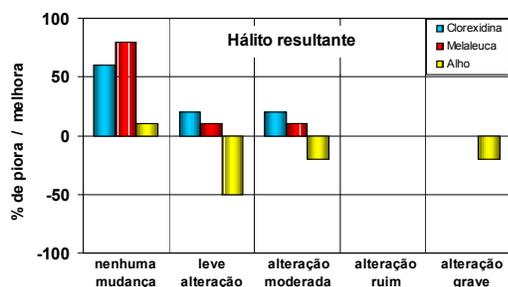


Gráfico 11. Hálito resultante.

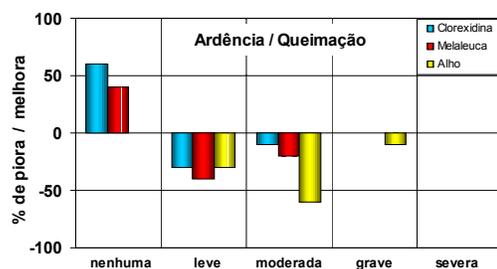


Gráfico 12. Ardência ou queimação.

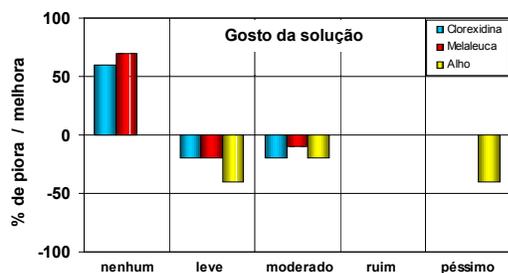


Gráfico 13. Gosto da solução.

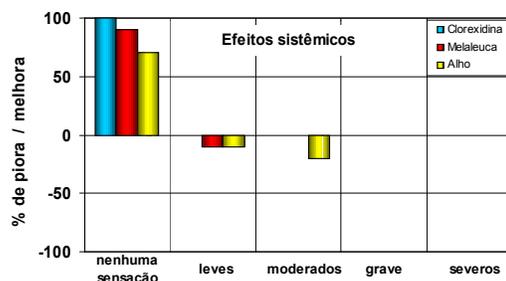


Gráfico 14. Efeitos sistêmicos.

Barras com positivas representam efeitos considerados benéficos e negativas representam efeitos maléficos.

Gráficos 9 a 14. Percentagens dos efeitos colaterais observados.

RESULTADOS

Os resultados referentes ao grupo controle, alteração de cor nos dentes ($p=0,68$) e efeitos sistêmicos ($p=0,49$) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os três tratamentos ($p>0,05$).

Os resultados relacionados à ardência/queimação, hálito resultante e gosto das soluções, apresentaram diferenças estatisticamente significantes. O alho apresentou maior queimação do que a clorexidina ($p=0,0032$) e melaleuca ($p=0,049$), o hálito dos voluntários do grupo do alho foi pior em relação a clorexidina ($p=0,049$) e melaleuca ($p=0,0066$) e o gosto da solução de alho foi considerado mais desagradável que aquele da clorexidina ($p=0,0066$) e melaleuca ($p=0,0016$). A análise mostrou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre as soluções de clorexidina e melaleuca ($p>0,05$) quanto a nenhum parâmetro.

9. DISCUSSÃO

A quantificação dos estreptococos do grupo mutans na saliva, no presente trabalho, foi escolhida como método de avaliação da eficácia dos tratamentos devido a sua associação com a cárie dentária e o biofilme bacteriano (GIBBONS & van HOUTE, 1975; LOESCHE et al., 1975; DASANAYAKE et al., 1995; BOWDEN, 1996). A redução do número destas bactérias tem sido relacionada com o controle e prevenção de doenças orais (ZICKERT et al., 1982; ZICKERT et al., 1983; GISSELSSON et al., 1988; LINDQUIST et al., 1989; ISOKANGAS et al., 1991; BOWDEN, 1996).

Todos os voluntários apresentaram-se, em graus variados (média de $0,25 \times 10^3$ ufc/mL no início do estudo), colonizados por *S. mutans* spp., fato constatado pelos resultados do cultivo da saliva em MSB, conforme preconizado por GOLD (1973).

A saliva foi escolhida como nicho representativo da contaminação oral pois, a contagem de seus microrganismos é apontada como o principal método utilizado para a quantificação de *S. mutans* spp. (DASANAYAKE et al., 1995), existindo uma relação direta entre seu número e o número de sítios intra-orais colonizados (TOGELIUS et al., 1984; DASANAYAKE et al., 1995). Assim a redução do número de microrganismos proporcionada por cada tratamento, verificada neste estudo, poderia indicar uma condição de redução do biofilme bacteriano ou

da doença cárie, embora estes parâmetros não tenham sido medidos (LÖDAL et al., 1961; SUOMI et al., 1971; AXELSSON et al., 1991).

O dentifrício utilizado neste estudo continha fluoreto de sódio 1100 ppm (Tandy[®]), pois, nesta forma, o flúor é compatível com a clorexidina e ambos podem ser utilizados ao mesmo tempo, sem prejuízo de atividade conforme relatado por CURY et al. (1994). Ao contrário, o monofluorofosfato de sódio (MFP), outra forma comumente utilizada em dentifrícios, interage com a clorexidina formando sais de baixa solubilidade e diminuindo assim a ação de ambos (BARKVOLL et al., 1988), sendo portanto preterido neste estudo.

Um outro componente, encontrado em todos os dentifrícios, tido como incompatível com a clorexidina é o detergente lauril sulfato de sódio (LSS) (KIRKEGAARD et al., 1974; RØLLA et al., 1970; RØLLA & MELSEN, 1975; BONESVOLL, 1977; BARKVOLL et al., 1988). Devido a esta incompatibilidade, BARKVOLL et al. (1989) recomendam um intervalo entre a escovação com estes dentifrícios e bochechos com clorexidina, superior a 30 minutos ou, preferencialmente, próximo de 2 horas após a escovação, razão pela qual os voluntários desta pesquisa foram instruídos a fazer o bochecho com as soluções uma hora após a última escovação.

Para que tenha eficácia mínima como anti-séptico, o óleo de melaleuca deve apresentar uma percentagem de cineol (agente irritante) abaixo de 15% e de

DISCUSSÃO

terpinen-4-ol (agente antimicrobiano) acima de 30% (AUSTRALIAN STANDARD AS 2782-85). Os valores comprovados pela cromatografia gasosa, indicam que o óleo utilizado neste estudo era de qualidade superior (WILLIANS et al., 1990).

