UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PAULO LINARES CALEFI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS BIOADESIVOS POLIMÉRICOS
CONTENDO METRONIDAZOL, PARA TRATAMENTO DE PERIODONTITE CRÔNICA:
ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO E CONTROLADO EM HUMANOS.**

Ribeirão Preto

2017

PAULO LINARES CALEFI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS BIOADESIVOS POLIMÉRICOS
CONTENDO METRONIDAZOL, PARA TRATAMENTO DE PERIODONTITE CRÔNICA:
ESTUDO CLÍNICO RANDOMIZADO, DUPLO-CEGO E CONTROLADO EM HUMANOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de **Doutor em Odontologia**.

Área de concentração: **Reabilitação Oral**

Departamento de Materiais Dentários e Prótese

Orientador: **Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi**

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO, CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP -
Ribeirão Preto

Calefi, Paulo Linares

Desenvolvimento e avaliação de sistemas bioadesivos
poliméricos contendo metronidazol para tratamento de periodontite
crônica: estudo clínico randomizado, duplo-cego e controlado em
humanos.

112 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração:
Reabilitação Oral.

Orientador: Pedrazzi, Vinícius.

1. Periodontite Crônica. 2. Metronidazol. 3. Sistema de
liberação de fármacos. 4. DNA Checkerboard 5. Parâmetros Clínicos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paulo Linares Calefi

Desenvolvimento e avaliação de sistemas bioadesivos poliméricos contendo metronidazol para tratamento de periodontite crônica: estudo clínico randomizado, duplo-cego e controlado em humanos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Presidente da Banca Assinatura: _____

Dedico este trabalho

“Aos meus pais”

Minha mãe que me deu a vida da maneira mais especial que alguém poderia fazer, meu porto seguro, suporte e aconchego. Meu amor por você é infinito. E ao meu pai que mesmo longe pessoalmente está comigo a todo o momento, em meu coração, pensamentos e ações, só você é capaz de encarar todas comigo, assoprando o que fazer e como ser, saudades meu pai!

Agradecimentos especiais

Ao querido Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi, amigo, orientador, e mentor. Desde a graduação até o doutorado sempre receptivo e disponível de uma maneira que poucos seres humanos são, só posso agradecer por todos os ensinamentos, pela sabedoria, pela compreensão e principalmente pela confiança em meu trabalho, meus anseios, e a maneira que conduz a nossa amizade e relação de mestre e aprendiz! Passei os melhores anos compartilhando o que poderia ter de melhor para minha formação profissional e pessoal, tendo você meu mestre como espelho!!

Meus sinceros agradecimentos

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, que com toda sua paciência, experiência de vida e acadêmica, e principalmente a pessoa que é, soube conduzir de maneira brilhante e especial esses cinco anos de convívio, trocas de informações e boas conversas, sendo um dos principais responsáveis por eu chegar até aqui.

Um agradecimento especial a minha namorada, Livia. Minha Melhor Amiga, confiante, companheira que me acompanha de perto nesses três anos de pesquisa e soube me confortar, vibrar e acreditar sempre no meu potencial da melhor maneira possível, além de não medir esforços para me ajudar quando foi preciso. Amo você, e teremos uma vida pela frente.

Agradecimentos

À Deus pela presença constante e por ter me dado forças para vencer mais um desafio.

À minha família (irmã, avós, tios, primos) que sempre me incentivaram a buscar o melhor e o que me fizesse feliz, sempre com retidão e respeito.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, a qual considero minha segunda casa e da qual tenho um imenso orgulho, por todo conhecimento adquirido durante todos estes anos, onde obtive minha formação como Cirurgiã-Dentista e Mestre e pela oportunidade da realização do curso de Doutorado nas pessoas da Diretora Profa. Dra Léa Assed Bezzerra da Silva e do Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior

Aos docentes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, nas pessoas da chefe de Departamento Profa. Dra. Valéria Oliveira Pagnano de Souza e da Vice-chefe Prof. Dr. Wilson Matsumoto, pelo afável convívio e pela contribuição indispensável para minha formação como Doutor.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação na área de Reabilitação Oral, Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro e à sua antecessora Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes, pelo excelente trabalho realizado no curso, pelo apoio e incentivos constantes.

Às funcionárias do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Regiane de Cássia Tirado Damasceno, Fernanda Talita de Freitas e Denise Martins Fontes Gonçalves, pelos esclarecimentos constantes, pela paciência em me ajudar sempre que precisei.

A todos os funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, e da FORP-USP, pela alegre convivência e pela boa vontade com que me ajudaram sempre que foi preciso.

À Izabel Cristina Galino Sola e à Mary Possani Carmessano, secretárias da pós-graduação, eficientes e responsáveis durante a jornada de trabalho e pela disponibilidade em me atender sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Cássio do Nascimento, pela gentileza, paciência, disponibilidade e ajuda durante toda realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Paulo Ribas, pela amizade, disponibilidade, orientação e constante participação valiosa neste trabalho.

Às companheiras de Pós-Graduação Maria Paula Peixoto e Máira Peres Ferreira, do Departamento de Ciências Farmacêuticas a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela gentileza com que me receberam, pelo companheirismo e pela dedicação conjunta que foram muito valiosas para a realização do trabalho.

Um agradecimento especial aos amigos Murillo Sucena Pita, Raony Mólím de Sousa Pereira, Mônica Danielle Ribeiro Bastos, pelo companheirismo, amizade, generosidade, e, sobretudo, pelo exemplo de competência e de caráter, que os fazem tão admiráveis.

Aos voluntários desta pesquisa: Pessoas incríveis que se prontificaram a contribuir com a pesquisa em saúde. Pela confiança em meu trabalho, pela solicitude e, acima de tudo, pela colaboração em benefício do bem comum.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação – MEC), pela bolsa de estudo fornecida, que me auxiliou em muito neste momento tão importante de minha vida.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

CALEFI, PL. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas bioadesivos poliméricos contendo metronidazol para tratamento de periodontite crônica: estudo clínico randomizado, duplo cego e controlado em humanos.** 2017. 112 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar *in vivo* sistemas bioadesivos semissólidos (géis) e filmes contendo metronidazol e benzoato de metronidazol microencapsulado, liberado modificadamente intrabolsa periodontal, em pacientes submetidos a tratamento convencional para periodontite crônica (Raspagem e Alisamento Radicular - RAR) e a tratamento associado RAR ao gel ou ao filme. Foi realizado um estudo clínico controlado, randomizado e duplo-cego em humanos, para testar a hipótese de que o uso associado do sistema de liberação local (filme ou gel) à raspagem e alisamento radicular (RAR) é superior à terapia isolada. Participaram do estudo 45 pacientes de ambos os gêneros, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP, os quais possuíam ao menos 2 dentes com periodontite crônica, totalizando para o estudo um “n” de 96 dentes, divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo 1 – raspagem e alisamento radicular (RAR) – controle ativo; grupo 2 - RAR + gel de metronidazol; grupo 3 – RAR + filme com metronidazol. As concentrações dos fármacos e o tempo de liberação no fluido crevicular gengival foram monitorados. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelo acompanhamento longitudinal de parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem) com o uso de sonda periodontal computadorizada e analisados estatisticamente por meio de ANOVA e pós-teste de Bonferroni, e microbiológicos da periodontite pela técnica de DNA-DNA Checkerboard Hibridization. Os resultados da análise das concentrações de metronidazol e benzoato de metronidazol nas bolsas periodontais dos pacientes foram considerados em avaliação paralela intragrupos e demonstraram que os fármacos foram detectados em concentração efetiva até 48 horas após a aplicação *in situ*, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados. Para os parâmetros microbiológicos foi detectada diferença estatística (teste de Friedmann, para valores de $p < 0,05$) em relação aos grupos com utilização dos fármacos comparado ao grupo somente com a RAR. Conclui-se que o tratamento com os fármacos em ambas formas farmacêuticas (gel e filme), foi mais efetivo que o controle para a redução significativa dos microrganismos, tornando-se alternativa terapêutica de grande valia.

Palavras chave: Periodontite crônica, Metronidazol, Sistema de liberação de fármacos, DNA Checkerboard, Parâmetros Clínicos.

CALEFI, PL. **Development and evaluation of polymeric bioadhesive systems containing metronidazole for the treatment of chronic periodontitis: a double-blinded, randomized and controlled clinical study in humans.** 2017. 112 f . Thesis (Doctoral) – University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2017.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and evaluate *in vivo* bioadhesive semisolid systems (gels) and films containing metronidazole and metronidazole benzoate microencapsulated, modified release periodontal intrapocket, in patients undergoing conventional treatment for chronic periodontitis (RAR) and associated with RAR gel or film. A double - blind controlled human clinical trial was conducted to test the hypothesis that the use of the local delivery system (film or gel) to scaling and root planing (RAR) is superior to the isolated therapy. The study consisted of 45 patients from the Dental School of Ribeirão Preto - USP, both of whom had at least 2 teeth with chronic periodontitis, comprising a total of 96 teeth, randomly divided into 3 groups: group 1 - Scaling and root planing (RAR) - active control; Group 2 - RAR + gel with metronidazole Group 3 -. RAR + film with metronidazole; drug concentrations and release time in the gingival crevicular fluid were monitored. The effects of the treatments were evaluated by the longitudinal monitoring of clinical parameters (depth of probing, clinical level of insertion and bleeding to the probing) and analyzed statistically by ANOVA and Bonferroni post-test, and microbiological periodontitis by DNA-DNA Checkerboard Hybridization. The results of the analysis of metronidazole and metronidazole benzoate concentrations in patients' periodontal pockets were considered in parallel intragroup analyzes and demonstrated that the drugs were detected in effective concentration up to 48 hours after the *in situ* application, but no significant difference was observed between the Groups evaluated. For the microbiological parameters a statistical difference was detected (Friedmann test, for values of $p < 0.05$) in relation to the groups using the drugs compared to the RAR only group. It was concluded that the treatment with the drugs in both pharmaceutical forms (gel and film), was more effective than the control for the significant reduction of the microorganisms, becoming a therapeutic alternative of great value.

Keywords: chronic periodontitis, drug delivery systems, metronidazole, clinical evaluations, DNA-Checkerboard

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular

SRP - Scale and Root Planing

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC - High performance liquid chromatography

PDT - Terapia fotodinâmica antimicrobiana

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

MDZ - Metronidazol

BMDZ – Benzoato de Metrinidazol

UV – Luz Ultravioleta

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLA – Poliéster Poli DL-Lactídeo

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

FDA – “Food and Drug Administration”

PEG 400 – Polietilenoglicol 400

LPDF – Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacocinético

PS – Profundidade de Sondagem

NIC – Nível de Inserção Clínica

NCI – Nível Clínico de Inserção

SS – Sangramento à Sondagem

USP – Universidade de São Paulo

FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

TE – Tampão Tri-Acetato-EDTA

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

µg – Micrograma

mL – Mililitro

p – Nível de Significância

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição da dispersão para preparo do filme.....	45
Tabela 2.	Composição da formulação para preparo do sistema semissólido	46
Tabela 3.	Microrganismos utilizados no experimento de DNA Checkerboard.....	55
Tabela 4.	Estatística descritiva dos dados de concentração de fármacos no fluido gengival, 48 horas após a aplicação da formulação.....	66
Tabela 5.	Dados de número de pacientes avaliados e porcentagem de sangramento à sondagem para cada tratamento.....	71
Tabela 6.	Nível clínico de inserção e sulco gengival dos pacientes tratados com os procedimentos de Raspagem e alisamento radicular (RAR), RAR+filme, RAR+gel	72
Tabela 7.	Valores de P para os diferentes tratamentos para todos os tempos analisados (T0, T7, T15, T30, T90, T180).....	75
Tabela 8.	Média (x105) e desvio padrão ($\pm$ DP) da contagem genômica pela análise de DNA Checkerboard para bactérias de maior relevância na doença periodontal.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISTA DA LITERATURA.....	21
2.1 Etiologia da doença periodontal e seus tratamentos	18
2.2 Adjuvantes terapêuticos no tratamento convencional da doença periodontal.....	20
2.3 Sistemas de liberação de fármacos no tratamento da doença periodontal.	25
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Preparo dos filmes e géis contendo metronidazol e benzoato de metronidazol.....	44
4.1.1 Sistema filmógeno	44
4.1.2 Sistema semissólido	42
4.2 Avaliação <i>in vivo</i> das formulações	45
4.3 Preparo inicial do paciente.....	48
4.4 Protocolo clínico de aplicação, determinado por estudo piloto e após o desenvolvimento das formulações - gel e filme	49
4.5 Quantificação de fármaco presente no fluido crevicular gengival	50
4.6 Avaliação dos parâmetros clínicos indicadores de periodontite	52
4.7 Avaliação dos parâmetros microbiológicos indicadores da periodontite	54
4.7.1 Colheita das amostras de biofilme subgengival	54
4.7.2 Análise da microbiota local pelo método DNA Checkerboard	54
4.7.3 Obtenção das sondas de DNA Genômico	54
4.7.4 Confeção das sondas genômicas de DNA	56
4.7.5 Verificação da sensibilidade e especificidade das sondas marcadas	56
4.7.6 Processamento e aplicação das amostras	57
4.7.7 Pré-hibridização das amostras	58
4.7.8 Aplicação das sondas de DNA marcadas e reação de hibridização ..	59
4.7.9 Lavagem para remoção das sondas	60
4.7.10 Detecção dos sinais de Hibridização	60
4.7.11 Exposição da membrana e revelação	61
4.7.12 Interpretação dos sinais de Hibridização	61
4.8 Análise dos Resultados	62
4.8.1 Avaliação dos indicadores clínicos da periodontite	62
4.8.2 Avaliação dos indicadores microbiológicos da periodontite.....	63

4.8.3 Análise dos dados.....	64
5 RESULTADOS	66
5.1 Quantificação de fármacos no fluído gengival.....	66
5.2 Resultados da análise dos parâmetros clínicos	69
5.2.1 Sangramento à sondagem.....	69
5.2.2 Profundidade de sondagem e Nível clínico de inserção	71
5.3 Avaliação dos indicadores microbiológicos da periodontite.....	74
5.4 Avaliação da permanência do filme e do gel em relação ao tempo	77
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICES.....	105
APÊNDICE A – Exemplo do <i>software</i> para as 35 espécies analisadas aplicando-se o teste de Friedmann. Gerando 35 tabelas semelhantes para cada grupo. Total de 105 telas idênticas a abaixo.....	105
APÊNDICE A2 – Exemplo do <i>software</i> tabulação dos resultados obtidos pela análise da quantificação do DNA Checkerboard.	105
APÊNDICE B (B1 / B2)– Gráficos representam os dados obtidos no denominado intragrupo para a profundidade de sondagem.	105
APÊNDICE C(C1 / C2) – . Gráficos representam os dados obtidos no denominado intragrupo para a profundidade de sondagem.....	105
APÊNDICE D (D1 e D2)– Gráficos representam os dados obtidos no denominado intragrupo para a profundidade de sondagem.	105
ANEXOS.....	111
ANEXO 1 - Certificado de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Forp-USP	111
Anexo 2 - Exemplo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado no estudo.....	111

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Doenças periodontais são reações inflamatórias localizadas, que atingem as estruturas que dão suporte aos dentes. Os estágios iniciais da doença são conhecidos por um acúmulo de biofilme bacteriano na região supragengival, estimulando a inflamação dos tecidos gengivais, conhecida como gengivite. À medida que a inflamação avança em direção aos tecidos periodontais de suporte, um espaço conhecido como bolsa periodontal, é formado entre as raízes dos dentes afetados e os tecidos moles. Dentro da bolsa periodontal, um biofilme subgengival se organiza e a inflamação passa a ser conhecida como periodontite, a qual pode levar à perda dental¹.

O tratamento das periodontites consiste na remoção mecânica do biofilme e cálculo supra e subgengival pelo Cirurgião-dentista, por meio do procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR) objetivando a desinfecção local².

Em casos mais agressivos, pode-se lançar mão de técnicas cirúrgicas para o tratamento de bolsas periodontais remanescentes, ou ainda de antimicrobianos, especialmente para controlar e/ou debelar infecções periodontais severas e que existam maior dificuldade em se realizar a raspagem de maneira completa e eficiente³.

As infecções causadas pelo crescimento excessivo de um número determinado de bactérias anaeróbias Gram-negativas são demonstradas na literatura por estudos microbiológicos^{3, 4, 5}.

Assim as terapias que visam à eliminação ou ao menos a diminuição de patógenos específicos têm sido propostas como forma de solução para as doenças periodontais, que acometem uma parcela significativa da população mundial, possuindo efeitos sistêmicos importantes, como: doenças cardíacas, diabetes, abortos espontâneos, entre outros.

O tratamento dessas infecções, é baseado na administração sistêmica ou local de agentes antimicrobianos. Porém o uso sistêmico e indiscriminado de antibióticos trás à tona algumas preocupações. A administração prolongada aumenta o risco de desenvolvimento de resistência a antibióticos, e também o surgimento de efeitos adversos, como náuseas, diarreia ou outros problemas gastrintestinais.

A partir do fim da década de 1970, foi proposta a utilização de sistemas de liberação de fármacos intra-bolsa periodontal, e desde então, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com foco no desenvolvimento. Assim o desenvolvimento de sistemas para a liberação local e modificada de fármacos em bolsas periodontais torna-se uma área de pesquisa atraente, e que permite atingir maiores concentrações do fármaco somente nos locais onde ele é mais necessário, com maior efetividade, e ainda minimizando os possíveis efeitos colaterais.

Os sistemas de liberação local de fármacos consistem num reservatório contendo o fármaco e um elemento controlador da taxa de liberação do antimicrobiano, ou fármaco a ser utilizado para uma determinada terapia. Alguns exemplos são, as Fibras, filmes, micropartículas ou formulações semissólidas (géis) preparados com polímeros biodegradáveis ou não.

Diferentes compostos e formas de apresentação desses sistemas têm sido desenvolvidos, sendo portando, necessária a avaliação do comportamento e eficácia destes fármacos; porém, atingir o objetivo, não é tarefa fácil, devido às restrições anatomofisiológicas inerentes às bolsas periodontais. Sendo assim, foi premissa deste estudo laboratorial e clínico, o desenvolvimento e análise da liberação controlada de um filme e um gel contendo metronidazol e benzoato de metronidazol e de seus resultados clínicos e microbiológicos, como adjuvante da terapia periodontal básica em pacientes com periodontite crônica.

Diversos agentes antimicrobianos foram propostos para o tratamento das periodontites, porém o metronidazol tem se mostrado particularmente adequado devido ao seu espectro de ação, que atinge os microrganismos anaeróbios estritos, os quais estão entre os responsáveis pelas infecções periodontais, além de ter efeitos colaterais limitados quando comparados por exemplo com as tetraciclínas, que por seu excessivo uso levou à seleção de bactérias multirresistentes ou perturbação da microbiota normal do organismo.

O fármaco selecionado para este estudo é comprovadamente, eficaz e seguro, com ampla documentação por artigos científicos de relevante impacto 3,4,5,7,9,13,35,37,39,46)

2 Revista da Literatura

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 A etiologia da Doença Periodontal e seus tratamentos

Desde o início dos relatos da existência humana revelam-se que alguns tipos de terapias sempre foram usados para aliviar e/ou sanificar patologias, decorrentes da quebra da homeostase, e a rota mais conveniente e empregada de administração, tem sido a via oral⁷.

A doença periodontal juntamente com a cárie são as doenças de maior prevalência em todo o mundo de acometimento bucal, sendo descritas como “doenças universais”, e consomem bilhões de dólares anualmente com pesquisas e desenvolvimento de técnicas restauradoras e/ou reabilitadora oral. Observa-se cada vez mais que todo tratamento curativo quando não atrelado a técnicas preventivas fica fadado ao insucesso e/ou sucesso parcial⁶.

Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que as formas mais graves da periodontite acometem entre 10 e 15% da população mundial⁵.

O tratamento da doença periodontal tem como finalidade a redução do número de bactérias patogênicas, a cura dos tecidos inflamados e a eliminação da bolsa⁸, sendo o procedimento convencional a remoção mecânica do biofilme e cálculo dentário supra e subgingival por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR)⁹. O uso de antibióticos é indicado em casos de pacientes não

colaboradores, recorrentes ou que apresentam vários dentes afetados, segundo orientação da Academia Americana de Periodontologia (AAP)¹⁰, com a possibilidade de uso de sistemas locais ou antibióticos de ação sistêmica¹¹.

As formulações para aplicação local na periodontite apresentam vantagens em relação às de ação sistêmica no que diz respeito à ocorrência de efeitos colaterais e a eficácia do tratamento, em função de diminuir a necessidade de administrações frequentes.

Sabe-se que um vasto número de afecções que acometem o ser humano tem origem na cavidade oral, ou pelo menos se iniciam no sistema estomatognático. Este é um complexo que engloba, dentre outras estruturas, os ossos, dentes, gengivas, glândulas, articulações, mucosas, vasos sanguíneos e linfáticos, músculos, etc ⁷, que torna um local de fácil disseminação de patógenos para todo o corpo.

A causa primária da doença periodontal é a infecção bacteriana, a qual apresenta etiologia multifatorial, com o acúmulo do biofilme bacteriano no sulco gengival que estimula a liberação de várias toxinas, e na tentativa de impedir que os microrganismos se disseminem e invadam os tecidos, o hospedeiro responde a esta infecção por meio de processos inflamatórios e imunológicos, os quais podem levar à destruição tecidual, gerando perda de inserção gengival, mobilidade dental e em maior gravidade, a perda do elemento dental, sucessivamente⁸.

De acordo com a classificação da doença periodontal o grau de inflamação envolvido é quem determina sua nomenclatura diagnóstica, como gengivite ou periodontite. A gengivite é a fase inicial da doença, decorrente das más condições

de higiene oral, em que após o acúmulo de biofilme bacteriano, surgem os sinais clínicos da inflamação como; hiperemia, edema e sangramento gengival. Porém, apresenta-se com um quadro reversível frente ao tratamento que consiste na correta higienização bucal associada às terapias convencionais de tratamento periodontal^{9,10}.

Entretanto, quando não tratada, a inflamação se exacerba e pode atingir os tecidos periodontais de sustentação e de suporte, que progride à reabsorção tecidual e óssea, desenvolvendo as chamadas bolsas periodontais. Nesses casos, a terapia periodontal torna-se mais complexa, e há a necessidade da associação de adjuvantes terapêuticos ao tratamento periodontal convencional^{9, 10}.

2.2 Adjuvantes terapêuticos associados ao tratamento periodontal convencional

O principal objetivo da terapia periodontal é a biocompatibilização da superfície radicular permitindo o restabelecimento da saúde do periodonto, por meio da eliminação do biofilme dental, tendo em vista que este constitui a principal causa da doença. Quando a terapia utilizada é eficaz em reduzir espécies bacterianas periodontopatogênicas, ocorre a diminuição da inflamação, a redução da profundidade de sondagem e a adesão epitelial, mantendo níveis de inserção clínica estáveis ao longo do tempo^{11, 12}.

O tratamento clássico das periodontites, considerado padrão ouro, é a raspagem e alisamento radicular (RAR). É um tratamento eficiente, e consiste na remoção mecânica do biofilme e cálculo subgengival, por meio de instrumentos manuais ou ultrassônicos, com consequentes benefícios em relação à composição

da microbiota local e nos parâmetros clínicos periodontais¹³⁻¹⁵.

Entretanto, em alguns casos a RAR parece não ser capaz de devolver ou manter a saúde periodontal, devido à permanência de certos microrganismos patogênicos como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Prevotella intermedia*¹⁶⁻¹⁸.

Sítios periodontais severamente comprometidos, com bolsas muito profundas e de difícil acesso à instrumentação manual, podem não apresentar uma resposta positiva ao tratamento convencional¹⁹.

A capacidade de alguns patógenos penetrarem nos tecidos periodontais e orais, podendo transformar estas áreas em reservatórios de microrganismos, com consequente re-infecção do local tratado, foi relatada por alguns autores²⁰⁻²². Fatores sistêmicos modificadores da resposta do hospedeiro também podem estar relacionados ao insucesso do tratamento mecânico.

Sbordone (1990)²³ relatou que a recolonização de bolsas periodontais por determinadas bactérias periodontopatogênicas pode ocorrer 60 dias após a terapia mecânica. Desta forma, os benefícios obtidos com a raspagem e alisamento radicular podem ser instáveis a longo prazo²⁴.