A concentração de 0,2% escolhida para a solução do óleo de melaleuca é apoiada pelo fato de que a CIM contra os patógenos mais comuns situa-se entre 0,5 a 1% (ALTMAN, 1989), sendo que RAMACCIATO et al. (1999) observaram CIM<0,0125% e CBM₁₀₀ de 0,2% para *S. mutans* spp. e CIM<0,05% e CBM₁₀₀ de 0,4% para *S. oralis* spp., *in vitro*.

Como agente emulsificante para soluções aquosas do óleo de melaleuca foi utilizado o Tween 80, tradicionalmente utilizado pela indústria de cosméticos, pois não interfere com qualquer propriedade antimicrobiana do óleo (WILLIANS et al., 1990; CARSON et al., 1995b).

As capacidades de inibição de crescimento e lise bacteriana do extrato de alho devem-se à presença da alicina e tiosulfonatos (GONZÁLES-FANDOS et al., 1994). A análise cromatográfica, embora não tenha permitido a identificação de todos os componentes do extrato utilizado, mostrou a presença de sulfatos e ftalatos.

A concentração do extrato de alho de 2,5%, empregada neste estudo, mostrou em estudos preliminares, ser suficiente para inibição de microrganismos orais, não justificando portanto uma concentração mais alta como descrito por

DISCUSSÃO

ELNIMA et al. (1983), pois efeitos colaterais como mau hálito e gosto desagradável da solução poderiam ser agravados. Estes últimos autores verificaram uma redução do número de bactérias com o uso de enxagüatórios a base de alho a 10%.

A média de redução de *S. mutans* spp. observada neste estudo com relação a clorexidina é similar àquela verificada por NETUSCHIL et al. (1989), embora as condições metodológicas tenham sido diferentes. Mais importante que a redução em si, é o fato de que a clorexidina não conseguiu manter baixos níveis destes microrganismos, 2 semanas após o término do uso da solução, o que vai ao encontro dos achados destes autores, que observaram ausência de efeito após 6 e 8 horas do uso da solução.

Dentre as várias posologias possíveis para o uso da clorexidina, aquela que usa a concentração de 0,12%, com bochechos únicos e diários já mostrou ser eficaz (CLARK & GUEST, 1994). Os achados do presente estudo são concordantes aos destes autores que mostraram redução de mais de 10 vezes o número inicial de *S. mutans* spp.

Uma vez que a clorexidina a 0,12% apresentou, no presente trabalho, uma eficácia comparável àquela verificada na literatura, seria possível inferir que as soluções de óleo de melaleuca a 0,2% e extrato de alho a 2,5% seriam tão

DISCUSSÃO

eficazes quanto à mesma, pois as percentagens de redução não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

A ação antimicrobiana destes dois agentes fitoterápicos (o alho e o óleo de melaleuca) verificada neste trabalho, já foi citada em estudos prévios. JANDOUREK et al. (1998) mostraram, em um estudo clínico, a eficácia do óleo de melaleuca sobre fungos orais, assim como a CIM para estreptococos *mutans* e várias bactérias anaeróbias orais foi estabelecida (WALSH & LONGSTAFF, 1987).

O presente trabalho comprova os achados *in vitro* de RAMACCIATO et al. (1999) que observaram valores de concentração inibitória mínima menores que 0,0125% e bactericida igual a 0,2% para cepas de *S. mutans* sp. e valores de concentração inibitória mínima menores que 0,05% e bactericida igual a 0,4% para cepas de estreptococos do grupo *oralis*. Este mesmo trabalho mostrou inibição total de aderência em superfície de vidro para os microrganismos orais com uma concentração de 0,2% do óleo. Os presentes achados clínicos corroboram estes dados e confirmam a eficácia do óleo.

Da mesma forma, a atividade antimicrobiana do alho foi demonstrada sobre *Candida albicans*, um fungo oral oportunista (ADETUMBI et al., 1986) e também sobre bactérias orais *in vivo* e *in vitro* (ELNIMA et al., 1983). Estes dados vão ao encontro dos achados do presente trabalho, quando o alho provou sua atividade sobre *S. mutans* sp e microrganismos totais.

DISCUSSÃO

Os efeitos colaterais da clorexidina tais como, manchas provocadas nos dentes (GREENSTEIN et al., 1986; JENKINS et al., 1993; LEARD & ADDY, 1997), gosto desagradável e alterações de paladar ou até mesmo a inflamação gengival (BOWDEN, 1996), não foram verificados. A razão provável seria a posologia empregada, isto é, bochechos únicos diários, por um curto espaço de tempo (1 semana).

Embora haja relatos de intoxicação com o óleo da melaleuca (JACOBS & HORNFELDT, 1994) o presente trabalho mostrou que, na concentração empregada, o mesmo mostrou ser seguro, uma vez que não houve relatos de complicações sistêmicas sérias.

Como esperado, as maiores implicações quanto aos efeitos colaterais recaíram sobre a solução de extrato aquoso de alho que provocou sensação significativa de mau hálito nos indivíduos e com gosto desagradável.

Assim, o óleo de melaleuca e, com as devidas correções nos efeitos adversos que proporciona, também o extrato de alho, poderiam ser incorporados em soluções para bochecho e dentifrícios, como suplementos a higienização tradicional, atuando como agentes antimicrobianos tão eficazes quanto a clorexidina (LINDHE et al., 1984; RAMBERG et al., 1992; OWENS, 1997).

10. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtido podemos concluir que:

1. A solução aquosa de alho a 2,5% e de óleo de melaleuca a 0,2%, quando usadas na forma de bochechos, exibiram eficácia similar à solução de clorexidina a 0,12% na redução da microbiota oral total e de estreptococos do grupo mutans, em voluntários sadios, podendo ser indicadas como alternativas clínicas;
2. As soluções de alho a 2,5% e de óleo de melaleuca a 0,2% apresentaram efeito residual nas duas semanas pós-tratamento, apresentando efeito de redução enquanto que a clorexidina não conseguiu exercer este efeito.
3. A solução aquosa de alho a 2,5% apresentou o maior nível de efeitos colaterais ou indesejáveis, sendo que as soluções de óleo de melaleuca a 0,2% e de clorexidina 0,12% não apresentaram efeitos colaterais ou indesejáveis.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.13, p.957-964, 1986.
2. ADETUMBI, M., JAVOR, G.T., LAU, B.H. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother, Washington, v.30, n.3, p.499-501, Sep. 1986.
3. ALTMAN, P.M. Australian tea tree oil - a natural antiseptic. Aust J Biotech, v.3, n.4, p.247-248, 1989.
4. AUSTRALIAN STANDARD AS 2782. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type. 1995. *Apud*: ALTMAN, P.M. op. cit. Ref. 3.
5. AXELSSON, P. Current role of pharmaceuticals in prevention of caries and periodontal disease. Int Dent J, Guiedford, v.43, p.473-482, 1993.
6. _____, LINDHE, J., NYSTRÖN, B. On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.18, p.182-189, 1991.
7. BARKVOLL, P., RØLLA, G., BELLAGAMBA, S. Interaction between clorexidine digluconate na sodium monofluorophosphate in vitro. Scan J Dent Res, Copenhagen, v.96, n.1, p.30-3, 1988.

* De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos periódicos conforme o Medline.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. BARKVOLL, P., RØLLA, G., SVENDSEN, A.K. Interaction between chlohexidine gluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.16, p.593-595, 1989.
9. BIEDERMANN, B. Garlic - a "secret miracle of God"? Schweiz Rundsch Med Prax, Berne, v.84, n.1, p.7-10, Jan. 1995.
10. BONESVOLL, P. Influence of ionic strenght, calcium, sodium dodecyl sulfate and urea on the retention of chlohexidine in the human mouth after mouth rinses. Arch Oral Biol, Oxford, v.22, p.273-279, 1977.
11. BOWDEN, G.H. Mutans streptococci caries and chlorhexidine. J Can Dent Assoc, Ottawa, v.62, n.9, p.700, Sep. 1996.
12. CARSON, C.F. et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Antimicrob Chemother, London, v.35, n.3, p.421-4, Mar. 1995a.
13. _____, HAMMER, K.A., RILEY, T.V. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Microbios, Cambridge, v.82, n.332, p.181-5, 1995b.
14. CELLINI, L. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). FEMS Immunol Med Microbiol, Amsterdam, v.13, n.4, p.273-277, Apr. 1996.
15. CLARK, D.C., GUEST, J.L. The effectiveness of three different strengths of chlorhexidine mouthrinse. J Can Dent Assoc, Ottawa, v.60, n.8, p.711-714, Aug. 1994.
16. CONCHA, J.M., MOORE, L.S., HOLLOWAY, W.J. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil against various pathogenic organisms. J Am Podiatr Med Assoc, Washington, v.88, n.10, p.489-92,

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Oct. 1998.

17. CURY, J.A., CURY, A.A.D.B., REBELO, M.A.B. Efeito de bochecho com clorexidina (CH) e Flúor (F) na redução de formação da placa dental e incorporação de flúor no esmalte dental. Revta Bras Odont, Rio de Janeiro, v.LI, n.3, Maio/Junho, 1994.
18. DASANAYAKE, A.P. et al. Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. Archs Oral Biol, Oxford, v.40, n.4, p.345:351, 1995.
19. ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. Ciência e Cultura, v.39, n.8, p.697-702, Ago. 1997.
20. ELNIMA, E.I. et al. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. Pharmazie, Berlin, v.38, n.11, p.747-8, Nov. 1983.
21. EMILSON, C.G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.85, p.255-265, 1977.
22. FARDAL, O., TURNBULL, R. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc, Chicago, v.112, p.863-869, 1986.
23. FARNSWORTH, N.R. et al. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ, Geneva, v.63, n.6, p.965-81, 1985.
24. FRANDSEN, A. Mechanical oral hygiene practices. *In: Dental plaque control measures and oral hygiene practices*, Oxford: H. Loe & D. V. Kleinman, IRL Press, 1986, p.93-116.
25. FRATE, D.A. et al. Use of plant-derived therapies in a rural, biracial population in Mississippi. J Miss State Med Assoc, Jackson, v.37, n.1, p.427-9, Jan. 1996.
26. GIBBONS, R.J., VAN HOUTE, J.V. Dental caries. Annu Rev Med, v.26, p.121-135, 1975.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

27. GISSELSSON, H., BIRKHED, D., BJORN, A.L. Effect of professional flossing with chlorhexidine gel on approximal caries in 12- to 15- year-old schoolchildren. Caries Res, Basel, v.22, p.187-192, 1988.
28. GOLD, O. C., JORDAN, H. V., VAN HOUTE, J. A selective medium for *S. mutans*. Arch Oral Biol, Oxford, v.18, p.1356-64, 1973.
29. GONZÁLEZ-FANDOS, E. et al. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. J Appl Bacteriol, v.77, n.5, p.549-552, 1994.
30. GRAMLING, L.G. Dentifrices. *In: Handbook of non-prescription drugs*, Washington: Griffenhagen & Hawkins, Am. Pharm. Ass., 1971, p.116-120.
31. GREENSTEIN, G., BERMAN, C., JAFFIN, R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol, Chicago, v.57, p.370-377, 1986.
32. HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. *In-vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida spp.* J Antimicrob Chemother, London, v.42, n.5, p.591-5, Nov. 1998.
33. _____, _____, _____. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Am J Infect Control, St. Louis, v.24, n.3, p.186-9, Jun. 1996.
34. HENESSEY, T. Some antimicrobial properties of chlorhexidine. J Periodontol Res, Copenhagen, v.12(suppl 12), p.61-67.1973.
35. HILDEBRANDT, G.H. Effects of Repeated Treatment with Sustained-Release Chlorhexidine Mouth Guards on Salivary Levels of Mutans Streptococci. Caries Res, Basel, v.30, p.445-453, 1996.
36. 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, p.569-578, 1966.
37. ISOKANGAS, P. et al. Dental caries and mutans streptococci in the proximal areas of molars affected by the habitual use of xylitol chewing gum. Caries Res, Basel, v.25, p. 444-448, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