Visando a saúde do periodonto, o debridamento periodontal repetido é requerido como forma de manutenção e suporte da terapia periodontal, reduzindo a quantidade de microrganismos patogênicos nos sítios subgengivais. Entretanto, em sítios com menor profundidade de sondagem, a técnica de raspagem e alisamento radicular pode traumatizar o periodonto e causar perda de inserção¹⁸.

Diante destes fatos, a instituição de uma terapia coadjuvante no tratamento da doença periodontal pode ser necessária ou fundamental⁵.

A administração de agentes antimicrobianos tem sido um importante complemento do debridamento mecânico, uma vez que o uso sistêmico ou local de antibióticos pode eliminar ou diminuir patógenos periodontais específicos²⁵.

Estudos têm demonstrado que a terapia antibiótica isolada ou associada ao tratamento periodontal convencional promove melhora nos parâmetros clínicos, imunológicos e microbiológicos de diversas enfermidades periodontais^{15, 26}.

A administração sistêmica de antibióticos como coadjuvantes da terapia convencional pode atingir concentrações na saliva e no fluido gengival de maneira a atingir patógenos periodontais nos sítios extracreviculares e também em áreas subgengivais não alcançadas pela instrumentação mecânica²⁷.

Entretanto, Johnson et al. (2008) observaram a presença de certas espécies periodontopatógenas junto às células epiteliais após a antibioticoterapia sistêmica com amoxicilina e metronidazol, confirmando a hipótese de recolonização de sítios periodontais por reservatórios bacterianos extracreviculares.

Mombelli & Samaranayake (2004)²⁶ relataram em um artigo de revisão que o uso dos antibióticos sistêmicos pode melhorar parâmetros clínicos e reduzir consideravelmente os microrganismos de bolsas periodontais desde que estes fármacos sejam selecionados de acordo com a microbiota local.

Na tentativa de estabelecer uma terapêutica periodontal eficaz, muitos antibióticos foram testados. A tetraciclina foi o antimicrobiano mais avaliado dentro da literatura, seguido por seus derivados, a doxiciclina e a minociclina, e outros fármacos como a amoxicilina, a azitromicina, o metronidazol e a associação deste com amoxicilina^{21, 28, 29}.

Nas últimas décadas, estudos que avaliam o uso do metronidazol como auxiliar da terapia periodontal básica têm sido intensificados em decorrência de seus efeitos benéficos^{11, 25, 28, 30, 31}.

De acordo com Löfmark, Edlund e Nord (2010)³², o metronidazol é a droga de escolha para infecções anaeróbias, especialmente por sua eficiência contra estes tipos de patógenos, baixas taxas de resistência microbiana e favoráveis farmacodinâmica e farmacocinética, além de apresentar poucos efeitos adversos e baixo custo. Por outro lado, quando utilizado em infecções onde não há evidência de microrganismos anaeróbios, sua ação é insignificante³³.

Quanto ao mecanismo de ação, o metronidazol é um quimioterápico que causa morte celular por interferir na síntese de DNA bacteriano. É absorvido quando utilizado por via oral, apresentando potencial para atravessar barreiras teciduais, e dessa forma atingir concentrações semelhantes no plasma, saliva e fluido gengival^{27,34}. Sua metabolização ocorre principalmente no fígado, havendo formação de metabólitos como o ácido metabólico e o hidroximetabólito, sendo este último o mais importante clinicamente por sua atividade antimicrobiana.

Segundo Loeche et al. (1991; 1993)^{28, 30} o uso do metronidazol sistêmico pode reduzir a necessidade de intervenção cirúrgica em alguns tipos de periodontite.

Em 2001, Feres et al.¹¹, comparando o efeito de antibióticos sistêmicos, observaram melhores resultados clínicos e microbiológicos com o uso do metronidazol em relação à amoxicilina. De acordo com os autores, o metronidazol foi capaz de reduzir as bactérias dos complexos vermelho e laranja. Por outro lado, espécies consideradas benéficas como *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga*, foram pouco afetadas por este composto.

Ao instituir uma antibioticoterapia por via sistêmica a um paciente com periodontite, podem ocorrer alguns efeitos adversos, tais como náuseas, vômitos, diarreias, dores abdominais, vertigem, dores de cabeça, gosto metálico ou mesmo manchamento dos dentes³⁵.

Além disso, o uso sistêmico requer, muitas vezes, a utilização de altas doses do agente antimicrobiano por um longo período de tempo para atingir concentrações adequadas no fluido gengival, possibilitando uma alteração da flora bacteriana e desenvolvimento de microrganismos resistentes. Segundo Tenenbaum et al., (1997)³⁶ alguns antibióticos necessitam de repetidas administrações para produzirem efeitos satisfatórios sobre determinadas bactérias, o que aumenta as chances de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Em contraste com a terapia sistêmica de antibióticos, a administração de agentes antimicrobianos diretamente na bolsa periodontal, pode minimizar alguns efeitos colaterais indesejáveis. Quando associados a um sistema de liberação lenta, os antibióticos locais permitem a manutenção de concentrações efetivas de um agente terapêutico somente no local de aplicação por longos períodos. Como vantagem, os riscos dos efeitos adversos e o desenvolvimento de resistência bacteriana são reduzidos²⁶.

Nesse sentido, Kurtzman & Hughes (2015)³⁷ avaliaram a eficácia da liberação local de Arestin[®] (minociclina, OraPharma, Inc) e da instalação do Periochip[®] (gluconato de clorexidina, Dexcel Pharma Technologies) associadas à terapia periodontal convencional e ao uso de ultrassom e laser diodo. Concluíram que as terapias periodontais alternativas como o uso de ultrassom e laser diodo foram eficazes tanto no tratamento como no prognóstico dos casos avaliados, com ganho no nível clínico de inserção bem como diminuição da profundidade de sondagem. Destaca-se ainda, o papel fundamental dos fármacos utilizados no tratamento, que foram capazes de diminuir o contingente microbiano.

Outro aspecto desejável diz respeito à capacidade de adesão desses sistemas de liberação lenta, característica que permite uma manutenção por maior tempo do dispositivo no sítio de ação. Foi demonstrado que alguns polímeros adesivos, tais como o Carbopol 934[®] e a hidroxipropil metilcelulose, são adequados para o uso em preparações destinadas à cavidade bucal⁷, devido à sua habilidade em aderir aos tecidos mucosos, nas condições locais, e liberar o princípio ativo.

A American Academy of Periodontology (2000)¹⁰ classifica os sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal de acordo com a duração da liberação do fármaco. São divididos em duas classes: dispositivos de liberação sustentada, que promovem liberação por menos do que 24 horas e os sistemas de liberação controlada, que devem ter uma duração que exceda um dia.

2.3 Sistemas de liberação modificada de fármacos para adjuvantes do tratamento periodontal.

O primeiro sistema de liberação de fármacos para o tratamento da periodontite foi proposto por Goodson et al., em 1979⁴². Tubos de diálise de acetato de celulose, com 250 µm de diâmetro, contendo tetra ciclina, foram cortados em um comprimento apropriado e inseridos no interior das bolsas periodontais. Observou-se que a liberação do fármaco ocorreu de forma rápida, cerca de 95% do total após 2 horas decorridas da aplicação. Apesar desse modelo não ter sido eficiente em manter a concentração terapêutica por um longo período de tempo, ele serviu de base para o desenvolvimento de outros sistemas de liberação⁴³.

Goodson et al., (1983)⁴⁴ avaliaram fibras compostas por outros polímeros (polietileno, polipropileno, policaprolactona, poliuretano, acetato-propionato de celulose e etileno vinil acetato) contendo tetraciclina, e concluíram que o sistema composto com as fibras de etileno vinil acetato proporcionou liberação prolongada por nove dias, sendo comercializada com o nome de Actisite[®] (Alza Corporation, Palo Alto, USA).

As desvantagens do uso das fibras é o tempo relativamente longo de inserção da fibra (7-10 minutos/dente), já que ela é acondicionada gentilmente e dobrada sobre si à medida em que é inserida na bolsa até o completo preenchimento da cavidade⁴⁵. Nesse caso, há a necessidade de se utilizar adesivo de cianoacrilato para reter o sistema no interior da bolsa e, devido às fibras não serem biodegradáveis, é necessária sua remoção ao término da terapia⁴⁶, o que compromete a adesão do paciente ao tratamento.

Outras maneiras de apresentação de sistemas de liberação local que têm sido bastante utilizadas no tratamento da doença periodontal, são os filmes e os sistemas semissólidos ou injetáveis. Os filmes têm como vantagens a possibilidade de controle da dimensão e forma, adequando-os à bolsa a ser tratada, além de serem rapidamente inseridos, com mínimo de desconforto ao paciente. Dependendo da espessura e da adesividade do material, os filmes podem permanecer submersos entre a gengiva e o dente, sem qualquer interferência nos hábitos alimentares e de higiene do paciente ⁴⁶.

Um dos primeiros estudos utilizando filme como sistema para liberação intrabolsa foi descrito por Addy et al. (1982)⁴⁷, no qual foi utilizado como material filmógeno o metilmetacrilato, carregado de tetraciclina, metronidazol e clorexidina. A partir de então, passaram a ser estudados vários polímeros de origem sintética e natural, biodegradáveis ou não. Vale ressaltar que os não biodegradáveis apresentam como inconveniente a necessidade de remoção após a liberação do fármaco.

Golomb et al., (1984)⁴⁵ desenvolveram um filme, de etilcelulose adicionado ou não de polietilenoglicol, contendo metronidazol a 10%, para inserção em bolsas periodontais e examinaram o perfil de liberação *in vitro* e *in vivo*. A liberação do fármaco foi avaliada por meio de um espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV) e a atividade microbiológica foi baseada em um microrganismo indicador (*Bacteroides fragilis*). O filme obteve como resultado da liberação por até 3 dias.

Outro sistema de liberação filmógeno disponível no comércio é o Periochip[®] (Perio Products Ltda., Jerusalém, Israel), o qual apresenta como composição básica a gelatina hidrolisada e glicerina. Esse filme biodegradável possui um efeito *burst*,

sendo observadas concentrações de 2007 µg/mL de clorexidina no fluido crevicular nas 2 primeiras horas após sua aplicação e concentrações de 1300 a 1900 µg/mL nas próximas 96 horas, seguido de liberação mais lenta nos outros dias⁴⁸. Esse sistema é capaz de proporcionar concentrações terapêuticas do fármaco na bolsa periodontal por uma semana quando considerado a CIM da clorexidina igual a 125 µg/mL⁴⁹.

Mais recentemente, o acetato de celulose sem qualquer associação a outro fármaco, mostrou maior eficiência em controlar a liberação de gluconato de clorexidina quando comparado ao Periochip[®]. Filmes contendo os anti-inflamatórios indometacina e meloxicam liberaram apenas 40% do fármaco em 5 dias, enquanto que o Periochip[®] liberou 96% em seis horas, nas mesmas condições experimentais⁵⁰.

A administração dos sistemas de liberação semissólidos no interior da bolsa periodontal é simples e com o mínimo de desconforto para o paciente no ato da inserção da forma farmacêutica. A natureza fluida da formulação possibilita seu espalhamento por todo o interior da bolsa. No entanto, para que fique retida dentro da bolsa e não seja lavada pelo fluido crevicular, a formulação deve possuir uma boa adesividade e/ou passar por mudança de fase, tornando-se mais rígida ou sólida no interior da bolsa.¹⁰

Os sistemas semissólidos podem ser constituídos de géis simples ou emulsionados, contendo ou não microesferas. Algumas formulações na forma de gel foram disponibilizadas comercialmente, como: a) Periocline[®] (Sunstar Co. Ltd., Osaka, Japan), gel composto de hidroxietilcelulose, copolímero aminoalquilmetacrilato, triacetina, cloreto de magnésio e glicerina, contendo o fármaco minociclina a 2%. Sua utilização, combinada à raspagem e alisamento

radicular, proporcionou resultados clínicos significativamente melhores quando comparados ao grupo controle ^{5,51}.

Outro gel similar comercializado com o nome de Dentomycin[®] (Lederle laboratories, UK) apresentou vantagens como adjunto do tratamento não-cirúrgico em termos de melhora no nível de inserção gengival e sangramento à sondagem⁵², quando comparado ao Periocline[®].