38. JACOBS, M.R., HORNFELOTT, C.S. Melaleuca oil poisoning. J Toxicol Clin Toxicol, New York, v.32, n.4, p.461-4, 1994.
39. JANDOUREK, A., VAISHAMPAYAN, J.K., VAZQUEZ, J.A. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. AIDS, Philadelphia, v.12, n.9, p.1033-7, 1998.
40. JENKINS, S., ADDY, M., NEWCOMBE, R. The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.20, n.1, p.59-62, Jan. 1993.
41. KIRKERGAARD, E. et al. Influence of chlorhexidine on in vitro uptake of fluoride in dental enamel. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.82, p.556-569, 1974.
42. KONEMAN, E. W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN JR., W.C. Introduction to diagnostic microbiology. 1.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.
43. LEARD, A., ADDY, M. The propensity of different brands of tea and coffee to cause staining associated with chlorhexidine. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.24, n.2, p.115-118, Feb. 1997.
44. LINDHE, J. et al. Long term effect of surgical/non surgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.11, p.448-58, 1984.
45. LINDQUIST, B. et al. Effect of different caries preventive measures in children highly infected with mutans streptococci. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.97, p.330-337, 1989.
46. LOESCH, W.J. et al. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun, Washington, v.11, p.1252-1260, 1975.
47. LÖVDAL, A. et al. Combined effect of subgingival scaling and controlled oral hygiene on the incidence of gingivitis. Acta Odontol Scand, Oslo, v.19, p.537-555, 1961.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

48. LUOMA, H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and fosforus content and acid production of cariogenic streptococci. Arch Oral Biol, Oxford, v.17, p.1431-1437, 1972.
49. MALTZ- TURKIENIEZ, M., KRASSE, B., EMILSON, C.G. Effects of chlorhexidine and iodine on in vitro plaques of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.88, p.28-33, 1980.
50. McDERMID, A.S. et al. Additive inhibitory effects of combinations of fluoride and chlorhexidine on acid production by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Caries Res, Basel, v.19, p.64-71, 1985.
51. MEURMAN, J.H. Ultrastructure, growth and adherency of *Streptococcus mutans* after treatment with chlorhexidine and fluoride. Caries Res, Basel, v.22, p.283-287, 1988.
52. NENOFF, P., HAUSTEIN, U.F., BRANDT, W. Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. Skin Pharmacol, Basel, v. 9, p. 388-394, 1996.
53. NETUSCHIL, L., REICH, E., BRECX, M. Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.16, p. 484-488, 1989.
54. NETUSCHIL, L. et al. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. Eur J Oral Sci, v.103, n.6, p. 355-361, Dec. 1995.
55. NORDBO, H. Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine and aldehydes or ketones *in vitro*. Scand J Dent Res, Copenhagen, v.79, n.5, p.356-361, 1971.
56. OWENS, J. et al. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.24, n.10, p.732-737, Oct. 1997.
57. PRAYITNO, S., ADDY, M. An *in vitro* study of factors affecting the development of staining associated with the use of chlorhexidine 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- development of staining associated with the use of chlorhexidine. J Periodontal Res, Copenhagen, v.14, n.5, p.397-402, Sep. 1979.
58. PUCHER, J.J., DANIEL, J.C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. J Periodontol, Chicago, v.63, n.6, p.526-532, Jun. 1992.
59. RAMACCIATO, J.C. et al. Efeito da *Melaleuca alternifolia* sobre estreptococos e *Staphylococcus aureus*. In: 16^o Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia, 1999, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: SBPQO, 1999, p.10.
60. RAMBERG, P. et al. A model for studying the effects of mouthrinses on de novo plaque formation. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.19, n.7, p.509-20, Aug. 1992.
61. RENTON-HARPER, P. et al. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. J Periodontol, Chicago, v.67, n.5, p.486-489, May 1996.
62. RØLLA, G., LÖE, H., SCHIØTT, C.R. The affinity of chlorhexidine for hydroxiapatite and salivary mucins. J Periodontal Res, Copenhagen, v.5, p.79-83, 1970.
63. _____, MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibitions by chlorhexidine. J Dent Res, Washington, v.54, p.1357-1362, 1975.
64. SCHAEKEN, M.J.M. et al. Effect of chlorhexidine and iodine on the composition of the human dental plaque flora. Caries Res, Basel, v.18, p.401-407, 1984.
65. SHASHIKANTH, K.N., BASAPPA, S.C., SREENIVASA-MURTHY, V. A comparative study of raw garlic extract and tetracycline on caecal microflora and serum proteins of albino rats. Folia Microbiol, Praha, v.29, n.4, p.348-52, 1984.
66. SOUCCAR, C., LAPA, A.J. Analgesic and anti-inflammatory screening of two Brazilian medicinal plants: A positive and a false-positive result. Ciência

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- e Cultura, v.49, n.5-6, p.416-21, Sep-Dec. 1997.
67. SUOMI, J.D. et al. The effect of controlled oral hygiene procedures on the progression of periodontal disease in adults: results after third and final year. J Periodontol, Chicago, v.42, p.152-160, 1971.
68. TOGELIUS, J. et al. *Streptococcus mutans* in saliva: intra-individual variations and relation to the number of colonized sites. Acta Odontol Scand, Oslo, v.42, p.157-163, 1984.
69. VENUGOPAL, P.V., VENUGOPAL, T.V. Antidermatophytic activity of garlic (*Allium sativum*) *in vitro*. Int J Dermatol, Lewiston, v.34, n.4, p.278-9, Apr. 1995.
70. WALSH, L.J., LONGSTAFF, J. The antimicrobial effects of an essential oil on selected oral pathogens. Periodontology, v.8, p.11-15, 1987.
71. WELLS, F.V., LUBOWE, I. I. Cosmetics and the skin. New York, Reinhold Publishing Corp, 1974.
72. WILLIAMS, L.R. Antimicrobial activity of oil of melaleuca (tea tree oil). Its potential use in cosmetics and toiletries. Cosmet Aerosols Toiletries Aust, v.4, n.4, p.12-22, 1990.
73. ZICKERT, I., EMILSON, C.G., KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. Infect Immun, Washington, v.39, p.982-985, 1983.
74. _____, _____, _____. Effects of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, Oxford, v.27, p.861-868, 1982.

12. ANEXOS

12.1. – ANEXO 01

12.2. – ANEXO 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações contidas neste termo foram fornecidas pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e pela aluna de mestrado C.D. Juliana Cama Ramacciato, com o objetivo de firmar o consentimento livre e esclarecido, através do qual você, sujeito da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre-arbítrio e livre de qualquer coação.

I. Título do Trabalho Experimental

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES À BASE DE ALHO (*Allium sativum*), ÓLEO DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*) E CLOREXIDINA, SOBRE MICRORGANISMOS TOTAIS E ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS. ESTUDO IN VIVO.

II. Justificativa

Apesar da proximidade de um novo século e dos avanços científicos, a humanidade ainda convive com doenças tão antigas quanto sua própria existência: a cárie e a doença periodontal.

Muito tempo, trabalho e dinheiro têm sido consumidos na tentativa de melhorar estes problemas. Novas pastas dentais, técnicas e diversos tipos de produtos vêm sendo colocadas no mercado para um número cada vez maior de consumidores. Grande parte destes produtos podem trazer junto de seus benefícios, diversos problemas, tais como o manchamento dentário e o gosto metálico ocasionado pela clorexidina.

O objetivo deste trabalho é testar uma substância natural, o alho (*Allium sativum*), em seres humanos, bem como de uma solução a base de clorexidina a 0,12% (já existente no comércio e usada com frequência), sobre a contagem de bactérias na saliva.

III. Objetivo

O presente estudo visa verificar a atividade antimicrobiana de três soluções, à base de alho, óleo de melaleuca e clorexidina, todas adicionadas de edulcorantes comumente usados em medicamentos.

IV. Procedimentos do Experimento

SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Conforme definido na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa será submetida à comissão de ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e só será realizada caso seja aprovada pela mesma.

Cada voluntário receberá um termo de consentimento onde constarão todos os detalhes do projeto. Somente após a anuência do voluntário, através da assinatura do termo, sem qualquer espécie de coação e com o esclarecimento de possíveis dúvidas, este será considerado participante da pesquisa.

Serão utilizados neste experimento 30 (trinta) indivíduos com as seguintes características:

1. Estudantes universitários de graduação e pós-graduação;
2. Idade entre 18 e 35 anos;
3. Saudáveis, isto é, sem apresentar patologias sistêmicas, que impeçam a utilização das substâncias em estudo;
4. Não tenham feito uso de nenhum enxagüatório bucal ou substância antimicrobiana, pelo menos há duas semanas antes do início do estudo;
5. Sem ausência de qualquer elemento dentário (à exceção dos terceiros molares) ou presença de próteses;
6. História de alergia ou outros problemas decorrentes do uso de qualquer um dos componentes de quaisquer das soluções a serem empregadas.

Estes voluntários serão selecionados através de anamnese e exame clínico.

O tipo de dentifício utilizado pelos indivíduos será padronizado durante todo o período de estudo, sendo utilizado o creme dental Tandy (Kolynos do Brasil) que contém fluoretode sódio (NaF) na sua composição.

SOLUÇÃO CONTROLE

Todos os 30 indivíduos selecionados receberão, na segunda semana, uma solução controle contendo o veículo utilizado nas soluções em teste (água destilada, esterilizada adicionada de essência de hortelã a 5% e sorbitol a 2%). Cada um dos 30 voluntários, receberá um frasco plástico contendo 300mL desta solução e deverá utilizar 10 mL em cada bochecho diário durante 1 minuto, 1 hora após a última escovação do dia, durante 7 dias consecutivos. Após o bochecho, os voluntários não poderão beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, dois e quatro dias após o início da utilização da solução controle e sem que o indivíduo interrompa o uso desta, serão enumeradas a

quantidade de microrganismos totais e *mutans*. A média individual dos resultados obtidos com este procedimento será considerada como valor do número de microrganismos totais e de *mutans*.

Decorrido esta semana, os voluntários serão divididos aleatoriamente em grupos de 10 e cada grupo será submetido a um dos três tratamentos.

TRATAMENTO COM O ALHO A 2,5 %

Serão obtidos no mercado local a variedade de alho (*Allium sativum*) branca, sendo as informações quanto ao tipo, a classificação, a região de procedência e a época provável da colheita fornecidas pela empresa distribuidora. A casca seca ao redor dos bulbos será removida e aqueles que se apresentarem intactos, sem qualquer sinal de infecção por fungos ou qualquer outra anomalia, serão utilizados.

Uma vez selecionados, 100 g de bulbos serão triturados em um liquidificador, por 10 min, com adição de 100 mL de água destilada. O produto resultante será duplamente filtrado em um sistema de filtragem à vácuo e esterilizado através da passagem por um filtro de membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro.

Este extrato resultante será considerado como sendo de concentração 25% e deverá ser diluído em água deionizada e esterilizada (adicionada de essência de hortelã a 5% e sorbitol a 2%) até atingir uma concentração de 2,5%. Cada um dos 10 voluntários, receberá um frasco contendo plásticos 300 mL desta solução e deverá utilizar 10 mL em cada bochecho diário durante 1 minuto, durante 7 dias consecutivos. Após o bochecho, os voluntários não poderão beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, dois e quatro dias após o início da utilização do tratamento e sem que o indivíduo interrompa-o, serão enumeradas a quantidade de microrganismos totais e *mutans*. A média individual dos resultados obtidos com este procedimento será considerada como o número de microrganismos totais e de *mutans* ocasionada pelo tratamento e será comparada ao valor de referência obtido na semana anterior.

TRATAMENTO COM O ÓLEO DE MELALEUCA A 0,2 %

Será utilizado um extrato proveniente de uma farmácia de manipulação (Galena farmácia de manipulação Ltda) cuja composição será analisada através de cromatografia gasosa (aparelho Kovatz 1. M., com temperatura de 240°C, gás hélio, fluxo 1mL/min e coluna DB1), devendo enquadrar-se no padrão tido como qualidade superior, ou seja, conter entre 2 e 5% ou menos de cineol e entre 40 a 47% ou mais de terpinen-4-ol (WILLIAMS et al., 1990).

Uma vez verificada a qualidade do extrato, este será diluído a uma concentração de 0,2% (v/v) em água destilada, deionizada e esterilizada, adicionando-se Tween 80 a 0,5%, sorbitol a 2% e essência de hortelã a 5%,

sendo 300 mL acondicionados em frascos plásticos. Cada um dos 10 voluntários, receberá um frasco e deverá utilizar 10 mL em cada bochecho diário durante 1 minuto, durante 7 dias consecutivos. Após o bochecho, os voluntários não poderão beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta semana, dois e quatro dias após o início da utilização deste tratamento e sem que o indivíduo interrompa-o, serão enumeradas a quantidade de microrganismos totais e *mutans*. A média individual dos resultados obtidos com este procedimento será considerada como o número de microrganismos totais e de *mutans* ocasionada pelo tratamento e será comparada ao valor de referência obtido na semana anterior.