Needleman e Watts (1989)⁵³ testaram o uso de um gel de metronidazol a 1% em áreas de furca, após a terapia periodontal de manutenção. Dez pacientes com envolvimento de furca classe II ou III foram selecionados para o estudo. Mediu-se o sangramento à sondagem e o volume do fluido crevicular gengival. Além disso, avaliou-se o biofilme subgengival por meio de microscopia de campo escuro. Após a terapia de manutenção desses sítios, uma seringa foi usada para aplicar o gel de metronidazol (grupo experimental) ou um gel placebo (grupo controle) nas regiões de furca. Após os tempos de 1 e 3 meses, os sítios foram reexaminados, e concluiu-se que o grupo experimental não diferiu de maneira significativa do controle ($p < 0,05$).

Em 1992, foi desenvolvido um gel biodegradável à base de monooleato de glicerol e óleo de sésamo, contendo 25% de metronidazol e comercializado com o nome de Elyzol[®] (Dumex-Alpha, Copenhagen, Denmark). Entretanto, sua eficácia é questionável, com autores advogando a favor⁵⁴ e outros demonstrando o tão efetivo quanto à raspagem no tratamento da periodontite⁵⁶.

Apesar disso, há autores que acreditam que o Elyzol[®] não traz qualquer benefício quando comparado à raspagem e aplainamento radicular⁵⁷, provavelmente por ser rapidamente lavado da bolsa periodontal.

YEWEY et al., (1997)⁵⁸ estudaram um outro sistema semi-sólido disponível no mercado, comercialmente chamado de AtridoxTM (Atrix Laboratories, Fort Collins, CO, USA). Trata-se de um gel à base de poliéster biodegradável (poli DL-lactídeo) (PLA), contendo 10% de hclato de doxícilina. Tais pesquisadores observaram que quando administrado no interior da bolsa periodontal, o gel se solidificava, liberando o fármaco por um período de aproximadamente 7 dias. Além disso, Polson et al., (1997)⁵⁹ relataram que o uso do Atridox[®] resultou na diminuição significativa da profundidade de sondagem, do nível de inserção e do sangramento à sondagem, podendo sua eficácia ser comparado às terapias mecânicas.

Awartani e Zulqarnain (1998)⁶⁰ compararam os efeitos da aplicação do gel de metronidazol a 25 % (Elyzol[®]) com a raspagem subgengival. Foram selecionados 13 pacientes, sendo que cada um recebeu simultaneamente, em quadrantes selecionados aleatoriamente, todos os tipos de tratamento: 1) aplicação do gel de metronidazol, 2) raspagem subgengival, 3) associação do tratamento mecânico com o gel e 4) nenhum tratamento nenhum (controle). Os resultados obtidos demonstraram que, para o tratamento da periodontite de grau moderada a severa em adultos, a raspagem subgengival isolada foi tão eficiente quanto a combinação da raspagem com a terapia antibiótica.

Kinane e Radvar (1999)⁶⁰ avaliaram a eficácia de três sistemas de liberação de antimicrobianos disponíveis para o tratamento da periodontite. Foram selecionados 79 pacientes, divididos em quatro grupos: somente raspagem e alisamento radicular (20 pacientes); associados à aplicação de fibras de tetraciclina a 25 % (19 pacientes); a um gel de minociclina a 2 % (21 pacientes) ou a um gel de metronidazol a 25 % (19 pacientes). Medidas clínicas foram realizadas no início do

trabalho, após 6 semanas, 3 e 6 meses da aplicação dos sistemas. Apesar dos três sistemas terem demonstrado algum benefício sobre a raspagem e alisamento radicular isoladamente, a colocação de fibras de tetraciclina simultaneamente ao tratamento mecânico mostrou a maior redução na profundidade de sondagem, após 6 meses de tratamento.

Griffiths et al., (2000)⁶¹ relataram os resultados de um trabalho realizado em dois centros de estudo, onde foram comparados os efeitos clínicos da raspagem subgengival à raspagem subgengival associada à aplicação do gel de metronidazol a 25% (Elyzol[®]), em pacientes com periodontite crônica. Foram selecionados 88 pacientes no total, nos quais todos os quadrantes receberam raspagem subgengival e alisamento radicular, sendo em cada paciente dois quadrantes selecionados aleatoriamente para receber a aplicação do gel. Os parâmetros clínicos avaliados foram a profundidade e sangramento à sondagem e o nível de inserção gengival, registrados ao início do tratamento e após 1, 3, 6 e 9 meses da terapia. Concluíram que a associação da raspagem subgengival ao gel de metronidazol foi superior ao tratamento convencional isolado, sendo essa superioridade mantida por 9 meses.

Salvi et al., (2002)⁶² compararam os efeitos clínicos e microbiológicos de três sistemas biodegradáveis de liberação sustentada para uso em bolsas periodontais, o Atridox[®] (polímero reabsorvível contendo doxiciclina), Elyzol[®] (gel de metronidazol) e PerioChip[®] (gluconato de clorexidina). Todos os sistemas avaliados demonstraram uma redução significativa na profundidade de sondagem, entretanto, o Atridox[®] promoveu um ganho significativo no nível de inserção gengival quando comparado ao Elyzol[®].

Jansson, Bratthall e Soderholm (2003)⁶³ avaliaram os resultados do tratamento de pacientes com periodontite recorrente quando tratados com um gel de metronidazol a 25%. Foram escolhidos 20 indivíduos de um programa de

manutenção de periodontite, mas com doença periodontal recorrente. Após 3 meses de raspagem e alisamento radicular, 40 sítios foram selecionados, 2 em cada paciente, sendo um deles tratado com o gel de metronidazol (teste) e o outro com um gel placebo (controle). As medidas clínicas iniciais e nos retornos incluíram o índice de placa, índice gengival e de sangramento, profundidade de sondagem e nível de inserção gengival. O estudo demonstrou que o tratamento com o gel de metronidazol não influenciou na resposta cicatricial de pacientes com doença periodontal recorrente.

Paquette et al., (2003)⁶⁴ ao avaliarem um sistema de liberação intra-bolsa - Arestin® (OraPharma Inc., Warminster, PA, USA), composto por microesferas contendo minociclina, observaram que este fármaco quando associado à raspagem e alisamento radicular, demonstrou eficácia no tratamento dos casos de periodontite e peri-implantite⁶⁵.

Jansson et al., (2004)⁶⁶ reportaram um estudo onde 20 pacientes recebiam dois tipos de tratamento, ao mesmo tempo: enquanto uma bolsa periodontal recebia um gel de metronidazol a 25%, outro sítio selecionado aleatoriamente recebia um gel placebo. Foram comparados os efeitos do gel contendo metronidazol sobre a microbiota subgengival, através da identificação de três microrganismos representativos nas periodontites: a *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens* e *Actinomyces actinomycetemcomitans*. A técnica de identificação microbiológica foi pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados demonstraram que o gel contendo metronidazol não reduziu a ocorrência desses microrganismos específicos.

Perinetti et al. em 2004⁶⁷, compararam os efeitos clínicos e microbiológicos da administração subgengival de dois géis (gel de clorexidina a 1% e gel de metronidazol a 1%) em bolsas periodontais, após o tratamento mecânico (raspagem e alisamento radicular). Os indivíduos selecionados após receberem instruções de higiene oral foram submetidos ao tratamento mecânico. Decorridos 3 meses, foram divididos em três grupos de acordo com o fármaco administrado: GI - Gel de metronidazol a 1%; GII - Gel de clorexidina a 1% e GIII - Gel placebo. Os géis foram aplicados quatro vezes, com intervalos de 7 dias entre as aplicações. Os resultados demonstraram a eficácia no tratamento para ambos os géis, ao produzir benefícios tanto nos parâmetros clínicos quanto microbiológicos. Entretanto, vale ressaltar, que não se obteve a erradicação por completo dos patógenos periodontais.

Leiknes et al., (2007)⁶⁸ selecionaram 21 pacientes com periodontite crônica recorrente com presença de bolsa periodontal de 5 mm e sangramento à sondagem e avaliaram pelo menos duas superfícies dentárias contralaterais anatomicamente correspondentes em cada paciente. As superfícies dentárias a serem avaliadas foram divididas em dois grupos de acordo com o tratamento recebido - apenas raspagem e alisamento radicular e raspagem e alisamento radicular associado ao uso de gel de metronidazol a 25%. Os resultados observados mostraram que o uso do gel de metronidazol a 25% como auxiliar na terapia periodontal convencional não apresentou efeitos clínicos significantes quando comparado à terapia periodontal convencional.

Kaner et al., (2007)⁶⁹ compararam a eficácia clínica de duas terapias periodontais - raspagem e alisamento radicular associado a um chip de clorexidina e raspagem e alisamento radicular associado à administração sistêmica de amoxicilina e metronidazol, em pacientes com periodontite agressiva generalizada. Os autores

avaliaram o nível clínico de inserção, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e grau de supuração antes do tratamento, 3 e 6 meses após a terapia. Os resultados mostraram que o uso dos chips de clorexidina promoveu melhorias clínicas, entretanto não foram mantidas ao longo de todo período avaliado. Por outro lado, a terapia periodontal convencional associada ao uso sistêmico de amoxicilina e metronidazol mostrou-se mais eficaz na redução da periodontite, além de contribuir para o ganho de inserção clínica bem como na redução das taxas de indicação de cirurgia periodontal.

Barat et al., (2007)⁷⁰ avaliaram *in vitro* as propriedades físicas e as características de liberação de fármacos de pastilhas de quitosana biodegradáveis contendo metronidazol no tratamento local da doença periodontal a longo prazo. As pastilhas exibiram características físicas satisfatórias e permitiram uma liberação brusca do fármaco nas primeiras 24 horas, seguida de liberação prolongada por 6 dias. Dessa forma, os resultados obtidos são encorajadores e precisam de uma avaliação mais criteriosa do uso destas pastilhas em pacientes com periodontite.

Singh, Roy, Chumber (2009)⁷¹ compararam dois sistemas de administração local de fármacos (tetraciclina e metronidazol) associada à terapia periodontal convencional (raspagem e alisamento radicular) na avaliação de parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, índice gengival, e apresentou efeitos clínicos significantes quando comparado à terapia periodontal convencional.

Kumari, Pathak, (2012)⁷² avaliaram a capacidade termorreversível do gel periodontal bem como sua geleificação *in situ* e parâmetros farmacotécnicos como

pH, espalhabilidade, viscosidade, liberação *in vitro*, estabilidade e palatabilidade, após a administração injetável de benzoato de metronidazol e serratiopeptidase. O gel desenvolvido apresentou condições farmacotécnicas satisfatórias em relação aos parâmetros avaliados. Além disso, a incorporação da serratiopeptidase como agente anti-inflamatório, permitiu o desenvolvimento de um sistema terapêutico eficaz no tratamento de infecções periodontais anaeróbias.

Goodson et al., (2012)⁷³ compararam o efeito de três terapias periodontais associadas à raspagem e alisamento radicular (administração sistêmica de amoxicilina e metronidazol, administração local de tetraciclina e cirurgia periodontal) no nível clínico de inserção e na profundidade de sondagem. Observou-se que pacientes que receberam essas terapias auxiliares exibiram melhoria no ganho de nível clínico de inserção e redução na profundidade de sondagem quando comparado com os efeitos da raspagem e alisamento radicular isolada. Além disso, foi possível observar que o tabagismo reduziu significativamente o ganho de nível clínico de inserção bem como o aumento da profundidade de sondagem.

Matesanz et al., (2013)⁷⁴ realizaram uma revisão sistemática sobre os efeitos de antimicrobianos locais como coadjuvantes no desbridamento subgingival no tratamento de periodontite crônica. O efeito da aplicação subgingival dos agentes antimicrobianos promoveu mudanças positivas e significativas na profundidade de sondagem e no nível clínico de inserção. A evidência científica comprova a eficácia da associação de agentes antimicrobianos locais ao debridamento em sítios periodontais profundos ou recorrentes, principalmente quando se utiliza veículos que permitem a manutenção da liberação do antimicrobiano.

Da Silva et al., (2015)⁷⁷ avaliaram a capacidade de liberação e absorção de metronidazol através de membranas de poli (3-hidroxibutirato). Os resultados revelaram que o metronidazol foi absorvido e liberado com sucesso pelas membranas. A quantidade de metronidazol liberada foi capaz de manter a concentração inibitória mínima de *Porphyromonas gingivalis* inibindo a sua proliferação. Os resultados apresentados sugerem que este sistema possa ser usado no tratamento a longo prazo da doença periodontal.