TRATAMENTO COM CLOREXIDINA A 0,12 %

Utilizaremos uma solução de 200 mg de digluconato de clorexidina diluída em 100 mL de água destilada, deionizada e esterilizada, adicionando-se sorbitol a 2% e essência de hortelã a 5 %, sendo 300 mL acondicionados em frascos plásticos. Cada um dos 10 voluntários, receberá um frasco e deverá utilizar 10 mL em cada um dos dois bochechos diários durante 1 minuto, durante 7 dias consecutivos. Um bochecho deverá ser realizado à noite antes de dormir, após escovação e o outro pela manhã ao acordar, antes da escovação. Após o bochecho noturno os voluntários não poderão beber líquidos ou alimentarem-se durante pelo menos 2 horas.

Nesta segunda semana, dois e quatro dias após o início da utilização deste tratamento e sem que o indivíduo interrompa-o, serão enumeradas a quantidade de microrganismos totais e *mutans*. A média individual dos resultados obtidos com este procedimento será considerada como o número de microrganismos totais e de *mutans* ocasionada pelo tratamento e será comparada ao valor de referência obtido na semana anterior.

RETORNO AOS VALORES BASAIS

Decorrida a semana de tratamento, dois e quatro dias após a interrupção dos tratamentos serão enumeradas a quantidade de microrganismos totais e *mutans* de cada indivíduo. A média individual dos resultados obtidos com este procedimento será comparada com o número de microrganismos totais e de *mutans* do valor de referência obtido na primeira semana. Caso a diferença destes valores seja maior que dez vezes, na semana seguinte, até o limite de três semanas, serão tomadas as medidas novamente.

QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Nos dias marcados para a colheita da saliva os voluntários receberão 2g de parafina sólida e a mastigação por 2 min, para estimular a formação salivar (DASANAYAKE et al., 1995), sendo que os voluntários serão orientados para desprezar a saliva assim obtida. Será colhida, a seguir, 1 mL de saliva de cada

voluntário que será armazenada em um tubo de ensaio identificado com um código.

Os tubos com as amostras serão submetidos à dispersão em sonificador. As amostras serão diluídas 100 e 1000 vezes, com a adição de soro fisiológico esterilizado.

Das amostras de saliva diluídas serão pipetadas alíquotas de 5 µL, que serão espalhadas com auxílio de alça de Drigauski esterilizada, em duas placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 5mL de ágar *Mitis Salivarius* Bacitracina – (MSB) para contagem dos estreptococos do grupo *mutans* e outras duas contendo 5 mL de ágar base com 5% de sangue de carneiro desfribinado e estéril (BAS) para contagem de microrganismos totais.

Após a inoculação, todas as placas serão depositadas em estufa com 10% de pressão de CO₂ e a 37°C de temperatura, por 48 horas. Decorrido este período, as placas contendo BAS serão depositadas em estufa em aerobiose a 37°C de temperatura, por 24 horas.

Após estes períodos, serão estabelecidos, através de contagem manual, o número total de microrganismos no ágar sangue e o número de *mutans* nas placas contendo MSB.

MEDIÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS COLATERAIS

Nos dias de colheita de amostras de saliva, cada voluntário receberá um formulário, indagando sobre o gosto e odor das soluções e ainda possíveis alterações no paladar ou qualquer outro efeito desagradável, ocasionados pelo uso dos tratamentos ou controle.

Após o término do experimento, cada sujeito será submetido, segundo à sua vontade, a uma profilaxia profissional, com auxílio de taça de borracha e pedra pomes a ser executado pelos pesquisadores.

FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos serão analisados através da média da porcentagem de redução de microrganismos, considerando-se cada indivíduo, provocada pela utilização dos tratamentos contra os valores basais. Os dados obtidos serão submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

LOCAL DA PESQUISA

As fases laboratoriais tais como a obtenção das soluções de alho, de óleo de melaleuca e de clorexidina, manipulação dos meios de cultura e enumeração dos microrganismos serão desenvolvidas nos laboratórios da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As fases de seleção dos voluntários e distribuição dos mesmos em grupos, a coleta das amostras para enumeração dos microrganismos e medição de possíveis efeitos colaterais será feita nas dependências das clínicas de Especialização da Faculdade

de Odontologia de Piracicaba. Os sujeitos da pesquisa farão uso das soluções propostas em suas residências no período noturno.

RESULTADOS ESPERADOS

De acordo com o que mostra a literatura, esperamos com esta metodologia obter os seguintes resultados:

- 1 - Uma atividade antimicrobiana da solução de alho e/ou do óleo de melaleuca comparável (ou superior) àquela da clorexidina a 0,2%;
- 2 - Ausência de efeitos colaterais ou indesejáveis com relação às soluções.

ANÁLISE CRÍTICA DOS RISCOS E BENEFÍCIOS

Os riscos decorrentes deste projeto provavelmente serão os seguintes:

1. Manchamento dentário, presença de gosto metálico e adstringente na boca, quando do uso da solução a base de clorexidina;
2. Sensação de queimação ou ardência bem como odor desagradável, quando do uso da solução a base de alho ou de óleo de melaleuca;

Quanto aos riscos prováveis pelo uso da solução a base de clorexidina, pode-se dizer que são extensamente pesquisados e comprovados na literatura. A reversibilidade e a pequena importância dada a estes riscos também são comprovadas pela análise da literatura. Desta forma, caso algum destes sintomas apareçam, serão facilmente sanados após a interrupção da pesquisa. O manchamento é retirado pelo simples polimento dental profissional (que será oferecido a todos os participantes), o gosto metálico e adstringente desaparece um ou dois dias após a interrupção do uso da solução a base de clorexidina.

A sensação de queimação ou ardência e o odor desagradável não encontram respaldo na literatura e são citados aqui apenas como probabilidade em virtude das características observadas no alho. Vale lembrar que o alho é um alimento muito consumido e, no único relato existente na literatura indexada sobre de sua ação sobre estreptococos orais de pacientes, não existem citações de qualquer natureza sobre efeitos adversos, colaterais ou indesejáveis, quando foi utilizado em solução a 10%. Assim esperamos que, mesmo que apareçam quaisquer efeitos colaterais ou indesejáveis, estes sejam rapidamente sanados pela retirada do uso da solução a base de alho.