Paul et al., (2015)⁷⁸ avaliaram a eficácia de um dispositivo de colágeno contendo gel de metronidazol a 5% associado ou não à terapia periodontal mecânica (raspagem e alisamento radicular) no índice de placa, índice gengival, índice de sangramento no sulco e profundidade de sondagem em pacientes com periodontite crônica. A partir deste estudo, pode-se concluir que a associação do gel de metronidazol a 5% com a terapia periodontal mecânica foi mais eficaz no tratamento da periodontite crônica.

Bergamaschi et al., (2015)⁷⁹ avaliaram o efeito do metronidazol em duas formulações (administração local com gel a 15% e administração sistêmica com comprimido de 750mg) como terapia coadjuvante à raspagem periodontal com uso de ultrassom em pacientes fumantes portadores de periodontite crônica. Os resultados desse trabalho mostraram que o uso do metronidazol, independente da forma de administração, permitiu melhora nos parâmetros clínicos e microbiológicos avaliados por até 6 meses após o tratamento da periodontite crônica em pacientes fumantes.

Com base nestes trabalhos, a instituição de agentes antimicrobianos locais como adjuvantes da terapia convencional poderia proporcionar avanços no tratamento das diversas formas de periodontite.

Entretanto, a formulação ideal do sistema a ser utilizado bem como um protocolo que regularize sua utilização, ainda não foram totalmente estabelecidos, sendo necessários mais estudos que comprovem seus reais benefícios. Estes fatos nortearam a proposta deste estudo.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi o desenvolvimento e avaliação *in vivo* de sistemas semissólidos (géis) e filmes contendo sal de metronidazol e conjugado de benzoato de metronidazol para o tratamento da periodontite crônica em humanos.

Como objetivos específicos buscou-se:

- 1) Desenvolvimento de um protocolo clínico e de um produto final a ser utilizado no tratamento de doença periodontal crônica em humanos, associando o tratamento convencional (RAR) + adjuvante terapêutico eficiente e que possua custo inferior aos produtos importados existentes;
- 2) Avaliação *in vivo* das formulações desenvolvidas (filme e gel), monitorando-se as concentrações de metronidazol e benzoato de metronidazol em relação ao tempo de liberação dos fármacos no fluido crevicular gengival;
- 3) Avaliação clínica dos sistemas formulados, com relação a parâmetros clínicos por meio do Sistema Florida Probe® e microbiológicos da periodontite pelo método de Hibridização DNA-DNA Chckerboard.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo dos filmes e géis contendo metronidazol e benzoato de metronidazol

Para formulação do filme foi utilizada a zeína, uma proteína hidrofóbica considerada como um subproduto da cadeia de produção do milho, que apresenta boa biocompatibilidade/biodegradabilidade. Sua baixa solubilidade em água favorece com que o sistema possua uma boa duração em contato com fluidos biológicos e dessa forma possa atuar como um sistema de liberação prolongada. No caso do sistema semissólido utilizou-se o monolinoleato de glicerila, composto por uma mistura de glicerídeos derivados do ácido linol eico. Devido ao seu caráter anfifílico, na presença de água se organiza em estruturas capazes de modular a liberação de substâncias incorporadas na formulação. Ambos os materiais são considerados seguros para uso pelo FDA (classificação “GRAS”, Food and Drug Administration).

4.1.1 Sistema filmógeno

O filme polimérico contendo zeína, polietilenoglicol 400 (PEG 400) como plastificante e os fármacos metronidazol e benzoato de metronidazol foram preparados pela técnica de *casting*/evaporação do solvente. Uma dispersão de zeína em solução hidroetanólica (9:1) foi mantida sob agitação magnética a 400 rpm por 3 horas e na sequência adicionada de PEG 400 e mantida sob agitação por 30 min. Os fármacos foram incorporados à dispersão

e m antidos em agitação por 30 min adicionais. Cerca de 80 g de dispersão polimérica foi depositada em placa de poliestireno (12 x 12 cm) e submetida à secagem em câmara climática a 50 °C e 50% de umidade relativa por 16 horas. Na Tabela 1 está contida a composição da dispersão para o preparo do filme. Após a secagem, a concentração de fármaco no filme é de 4,5% de metronidazol e 9,0% de benzoato de metronidazol. Na Figura 1 é apresentada a formulação filmógena.

Tabela 1. Composição da dispersão para preparo do filme.

Componente	Concentração (%)
Zeína	6,0
Plastificante*	1,2
Metronidazol	0,375
Benzoato de metronidazol	0,750
Etanol 90%	qsp 100

4.1.2 Sistema semissólido

Para preparo das formulações, o monolinoleato de glicerila (Myverol® 18-92K) foi aquecido em banho-maria termostatizado à temperatura de 40/45 °C juntamente com o tensoativo. Depois de homogeneizado manualmente com auxílio de um bastão de vidro, os fármacos foram incorporados sob agitação. A última etapa foi a de incorporação da água destilada, na mesma temperatura da formulação. A mistura foi mantida em repouso por 24 horas ($25\text{ °C} \pm 1$) antes de qualquer manipulação. Na Tabela 2 é apresentada a formulação semissólida, ilustrada na Figura 1.

Tabela 2. Composição da formulação para preparo do sistema semissólido

Componente	Concentração (%)
Myverol [®] 18-92k	56,57
Tensoativo lipofílico	2,33
Metronidazol	5,00
Benzoato de metronidazol	16,10
Água	20,00

Os complexos biodegradáveis foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico (LPDF) da FCFRP-USP, com suporte financeiro da **FAPESP (processo nº 01/12377-4)**.

Os fármacos incorporados foram o metronidazol e o benzoato de metronidazol, antimicrobianos com ação sobre microrganismos anaeróbios, predominantes nas periodontites, em concentração dentro do intervalo de 1 a 40%, que é a faixa relatada na literatura para dispositivos de liberação local para tratamento da periodontite e que demonstrou segurança e eficácia quanto ao seu uso.

Figura 1. Apresentação final do gel. **Figura 2.** Apresentação final do filme

4.2 Avaliação *in vivo* das formulações

Foi realizado um estudo clínico randomizado, duplo-cego (nem o farmacêutico manipulador da fórmula, nem o paciente saberiam qual das formulações seriam aplicadas), e controlado para testar a hipótese de que o uso associado do sistema de liberação local (filme ou gel) à raspagem e alisamento radicular (RAR) é superior à terapia RAR isolada. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP, sob número **CAAE nº: 2011.1.907.58.0** – Anexo 1.

Foram selecionados 45 pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, de ambos os sexos, os quais apresentaram ao menos 2 dentes com periodontite crônica, compondo um total para o estudo de 96 dentes, divididos aleatoriamente (por meio de programa de computador) em 3 grupos, a saber:

Grupo 1 – raspagem e alisamento radicular (RAR) – controle ativo;

Grupo 2 – RAR + gel de metronidazol;

Grupo 3 – RAR + filme com metronidazol.

Os critérios de **inclusão** no estudo foram:

- Pacientes com periodontite crônica, com nível de inserção clínica igual ou maior que 5mm em dois ou mais dentes e profundidade de sondagem igual ou maior que 5mm em um ou mais sítios periodontais;
- Faixa etária de 35 a 70 anos;
- Não ter feito uso de antibióticos há pelo menos 3 meses;
- Ausência de histórico de alergia aos componentes presentes nas formulações testadas.

Os critérios de **exclusão** no estudo foram:

- Doença cardiovascular grave;
- Problemas relacionados à farmacocinética, como nefropatias, hepatopatias, etc.

A avaliação clínica envolveu o monitoramento das concentrações do metronidazol (sal e benzoato de metronidazol), liberado no fluido crevicular gengival, a partir das formulações desenvolvidas e dos efeitos dos tratamentos nos pacientes com periodontite, e com base nos indicadores clínicos e microbiológicos associados à doença periodontal. Em cada paciente selecionado para o estudo, duas bolsas periodontais (de maiores profundidades ou, no caso de várias bolsas com profundidades iguais, duas foram escolhidas aleatoriamente entre as mais profundas) receberam um dos três tratamentos previamente determinados, e os sítios selecionados foram recobertos com cimento cirúrgico.

4.3 Preparo inicial dos pacientes

Após a seleção dos participantes do trabalho, iniciou-se o preparo prévio dos mesmos para o estudo, que consistiu de raspagem supragengival com ultrassom e profilaxia profissional, com o intuito de regularizar as superfícies dos dentes para evitar erros durante a inserção da sonda periodontal. Os voluntários também receberam orientações de higiene bucal. Terminada esta etapa, os indivíduos foram distribuídos nos três grupos avaliados - Grupo (RAR) e Grupo (RAR + Gel), Grupo (RAR + Filme) para receberem os respectivos tratamentos.

4.4 Protocolo Clínico de aplicação, determinado por estudo piloto, e após o desenvolvimento das formulações – Gel e Filme.

O protocolo clínico determinado para condução do estudo, foi realizado através de um estudo piloto prévio, que envolveu 3 pacientes com 2 dentes com bolsas periodontais e ao menos 5 mm de profundidade a sondagem, sangramento a sondagem presente, e presença de cálculo subgengival.

O protocolo de aplicação desenvolvido e apresentado como um dos objetivos principais e especificos deste presente estudo, trata-se de:

- **Estágio 1** - Raspagem e Alisamento Radicular Supra/Subgengival com Ultrassom e ponta ultrassônica.
- **Estágio 2** – Raspagem e Alisamento Radicular Supra/Subgengival com Curetas Gracey afiadas.
- **Estágio 3** – Aplicação da formulação – Filme (1 “disco” de 1 cm² de diâmetro contendo 4,5% de metronidazol e 9,0% de benzoato de metronidazol) por dente com bolsa periodontal de profundidade mínima de 5 mm, utilizando uma pinça clínica esterilizada, e “acomodação” do filme no interior da bolsa por instrumento de ponta romba, Condensador de Ward.
 - Aplicação da formulação – Gel (a apresentação do semissólido, deu-se em seringa graduada para insulina 10 ml, contendo 5% de metronidazol e 16,1% de benzoato de metronidazol), o gel foi depositado dentro da bolsa periodontal, até o preenchimento total da mesma e leve extravasamento, garantindo assim que todo o interior da bolsa fosse preenchido com a formulação.
- **Estágio 4** – Após a RAR e aplicação de um dos dispositivos poliméricos, desenvolvidos e avaliados, utilizou-se um cimento cirúrgico (Periobond sem Eugenol, Dentsply Indústria e Comércio Ltda. Petrópolis – RJ). Segundo o fabricante sua composição não causa

irritação, reações alérgicas, nem desconforto ao paciente em regiões sensíveis. Outra vantagem foi a proteção dos dispositivos contra a lavagem pelo fluido crevicular, saliva, e impedindo a remoção por meios mecânicos (escova, fio dental, alimentação) pelo paciente, mantendo-os no interior do sítio tratado.

4.5 Quantificação de fármaco presente no fluido crevicular gengival

As formulações foram introduzidas nas bolsas periodontais com o auxílio de pinça clínica para o filme (Figura 3) ou por meio de seringa com agulha de ponta romba para o gel (Figura 4).

Figura 3. Aplicação *in situ* do filme.

Figura 4. Aplicação *in situ* do gel.

O fluido crevicular gengival dos sítios nos quais foram feitas as aplicações foi colhido com tiras de papel absorvente do tipo Periopaper[®] (Figura 5) e o volume em cada tira de papel foi quantificado por meio do aparelho Periotron[®] 8000 (Oraflow Inc., Plainview, USA) adquirido pela FORP-USP, com

financiamento da **FAPESP processo n. 04/09545-0** (Figura 6) para posterior determinação da concentração do fármaco presente em cada sítio amostrado. Os biofilmes dos sítios selecionados foram colhidos com o auxílio de curetas e armazenados em microtubos tipo *Eppendorf* (Figura 7).

Figura 5. Periopaper®

Figura 6. Periotron® 8000

Figura 7. Microtubos tipo Eppendorf.

As amostras de fluido gengival, colhidas em intervalos de tempo determinados em função dos resultados obtidos nas avaliações *in vitro* do perfil de liberação do fármaco (estudo *in vitro* faz parte do Projeto Temático do qual este projeto é uma parte), foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de metronidazol presente nas bolsas periodontais, de acordo com Sato et al. (2006).

4.6 Avaliação dos parâmetros clínicos indicadores de periodontite

Os parâmetros clínicos foram avaliados nas bolsas periodontais selecionadas para o estudo com o uso do sistema de sondagem periodontal

Florida Probe[®] (Figuras 8 a 11) nos tempos:

T0 = inicial;

T2 = após 48 horas da aplicação e **T5** = após 72 horas da aplicação;

T7 = após 7 dias da aplicação;

T15 = após 15 dias da aplicação,

T30 = após 30 dias da aplicação;

T60 = após 60 dias da aplicação;

T90 = após 90 dias da aplicação e;

T180 = após 180 dias da aplicação.

Aqui cumpre uma observação clínica. Os tempos **T2** e **T5** foram tomados somente para os grupos do **Filme** e do **Gel**, com a finalidade de **mensurar a quantidade de metronidazol** na forma pura e na forma de conjugado de benzoato de metronidazol que havia sido liberada na bolsa periodontal até então. Por motivo óbvio, não foi realizado para o grupo controle por não haver medicamento a ser quantificado nesse grupo.

Os parâmetros estudados foram:

- **Profundidade de Sondagem (PS)**: representada pela medida da margem gengival livre até a porção mais apical do sulco gengival;

- **Nível Clínico de Inserção (NCI):** registrado como a distância que vai da junção amelocementária à porção mais apical do sulco gengival ou bolsa periodontal;
- **Sangramento à Sondagem (SS):** registrado como a presença ou ausência de sangramento no sítio examinado que ocorrer até 15 segundos após a sondagem.

Figura 8. Sonda Florida Probe®

Figura 9. Sistema Florida Probe®

Figura 10. Quadro Periodontal do Florida Probe®

Figura 11. Legenda do Florida Probe®

Os resultados dos parâmetros clínicos e análise de liberação de fármacos foram avaliados por meio de comparações das médias dos grupos populacionais. Os dados dos grupos foram avaliados em modelo linear de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos), que é utilizado na análise de dados onde às respostas de um mesmo paciente estão agrupadas e a suposição de

independência entre as observações no mesmo grupo não é adequada, com intervalo de confiança de 95%, $p \leq 0,05$, utilizando o programa Graphpad InStat (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4.7 Avaliação dos parâmetros microbiológicos indicadores da periodontite.

4.7.1 Colheita das amostras de biofilme subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival com gaze esterilizada, amostras de biofilme subgengival foram colhidas com o auxílio de curetas periodontais do tipo minifive (Hu-Friedy Mfg, Co., Chicago, IL, USA). Estas eram posicionadas na porção mais apical das bolsas e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal, eram removidas e imediatamente depositadas em microtubos plásticos contendo 150 μ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA), 1 mM EDTA (Sigma HCL (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA), pH 7,6. A estas era acrescentado 150 μ L de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um período prolongado.

4.7.2 Análise da microbiota bucal pelo método DNA Checkerboard

As amostras obtidas dos pacientes do estudo foram analisadas no Laboratório de Diagnóstico Odontológico Molecular da FORP-USP, por meio do método da hibridização com sondas de DNA genômico DNA Checkerboard, de acordo com Do Nascimento et al., 2010.

4.7.3 Obtenção das sondas de DNA genômico

Os 35 microrganismos utilizados neste estudo para confecção das sondas de DNA utilizadas na detecção das espécies, presentes nas amostras de

biofilme subgengival dos pacientes avaliados, estão apresentadas na Tabela 3. Para algumas foi possível obter diretamente a sonda de DNA da ATCC, enquanto outras obtivemos as cepas, da ATCC e Fiocruz e realizamos o crescimento e purificação do DNA.

Da mesma forma, a extração, purificação do DNA genômico, amplificação do DNA extraído pela técnica do 16S rDNA-based PCR, e pela técnica do MDA (Multiple Displacement Amplification) e a avaliação da integridade dos DNAs genômicos obtidos para a confecção das sondas, foram realizadas de acordo com os protocolos descritos por Do Nascimento et al (2010). De acordo com o autor, a técnica de amplificação MDA permite a obtenção de grandes quantidades de material genético para a construção de sondas e de amostras controle a partir de quantidades mínimas de DNA e tem mostrado grande utilidade na amplificação do DNA proveniente de amostras clínicas.

Tabela 3. **Microrganismos** utilizados no experimento de DNA checkerboard

Microorganismos utilizados no experimento de DNA checkerboard	
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	<i>P. nigrescens</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>C. gingivalis</i>	<i>S. constellatus</i>
<i>C. rectus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>E. coli</i>	<i>S. mitis</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>S. mutans</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>S. oralis</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>S. parasanguinis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>L. Casei</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>S. sanguinis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>T. forsythia</i>
<i>P. anaerobius</i>	<i>T. denticola</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>V. parvula</i>
<i>P. endodontalis</i>	<i>C. albicans</i>
<i>P. gingivalis</i>	
<i>P. intermedia</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	

4.7.4 Confecção das Sondas Genômicas de DNA

Os DNAs amplificados pela técnica do MDA foram marcados de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante do marcador genômico (Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). O protocolo baseia-se na marcação de 100 ng do DNA genômico do microrganismo a ser estudado, atingindo uma concentração final de 3 ng/ μ L em solução de hibridização. Os DNAs foram diluídos dentro de microtubos à uma concentração de 10 ng/ μ L em um volume final 10 μ L. Os DNAs foram desnaturados em água fervente por 5 minutos. Imediatamente, foram resfriados em gelo durante 5 minutos para manter as cadeias de nucleotídeos abertas. Com os tubos mantidos no gelo, foram adicionados os componentes do kit de marcação, primeiro 10 μ L de Reaction buffer, 2 μ L de Labelling reagent e 10 μ L de cross-link solution (1:4) [GE Healthcare]. Os tubos foram levemente agitados e incubados a 37 °C por 30 minutos.

Figura 12. a) Kit usado para marcação das sondas de DNA genômico; b) Reagentes de marcação (labeling reagent, cross-linker solution e buffer reaction respectivamente); c) Sondas marcadas.

4.7.5 Verificação da sensibilidade e especificidade das sondas marcadas

A sensibilidade do teste foi ajustada para permitir a observação de reações de hibridação positivas para a presença de 10^5 e 10^6 células bacterianas. Para isso, amostras de DNA genômico usados para a confecção

das sondas foram hibridizadas nas quantidades de 10^5 e 10^6 células contra as próprias sondas marcadas.

4.7.6 Processamento e aplicação das amostras

Previamente ao processamento, os microtubos contendo as amostras colhidas dos pacientes eram retirados do armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o descongelamento. Em seguida estes eram fervidos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para a desnaturação das fitas de DNA, e logo após, imersos em gelo. Após a desnaturação, as amostras eram neutralizadas com a adição de $800\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de amônio 5 M .

Um dispositivo metálico denominado Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA), composto por duas placas metálicas, era utilizado para a fixação de uma membrana de nylon com carga positiva e tamanho de 15cm^2 (Hybond N+, GE Healthcare), na qual as amostras eram aplicadas. Uma das placas do aparelho possui 30 canaletas dispostas paralelamente. Sobre esta, a membrana era posicionada de modo a cobrir todas as canaletas. O aparelho permite a deposição de 28 amostras de DNA em canaletas individuais. As duas canaletas restantes são utilizadas para a aplicação dos controles correspondentes a 10^5 e 10^6 células de cada espécie estudada. Cada amostra de DNA e os controles eram aplicados no interior das canaletas com auxílio de pipetas automáticas de precisão, e após 5 minutos, o dispositivo era conectado a uma bomba à vácuo, removendo o excesso de líquido e, desta forma, permitindo a deposição do DNA na membrana. Logo após, eram feitas duas aplicações consecutivas de água destilada por meio das pipetas, para lavagem das canaletas, e o excesso de água era removido com o auxílio da bomba a vácuo. Em seguida, a membrana era removida do aparelho e o DNA fixado na

mesma por meio da exposição ao calor de 80 °C no forno de hibridização (Hybridization Oven Shaker, Amersham Biosciences) por 2 horas.

Figura 13. a) Aparelho Minslot 30 aberto; b) membrana de nylon posicionada sobre uma das placas do aparelho (esquerda) e papel filtro (direita); c) amostras de fluido gengival prontas para serem aplicadas na membrana d: Membrana posicionada no aparelho fechado e aplicação das amostras em canaletas individuais.

4.7.7 Pré-Hibridização das amostras

Após a fixação dos DNAs das amostras e controles, a membrana era pré-hibridizada no forno a 60 °C, durante 2 horas, em uma solução de NaCl 1 M (Merck e Blocking reagent (4%, GE Healthcare) diluídos em 30 mL de Hybridization Buffer (GE Healthcare). A Figura 14 ilustra o forno de hibridização utilizado no processamento das membranas.

Figura 14. Forno de hibridização utilizado para a fixação das amostras de DNA sobre a membrana, pré e hibridização das membranas, e para os procedimentos de lavagem.

4.7.8 Aplicação das sondas de DNA marcadas e reação de hibridação

Após a pré-hibridização, a membrana era posicionada em um aparelho de acrílico (Miniblotter 45, Immunetics, Cambridge, MA, EUA), com 45 canais, nos quais as sondas marcadas eram aplicadas. A membrana é posicionada de forma que as amostras de DNA previamente aplicadas fiquem posicionadas em um ângulo de 90° com os canais do aparelho de acrílico, formando um checkerboard no padrão 30 (amostras) X 45 (sondas). Cada canal é usado como uma câmara para Aplicação das sondas de DNA marcadas e reação de hibridação

Após a pré-hibridização, a membrana era posicionada em um aparelho de acrílico (Miniblotter 45, Immunetics, Cambridge, MA, EUA), com 45 canais, nos quais as sondas marcadas eram aplicadas. (Figura 15). A membrana é posicionada de forma que as amostras de DNA previamente aplicadas fiquem posicionadas em um ângulo de 90° com os canais do aparelho de acrílico, formando um checkerboard no padrão 30 (amostras) X 45 (sondas). Cada canal é usado como uma câmara para reações de hibridização independentes. Com o auxílio de pipetas automáticas de precisão, eram aplicadas, individualmente no interior de cada canal, quantidades de sonda pré-estabelecidas no teste de verificação da sensibilidade e especificidade das sondas marcadas. Após a aplicação das sondas, o aparelho era embrulhado várias vezes em filme de PVC (cloreto de polivinil) e embalado em saco plástico, evitando desta forma a possibilidade de desidratação da membrana. A hibridização da membrana era realizada a 63,5 °C no forno, sob agitação suave, *overnight*.

Figura 15. Aparelho Miniblotter 45 para aplicação das sondas. a: Membrana posicionada sobre uma das placas do aparelho; b: Após o fechamento do aparelho, as sondas são aplicadas individualmente nas canaletas.

4.7.9 Lavagem para remoção das sondas

Após a reação de hibridização, a membrana passa por um processo de lavagem, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente (ligações inespecíficas entre os DNAs). Inicialmente eram realizadas duas lavagens de 35 minutos cada, a 65 °C, com 500 mL de uma solução contendo Urea 2 M (Sigma), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1% (Sigma), NaH₂SO₄ 50 mM (pH= 7; Merck), NaCl 150 mM (Merck), MgCl₂ 1mM (Merck) e Blocking Reagent (GE Healthcare). Duas lavagens subsequentes eram realizadas em temperatura ambiente, durante 15 minutos cada, com 500 mL de uma solução contendo Tris 1M (Sigma), NaCl 2M (Merck) e MgCl₂ 1M (Merck). Todas as lavagens eram conduzidas sob vigorosa agitação no forno de hibridização/lavagem.

4.7.10 Detecção dos sinais de hibridização

A detecção dos sinais de hibridização é feita através de uma reação de quimiluminescência. Após as lavagens, eram aplicados sobre a membrana, 6,7 mL do reagente de detecção CDP-Star[®] (GE Healthcare), deixando-o agir em toda a superfície por 5 minutos. Após este período, o excesso do reagente era

removido e a membrana selada em saco plástico para o procedimento de exposição.

4.7.11 Exposição da membrana e Revelação

A membrana selada era posicionada para exposição em filme para autoradiografia (HyperFilm, GE Healthcare) dentro de um cassete apropriado (Hypercassette, GE Healthcare). Eram realizadas 3 exposições diferentes para cada membrana processada (15, 30 e 60 minutos). Em seguida, os filmes eram revelados e fixados em soluções para processamento radiográfico convencional (Kodak, Brasil). Ao final, obtém-se um filme radiográfico com os sinais de hibridização detectados pelas intersecções entre as amostras e sondas, onde as linhas horizontais representam as sondas marcadas e as verticais, as amostras de biofilme subgengival, configurando desta forma um “tabuleiro de xadrez” – DNA Checkerboard.