O óleo de melaleuca tem odor similar ao eucalipto e um sabor levemente adstringente podendo causar sensação de queimação na mucosa oral. Um relato de uso de 15 mL de uma solução à base do óleo (não há indicação da concentração utilizada) em pacientes aidéticos revelou que 8 entre 12 pacientes relataram sensação de queimação leve a moderada que cessou gradualmente após a primeira semana de uso (JANDOUREK, A.; VAISHAMPAYAN, J.K.; VAZQUEZ, J.A.

Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*, 12(9):1033-7, 1998).

Caso a atividade antimicrobiana do alho e do óleo de melaleuca mostre-se similar ou superior àquela da clorexidina, poderão substituir esta última com uma série de vantagens, tais como preço mais baixo, maior facilidade de confecção, menor toxicidade etc.

V. Desconfortos ou Riscos Esperados

Os desconfortos que possam eventualmente aparecer são:

- a) Ardência pelo uso das soluções;
- b) Manchamento superficial;
- c) Sensação de gosto metálico;
- d) Gosto ou odor ruins (ou estranhos) provocados pelo uso das soluções;
- e) Sinais de alergia;
- f) Resistência bacteriana às soluções.

VI. Benefícios do Experimento

O experimento visa testar a capacidade de matar bactérias de duas substâncias naturais, o alho e o óleo de melaleuca, em comparação com uma substância antibiótica já conhecida, a clorexidina.

Caso as substâncias demonstrem a atividade antimicrobiana esperada, pode ser uma alternativa futura importante à utilização da clorexidina.

VII. Forma de acompanhamento e assistência e garantia de esclarecimentos

Os voluntários tem a garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida, acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

Assumem também, os pesquisadores citados acima, o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando dele.

Ambos os pesquisadores acompanharão e assistirão os voluntários a todo momento, durante a pesquisa ou quando assim solicitados.

VIII. Retirada do Consentimento

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de retirar seu consentimento ou se recusar a participar, a qualquer momento e deixar de participar do estudo, conforme determinação da Resolução 196/96 do CNS do Ministério da Saúde. Caso

deixe de participar do estudo por qualquer razão o sujeito não sofrerá qualquer tipo de prejuízo.

IX. Garantia de sigilo

Comprometem-se os pesquisadores de resguardar todas as informações individuais acerca da pesquisa, tratando-as com impessoalidade e não revelando a identidade do sujeito que as originou.

X. Formas de ressarcimento de despesas e de indenização

Não estão previstas despesas aos indivíduos nesta pesquisa, porém caso ocorram, em função da pesquisa, ficam responsáveis os pesquisadores em ressarcí-las. Da mesma forma ficam responsáveis os autores em indenizar em comum acordo com os voluntários, eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

XI. Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido de todos os itens, pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e pela C.D. Juliana Cama Ramacciato, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

Piracicaba, ____ de _____ de 1999.

Nome: _____

Assinatura: _____

1ª via da instituição, 2ª via do sujeito da pesquisa

12.3. – ANEXO 03



Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas



USO EXTERNO

Bochechar diariamente 10 ml da solução (o equivalente a uma colher de sopa), durante um minuto, cerca de 1 hora após a última escovação, antes de dormir.

- **NÃO lavar a boca após o bochecho;**
- **NÃO comer e beber nada por pelo menos 2 horas após o bochecho;**
- NÃO ENGOLIR A SOLUÇÃO;
- NÃO DEIXAR AO ALCANCE DE CRIANÇAS.

Início ___/___/___

Término ___/___/___

Juliana Cama Ramacciato
Cirurgiã Dentista
CRO 972397

12.4 – ANEXO 04

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE SAÚDE

Marque na escala de 0 a 10 (abaixo), a nota você atribuiria para as seguintes sensações:

1) ardência ou queimação na boca pelo uso da solução:



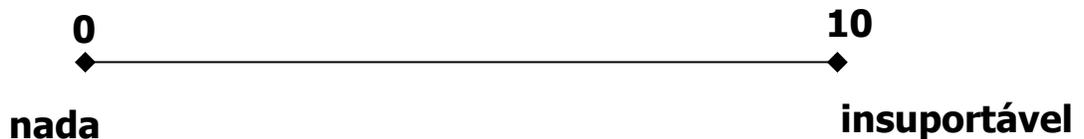
2) alteração de cor em seus dentes:



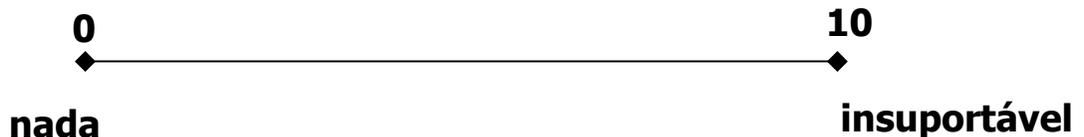
3) gosto desagradável ou alteração gustativa durante o uso da solução:



4) mudança do hálito durante o uso da solução:



5) alteração sistêmica durante o uso das soluções: (enjôos, diarreia, vômito, náuseas ou qualquer distúrbio que alterou sua rotina) – anote abaixo do final da escala o ocorrido:



ANEXOS

12.5 – ANEXO 05

Tabela 3
Médias de ufc de estreptococos/mL.