Figura 16. a) e b) Membrana embalada e posicionada no cassete radiográfico; c) Filme radiográfico revelado, onde se pode observar os sinais das reações de hibridização obtidas pelo método DNA *Checkerboard*.

4.7.12 Interpretação dos Sinais de Hibridização

A leitura visual dos resultados é semi-quantitativa, feita por meio da comparação da intensidade dos sinais de hibridização obtidos pela intersecção das amostras testadas contra as sondas marcadas em relação à intensidade das amostras controle colocadas nas duas últimas canaletas do Minislot 30, que equivalem a 10^5 e 10^6 células das espécies alvo. Os sinais são registrados como

0: não detectado; 1: $< 10^5$ células; 2: $\sim 10^5$; 3: $10^5 \sim 10^6$; 4: $\sim 10^6$; e 5: $> 10^6$ células. Desta forma, obtém-se um número aproximado de células bacterianas em cada amostra estudada. Sendo assim, os filmes radiográficos foram digitalizados e as imagens obtidas foram inseridas no software Image Quant TL (GE Healthcare). O software possibilita a obtenção do número aproximado de células bacterianas presentes em cada amostra avaliada através da comparação da intensidade de pixels dos sinais de hibridização entre as amostras e controles.

4.8. Análise dos resultados

4.8.1 Avaliação dos indicadores clínicos da periodontite

De acordo com o protocolo estabelecido, descrito no item 4.2, um exame clínico-periodontal completo foi realizado previamente ao tratamento, com o objetivo de selecionar os sítios periodontais adequados para receberem os tratamentos e serem avaliados durante o estudo. Este exame foi realizado por um único examinador, por meio do sistema computadorizado de sondas periodontais, Florida Probe[®] (Florida Probe[®] System, Florida Probe Corporation, Gainesville, FL, USA).

Este sistema é composto por uma sonda conectada a um reostato acionado por pedal, e a um software (FP32 versão 3.0.6.6 e o FP32 Data Downloader) instalado em um computador (Figura 8), capturando os registros das medidas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção com alta precisão e pressão controlada.

Existem três tipos de peça de mão nas quais as pontas das sondas podem ser adaptadas, e neste estudo foi utilizada a ponta *Stent*, que possibilitou a tomada de ambos os parâmetros avaliados (Figuras 8 e 9).

Nesta primeira avaliação, realizada sete dias antes do tratamento (T0 *baseline*), todos os dentes de cada indivíduo foram avaliados quanto aos seguintes parâmetros clínicos:

- Profundidade de sondagem (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável da bolsa/sulco periodontal;
- Nível clínico de inserção (NIC): distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável da bolsa/sulco periodontal.
- Sangramento a Sondagem: presença ou ausência de sangramento, quando na introdução/remoção da sonda após 15 segundos.

A significância estatística foi avaliada por ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

4.8.2 Avaliação dos indicadores microbiológicos da periodontite

Os resultados da avaliação microbiológica por meio da Técnica de Hibridização DNA-DNA Checkerboard estão ilustrados na Figura 17, após tratamento com o software.

Figura 17. a) Imagem digitalizada de uma membrana, inserida no software; b) seleção dos sinais de hibridização a serem quantificados; c) determinação dos valores dos sinais controles; d) calibração de todos os sinais em função dos controles e obtenção dos resultados.

4.8.3 Análise dos dados

O número de células bacterianas (Contagem) e incidência das espécies foram fornecidas para cada grupo estudado nos tempos avaliados. Para comparar as contagens das espécies bacterianas em cada grupo, inicialmente os dados foram avaliados somando-se todos os microrganismos, sem discriminar entre as espécies estudadas. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Friedmann. Diferenças foram consideradas significantes para valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico Graphpad InStat (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação de fármaco no fluido gengival

A concentração do fármaco após a aplicação do filme foi avaliada em 18 dentes, tendo sido possível quantificar o fármaco após 2 dias em **94,4%** das amostras.

A concentração encontrada foi de **49,03%**, estimando-se que o volume de fluido coletado pelo *periopaper* foi de 1 μ L.

No caso do gel, foram avaliados 11 dentes e quantificado o fármaco em **54,5%** deles. A concentração encontrada foi de **21,77%** μ g/mL.

Na Tabela 4 são apresentados os valores de média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos dados de concentração de fármaco no filme e gel, dois dias após a aplicação.

Tabela 4. Estatística descritiva dos dados de concentração de fármacos no fluido gengival, 48 horas após a aplicação da formulação.

Formulação	Filme	Gel
Média de concentração		
(ug/mL)	49,03	21,77
Desvio padrão	69,87	17,49
Mediana	21,84	14,64
Mínimo	3,95	5,74
Máximo	244,69	57,43

Não houve diferença significativa entre as médias avaliadas pelo teste t ($p=0,1306$)

Nos Gráficos (1 e 2) são apresentadas as curvas analíticas dos padrões de MDZ e BMDZ utilizadas neste ensaio. As curvas demonstraram linearidade satisfatória para ambos os ativos nos intervalos de concentrações avaliadas e os coeficientes de determinação foram superiores ao recomendado pela literatura $R^2 > 0,99$ (ANVISA, 2003). O cromatograma referente à análise de fluido crevicular de um paciente não tratado com as formulações é apresentada no gráfico 3. Observa-se um pequeno sinal no tempo de retenção relativo ao benzoato de metronidazol (12,7 min). Considerando que as concentrações da curva são pequenas, optou-se por avaliar apenas o MDZ no tempo de 2 dias após a inserção da formulação na bolsa periodontal com o objetivo de verificar se o pequeno volume de fluido crevicular permitiu que os fármacos fossem solubilizados e liberados das formulações.

Gráfico 1. Curva analítica do metronidazol base em metanol, intervalo: 0,02 a 1,0 µg/mL.

Gráfico 2. Curva analítica do benzoato de metronidazol base em metanol, intervalo: 0,032 a 1,61 µg/mL.

Gráfico 3. Perfil cromatográfico de uma amostra de fluido crevicular coletada de um paciente não tratado com as formulações.

A concentração do fármaco após a aplicação do filme foi avaliada em 18 dentes, tendo sido possível quantificar o fármaco após 2 dias em 94,4% das amostras. A concentração encontrada foi de 49,03 µg/mL, estimando-se que o volume de fluido coletado pelo periopaper foi de 1 µL.

No caso do gel, foram avaliados 11 dentes e quantificado o fármaco em 54,5% destes. A concentração encontrada foi de 21,77 µg/mL.

Assim, é possível dizer que a formulação é capaz de liberar o fármaco no fluido crevicular, no entanto, os valores podem ser considerados baixos quando se avalia a quantidade de fármaco teórico. É esperado que em uma situação *in vivo* o fármaco vá sendo lavado do fluido crevicular e absorvido. Uma possibilidade para se tentar verificar o quanto de fármaco ficou retido no filme é avaliar a quantidade retida no filme após retirá-lo da bolsa periodontal. Essa abordagem será considerada em experimentos futuros.

5.2 Parâmetros clínicos

Um exame clínico periodontal deve incluir: reconhecimento dos sinais clínicos da inflamação como sangramento à sondagem (SS), profundidade de sondagem (PS), e nível clínico de inserção (NCI), bem como ressecção gengival; presença de fatores etiológicos e avaliação da higiene bucal; extensão dos danos causados às estruturas periodontais, problemas mucogengivais e avaliação oclusal. A presença da inflamação é avaliada visualmente e pela ocorrência de sangramento quando a gengiva é manipulada. A extensão dos danos às estruturas periodontais são mensurados, principalmente por esses parâmetros clínicos¹⁹.

5.2.1 Sangramento à sondagem

Os dados de sangramento à sondagem foram apresentados na forma de gráficos e tabela e as respectivas porcentagens de sangramento e número de pacientes estão contidos nos gráficos 4, 5 e 6 e Tabela 5.

Gráfico 4. Valores de sangramento à sondagem de acordo com o tempo nos pacientes que receberam tratamento periodontal convencional (RAR)

Gráfico 5. Presença de sangramento à sondagem de acordo com o tempo nos pacientes que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Gel).

Gráfico 6. Valores de sangramento à sondagem de acordo com o tempo nos pacientes que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Filme).

Tabela 5. Dados de número de pacientes avaliados e porcentagem de sangramento à sondagem para cada tratamento. O número entre parênteses representa o número de pacientes avaliado, o valor em porcentagem a parcela de pacientes em que houve sangramento.

Tratamento	Participantes / Tempo (nºde participantes) SS em %					
	T0	T7	T15	T30	T90	T180
RAR	(07)	(07)	(06)	(06)	(04)	(05)
	85,7%	42,8 %	50,0%	66,7%	75,0%	80,0%
RAR+Filme	(21)	(20)	(20)	(19)	(19)	(17)
	81,0%	15,0%	17,5%	21,1%	15,8%	17,7%
RAR+Gel	(16)	(16)	(14)	(16)	(11)	(11)
	87,5%	43,8%	39,3%	12,5%	18,2%	54,5%

5.2.2 Profundidade de sondagem (PS) e Nível Clínico de Inserção

Profundidade de sondagem (PS)

A PS representa à medida que vai da margem gengival até a porção mais apical da sonda periodontal; já o NCI reflete a distância da junção esmalte-cimento até a porção mais apical da sonda periodontal. O NCI é considerado um parâmetro mais confiável, pois ao contrário da PS, essa medida não está sujeita a variáveis decorrentes de alterações da margem gengival¹⁹.

Na Tabela 6 são apresentados os dados de nível clínico de inserção (NCI) e sulco gengival (SG) dos pacientes tratados com os procedimentos de Raspagem e alisamento radicular (RAR), RAR+filme, RAR+gel nos tempos T0, T7, T15, T30, T90 e T180 dias. Na Tabela foram plotados os dados NCI e Recessão gengival.

Os valores de NCI em T0 são superiores a 5 mm para todos os grupos, sendo observada uma tendência de diminuição dos valores com o tempo, em todos eles, não havendo diferenças em T180. Entretanto, há uma diferença bastante visível em relação à profundidade do sulco gengival, cujo valor de

normalidade é de até 2 mm. Assim, no caso dos filmes, embora seja observada uma maior recessão gengival em relação aos demais, a menor profundidade do sulco gengival pode ser interpretada como uma maior reinserção das fibras do epitélio juncional e maior reinserção da gengiva ao osso. Um menor sulco gengival também representa uma menor oportunidade para colonização bacteriana.

Tabela 6. Nível clínico de inserção e sulco gengival dos pacientes tratados com os procedimentos de Raspagem e alisamento radicular (RAR), RAR+filme, RAR+gel T0, T7, T15, T30, T90 e T 180 dias.

Tratamento	RAR		RAR+Filme		RAR+Gel	
	NCI	SG	NCI	SG	NCI	SG
T0	6,87	4,87	5,87	4,65	6,96	4,7
T7	4,93	3,43	3,95	2,57	5,24	1,72
T15	5,43	4,18	4,07	2,87	5,17	2,45
T30	3,50	2,24	3,02	2,32	4,87	0,55
T90	3,75	2,25	3,24	2,28	4,74	1,62
T180	5,34	3,34	4,76	3,54	5,69	2,97

A significância estatística foi determinada por ANOVA e pós-teste de Bonferroni e foi observada para o filme T30, no parâmetro sulco gengival.

Nível Clínico de Inserção

Os Gráficos 7 a 9 ilustram o Nível Clínico de Inserção dos pacientes submetidos aos tratamentos: Raspagem e alisamento radicular (RAR), RAR+ Filme e RAR+ Gel nos tempos T0, T7, T15, T30, T90 e T 180 dias. A porção em vermelho da barra corresponde ao valor de recessão gengival. Abaixo dos gráficos são apresentados os valores de ressecção gengival e profundidade de sondagem.

Gráfico 7. Valores do Nível Clínico de Inserção dos pacientes submetidos aos tratamentos: Raspagem e alisamento radicular (RAR).

Gráfico 8. Valores do Nível Clínico de Inserção dos pacientes submetidos aos tratamentos: (RAR + Gel).

Gráfico 9. Valores do Nível Clínico de Inserção dos pacientes submetidos aos tratamentos: (RAR + Filme).

5.3 Avaliação dos indicadores microbiológicos da periodontite

Foi avaliada a influência do tratamento sob o perfil microbiano dos pacientes submetidos à RAR e RAR associada às formulações é apresentada a significância estatística para cada micro-organismo analisado.