CLOREXIDINA							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	365	172	99	90	51	70	70
2	588.5	342	267	128	120	390	866
3	116.5	175	75	61	103	140	132
4	235	26	13	14	12	80	150
5	347.5	449	336	158	37	170	280
6	540	30	1311	21	47	120	250
7	230	27	33	23	32	30	30
8	130	171	54	57	86	170	160
9	133.5	86	94	30	47	120	160
10	369	1443	195	245	266	220	389
média	305.5	292.1	247.7	82.7	80.1	151	248.7
MELALEUCA							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	174.5	131	140	105.6	55.7	80	53
2	137.5	71	45	38.7	27.7	11	46
3	45.5	40	19	6	55.1	26	122
4	116.5	284	280	10.2	26.1	150	33
5	88.5	58	28	2.5	1.8	9	16
6	207.5	93	117	89.7	53.6	16	37
7	323.5	619	473	120.6	100.7	23	35
8	83.5	30	104	75.2	101.5	14	14
9	91.5	38	31	26.4	20.7	27	27
10	136.5	45	41	21.5	14.8	18	25
média	140.5	140.9	127.8	49.64	45.77	37.4	40.8
ALHO							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	226.5	451	482	819	819	306	94
2	157.5	85	81	73.1	41.6	87	66
3	150.5	62	514	130.9	219.8	42	24
4	218.5	404	515	122.1	86	10	10
5	795	538	480	290	104.5	218	55
6	398.5	397	540	64.4	59.5	97	569
7	333	164	86	28.2	19.8	41	41
8	154	234	213	122.6	90.3	27	83
9	444.5	40	32	26.8	28.1	21	49
10	95.5	214	77	82	28.1	50	50
média	297.35	258.9	302	175.91	149.67	89.9	104.1

ANEXOS

12.6 – ANEXO 06

Tabela 4

Médias de ufc de microrganismos totais/mL.

CLOREXIDINA							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	39200	22600	30500	23800	25750	6400	---
2	105950	67100	377400	38900	86450	3000	44400
3	89400	29400	23800	38050	46750	71800	15000
4	30700	48200	32300	12150	19600	31300	23900
5	39500	196000	70100	69600	67700	147500	66400
6	91300	66300	2300	90200	5450	61100	89200
7	170300	17000	96000	101700	85750	100600	---
8	95700	20000	28400	93600	40350	76300	61000
9	1900	14700	2200	6950	1250	3100	3500
10	102550	127500	38700	10050	49050	3100	52100
média	76650	60880	70170	48500	42810	50420	44437,5

MELALEUCA							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	29800	31600	62000	13000	41000	19000	---
2	43550	23600	5000	58000	8000	12000	12000
3	40450	26800	61000	13000	6000	2000	10000
4	96200	57900	12000	51000	16000	15000	---
5	59900	27000	46000	8000	4000	4000	8000
6	64050	61800	34000	27000	6000	2000	3000
7	25600	57000	33000	31000	25000	5000	19000
8	51050	61100	117000	20000	28000	9000	---
9	36400	---	8000	7000	60000	7000	5000
10	36600	37800	38000	19000	47000	2000	7000
média	48360	42733,3	41600	24700	24100	7700	9142,9

ALHO							
voluntário	basal	controle 1	controle 2	ativo 1	ativo 2	semana1	semana 2
1	25150	26400	21000	26000	24000	15000	12000
2	33700	36300	36000	41000	43000	12000	13000
3	35600	62300	139000	44000	9000	15000	16000
4	43350	54200	25000	24000	17000	6000	5000
5	92200	31300	25000	54000	99000	7000	21000
6	300	31500	11000	37000	29000	7000	17000
7	90850	58100	8000	40000	68000	---	10000
8	39600	31300	159000	34000	5000	4000	23000
9	84550	66200	13000	26000	48000	12000	50000
10	68700	57100	38000	12000	39000	6000	---
média	51400	45470	47500	33800	38100	9333,3	18555,6

12.7 – ANEXO 07

Tabela 5

Dados obtidos com a aplicação de questionário.

		nenhuma	leve	moderada	grave	severa
Efeitos Sistêmicos	Clorexidina	100	0	0	0	0
	Melaleuca	90	-10	0	0	0
	Alho	70	-10	-20	0	0
Hálito	Clorexidina	60	20	20	0	0
	Melaleuca	80	10	10	0	0
	Alho	10	-50	-20	0	-20
Gosto da Solução	Clorexidina	60	-20	-20	0	0
	Melaleuca	70	-20	-10	0	0
	Alho	0	-40	-20	0	-40
Alteração da Cor	Clorexidina	100	0	0	0	0
	Melaleuca	80	10	10	0	0
	Alho	100	0	0	0	0
Ardência ou Queimação	Clorexidina	60	-30	-10	0	0
	Melaleuca	40	-40	-20	0	0
	Alho	0	-30	-60	-10	0

Legenda: Valores positivos representam efeitos considerados benéficos e negativos representam efeitos maléficos.

12.8 – ANEXO 08

Tabela 6

Dados obtidos com a aplicação de questionário.

clor

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	62.9	48	0.7
2	48.3	59.3	0
3	0	34.4	0
4	91.7	33.3	0
5	0	75.2	0
6	0	94.9	0
7	87	8.3	0
8	13.5	36.4	0
9	32.6	57.2	0
10	0	68.8	0
<u>média</u>	33.6	51.58	0.07

mela

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	22.3	40.5	17.5
2	57.8	42.8	14.2
3	35.2	0	0
4	0	93.6	0
5	51.4	95	0
6	49.4	31.8	63
7	0	79.7	73.8
8	19.8	0	84.2
9	62.3	31.7	0
10	68.5	57.8	0
<u>média</u>	36.67	47.29	25.27

alho

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	0	0	75.6
----------	---	---	------

ANEXOS

2	47.3	30.9	0
3	0	39.1	81.2
4	0	77.4	90.4
5	36	61.2	30.8
6	0	86.8	0
7	62.5	80.8	0
8	0	52.4	48.3
9	91.9	23.8	0
10	0	62.2	9.2
<u>média</u>	23.77	51.46	33.55

totais
clor

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	32.3	6.7	74.2
2	0	71.8	62.2
3	70.2	0	0
4	0	60.6	0
5	0	48.4	0
6	62.4	0	0
7	66.8	0	0
8	74.7	0	0
9	0	51.5	19.5
10	19	64.4	6.6
<u>média</u>	32.54	30.34	16.25

mela

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	0	42.3	29.6
2	67.2	0	63.6
3	0	78.4	36.8
4	63.7	4.1	55.2
5	39.1	83.6	0
6	25.2	65.6	84.8
7	0	37.8	57.1
8	0	73	62.5
9	78	0	82.1
10	0	12.9	86.4

ANEXOS

<u>média</u>	27.32	39.77	55.81
---------------------	-------	-------	-------

alho

voluntário Controle Ativo quarta/quinta

1	5.8	0	46
2	0	0	70.2
3	0	73.7	41.5
4	8.7	48.2	73.2
5	69.5	0	81.7
6	0	0	63.6
7	63.6	0	81.5
8	0	79.5	30.8
9	53.2	6.6	16.2
10	30.8	46.4	76.5
<u>média</u>	23.16	25.44	58.12