Os valores de p (Tabela 7) apontam se houve alteração para cada microrganismo ao longo do tempo (em destaque os complexos de Sockransky). Observa-se que o RAR foi capaz de reduzir a quantidade de algumas espécies. Entretanto, com os tratamentos houve uma redução muito mais significativa. Dentre as 35 espécies avaliadas, o procedimento de RAR foi capaz de atuar sobre 16, enquanto o filme e gel sobre 31 e 29 respectivamente.

Na sequência foram destacados os valores de p referentes aos microrganismos mais prevalentes na doença periodontal, e apresentados os valores de média e desvio padrão (Tabela 8). Quando se compara especificamente estas espécies, o RAR não foi capaz de propiciar a diminuição significativa para nenhuma delas. O gel foi capaz de agir sobre 3 e para o filme houve redução para todas, com nível de significância inferior à 0,01.

Estes resultados corroboram com os dados clínicos, sendo observado um efeito clínico relativamente superior para o filme.

Tabela 7. Valores de P para os diferentes tratamentos para todos os tempos analisados (T0, T7, T15, T30, T90, T180)

Microrganismo	RAR	RAR + Filme Valor de P	RAR + Gel
<i>C. albicans</i>	0,005**	0,02*	0,0001**
<i>V. parvula</i>	0,005**	0,0045**	0,0001**
<i>T. denticola</i>	0,1850	0,0001**	0,0001**
<i>T. forsythia</i>	0,4500	0,0001**	0,0001**
<i>S. sobrinus</i>	0,3800	0,0001**	0,0001**
<i>S. sanguinis</i>	0,0900	0,036*	0,003**
<i>S. salivarius</i>	0,02*	0,002**	0,017*
<i>S. pasteurii</i>	0,006**	0,05*	0,68
<i>S. parasanguinis</i>	0,0023**	0,0001**	0,03*
<i>S. oralis</i>	0,0620	0,0001**	0,024*
<i>S. mutans</i>	0,2300	0,017*	0,003**
<i>S. epidermidis</i>	0,028*	0,073	0,0178*
<i>S. mitis</i>	0,0114*	0,01*	0,022*
<i>S. constellatus</i>	0,53**	0,0009**	0,15
<i>S. aureus</i>	0,002**	0,055	0,0061**
<i>P. putida</i>	0,4000	0,0018**	0,0016**
<i>P. melaninogenica</i>	0,0007**	0,01*	0,001**
<i>P. intermedia</i>	0,1000	0,018*	0,06
<i>P. gingivalis</i>	0,4600	0,0011**	0,076
<i>P. endodontalis</i>	0,016*	0,03*	0,0001**
<i>P. anaerobios</i>	0,1000	0,0031**	0,0001**
<i>P. aeruginosa</i>	0,2700	0,018*	0,31
<i>N. mucosa</i>	0,0012**	0,0001**	0,0001**
<i>L. casei</i>	0,2400	0,003**	0,064
<i>K. pneumonia</i>	0,019*	0,0003**	0,036*
<i>F. nucleatum</i>	0,3100	0,0001**	0,0003**
<i>E. faecalis</i>	0,1400	0,27	0,0003**
<i>E. corrodens</i>	0,0007**	0,1	0,01*
<i>E. coli</i>	0,014*	0,0001**	0,0001**
<i>C. rectus</i>	0,003**	0,02*	0,022*
<i>C. gingivalis</i>	0,0900	0,0004**	0,0001**
<i>B. fragilis</i>	0,004**	0,0001**	0,0001**
<i>B. subtilis</i>	0,0001**	0,001**	0,003**
<i>Aa serotype b</i>	0,0700	0,0012**	0,0001**

* Significante pelo teste de Friedman ($p < 0.05$)** Significante pelo teste de Friedman ($p < 0.01$)

- Cores de acordo com os Complexos propostos por Socransky et. al, 1998

Tabela 8. Média ($\times 10^5$) e desvio padrão ($\pm$ DP) da contagem genômica pela análise de DNA Checkerboard para bactérias de maior relevância na doença periodontal

		<i>T. denticola</i>		<i>T. forsythia</i>		<i>P. gingivalis</i>		<i>F. nucleatum</i>		<i>P. intermedia</i>		<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
		Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP	Média	$\pm$ DP
RAR	T0	0,21	0,18	0,35	0,09	0,45	1,15	1,27	2,01	2,22	4,03	2,34	1,08
	T7	0,07	0,10	0,08	0,35	0,37	0,82	2,02	2,44	0,56	0,91	1,37	1,78
	T15	0,10	0,19	0,04	0,11	0,56	0,96	2,04	3,84	0,36	0,66	1,16	1,19
	T30	0,14	0,24	1,27	0,24	0,60	1,46	1,02	1,64	0,43	1,32	1,57	1,45
	T90	0,14	0,18	0,70	0,15	0,79	1,41	1,34	2,07	0,96	1,51	1,46	1,85
	T180	0,24	0,27	0,78	0,19	0,26	1,16	0,53	1,62	0,00	0,00	2,87	2,67
Valor de P		0,1850		0,45		0,46		0,31		0,1000		0,007	
RAR+Filme	T0	3,55	4,56	1,44	1,70	1,46	2,18	1,68	0,85	0,31	0,78	0,93	1,10
	T7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,74	0,74	0,39	0,17	0,50	0,29	0,57
	T15	0,14	0,75	0,00	0,00	0,60	1,06	0,58	1,03	0,72	1,17	0,00	0,00
	T30	0,14	0,75	0,00	0,00	0,19	0,69	0,50	1,09	0,40	1,01	0,45	0,99
	T90	0,00	0,00	0,16	0,61	1,30	1,46	0,80	2,02	0,96	1,55	1,12	1,53
	T180	1,19	2,13	0,45	1,14	0,47	1,02	0,65	1,28	0,92	1,51	1,63	2,09
Valor de P		0,0001**		0,0001**		0,0011**		0,0001**		0,0018*		0,0012**	
RAR+Gel	T0	2,66	2,45	2,33	1,73	0,93	1,54	0,61	1,18	2,41	2,49	1,44	1,63
	T7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,70	0,54	0,75	1,28	2,13	0,40	0,75
	T15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,71	0,44	0,87	1,39	1,18	0,62	1,01
	T30	0,14	0,75	0,17	0,61	1,41	1,40	0,69	1,13	0,89	1,36	0,82	1,34
	T90	1,72	2,05	0,38	1,12	1,41	1,96	1,83	2,17	2,19	2,13	2,28	2,21
	T180	1,32	1,68	0,46	1,15	1,47	1,86	1,72	1,43	0,87	1,40	0,91	1,36
Valor de P		0,0001**		0,076		0,076		0,0003**		0,06		0,0001**	

O ensaio clínico demonstrou que as duas formulações reduzem o sangramento à sondagem, um parâmetro clínico muito importante no diagnóstico de doenças periodontais.

Houve uma resposta clínica diretamente relacionada à ação do fármaco, e também uma influência desse resultado sobre a motivação dos pacientes em realizar uma higiene oral mais adequada. Ainda, no caso do filme houve uma redução do sulco gengival, resultado de uma melhor recuperação da gengiva. As duas formulações foram superiores na redução da carga microbiana, com um efeito relativamente superior para o sistema filmógeno.

5.4 Avaliação da permanência do filme e do gel em relação ao tempo

A presença do cimento cirúrgico não interferiu na permanência do fármaco quando administrado por meio de filme ou gel ($p>0,05$), porém houve notável dificuldade de coleta do gel, ou de seu possível remanescente após a remoção do cimento cirúrgico.

Assim foi possível avaliar a permanência do filme em diferentes composições na sua atividade bioadesiva intrabolsa periodontal.

Somente a título de curiosidade, as figuras 18 e 19 ilustram o tempo de permanência em dias (T2, T5 e T7 dias) dos filmes, em composições diferentes, e a possibilidade de maior permanência no interior da bolsa periodontal.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A Doença periodontal crônica inflamatória é causada por respostas imunológicas do hospedeiro a microrganismos periodontais. Embora a doença periodontal possa progredir localmente na cavidade oral, as respostas imunes reais procedem em dois sítios, sendo um na região periférica do periodonto, e outro em tecidos linfóides secundários, como os gânglios linfáticos e o baço⁸.

O tratamento periodontal mecânico por si só é suficiente para melhorar ou resolver a condição clínica na maioria dos casos. Entretanto, os agentes antimicrobianos adjuvantes administrados local ou sistemicamente, podem aumentar o efeito da terapia em situações específicas. Isto é, em casos de periodontite agressiva, em pacientes com doença sistêmica generalizada que pode afetar a resistência do hospedeiro, frente à terapia mecânica convencional²⁶.

Os avanços dos agentes antimicrobianos, sistêmicos ou tópicos, como adjuvantes na terapia periodontal não cirúrgica convencional (raspagem e alisamento radicular), têm estimulado o estudo da etiologia e do potencial patogênico da doença periodontal⁵.

Para a eliminação ou redução de espécies periodontopatogênicas, os agentes farmacológicos aplicados intrabolsa periodontal devem atingir o local de ação, mantendo concentrações adequadas por um período de tempo suficiente e em algumas situações, permanecerem após a raspagem e alisamento radicular^{5, 78}.

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vivo* sistemas semi-sólidos (géis) e filmes contendo metronidazol e benzoato de metronidazol como auxiliar no tratamento mecânico convencional (RAR) em pacientes com periodontite crônica através de parâmetros clínicos; nível clínico de inserção, profundidade de sondagem e sangramento à sondagem antes, e a presença e quantificação dos agentes microbiológicos antes, durante e após o tratamento periodontal.

6.1 Avaliação dos parâmetros clínicos

Os efeitos nos parâmetros clínicos após aplicação do gel de metronidazol a 15% em bolsas periodontais de indivíduos com periodontite crônica foram avaliados com o objetivo de testar se o uso local de antibióticos como terapia coadjuvante é superior ao tratamento não cirúrgico convencional (RAR).

Para a tomada e o registro das medidas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção dos sítios monitorados foi utilizado o sistema de sondagem computadorizado, Florida Probe[®]. Este sistema foi desenvolvido por Gibbs et al., 1988, e tem sido utilizado em trabalhos científicos por permitir uma pressão de sondagem constante (25g), minimizando erros durante os procedimentos de sondagem, além de realizar registros com até 0,2 mm de variação (Miani et. al. 2012).

Griffths et al. (2000), avaliaram o uso do Elyzol[®] como adjunto da raspagem e alisamento radicular foi capaz de promover melhoras significantes nos parâmetros clínicos avaliados. A redução na profundidade de sondagem e o ganho de inserção clínica foram estatisticamente superiores aos resultados observados com a RAR isolada. Os próprios autores atribuíram estes resultados superiores obtidos com o gel de metronidazol ao tempo gasto na instrumentação periodontal, e indagaram sobre o possível efeito de uma instrumentação menos eficiente na supervalorização de resultados obtidos após o emprego de antimicrobianos locais.

No presente estudo, foram observadas diferenças significantes para os parâmetros clínicos, assim como no estudo de Griffiths et. al. (2000); porém nossos dados podem ser comprovados com a complementação dos resultados dos parâmetros microbiológicos consonantes com o quadro clínico apresentado pelos grupos em que a RAR foi associada ao uso das formulações.

6.2 Avaliação da liberação do metronidazol intrabolsa periodontal

A avaliação da liberação de metronidazol a partir dos sistemas objetos deste estudo (gel e filme) cumpre destacar, não foi tarefa fácil. Apesar de o grupo já

possuir experiência prévia na produção de sistemas para a liberação de metronidazol na forma de géis e também na testagem em modelos *in vitro*^{43, 81}, *ex vivo*⁸² e *in vivo* tanto em modelo animal⁸⁶ quanto em humanos⁵, há que se salientar que ambos sistemas, gel e filme, são formulações inéditas.

Antes o princípio ativo testado era apenas o sal de metronidazol, composto hidrossolúvel facilmente diluído pela saliva. No presente estudo, como tentativa de sanar esta dificuldade de detecção e quantificação do fármaco por períodos mais prolongados, foi associado o benzoato de metronidazol que tem como característica ser hidrofóbico. Exaustivos estudos, testagens e retestagens foram feitas no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento Farmacotécnico (LPDF) da FCFRP-USP, com suporte financeiro da **FAPESP (processo nº 01/12377-4)** e estudos pilotos em humanos foram desenvolvidos pelo nosso grupo clínico para se chegar a dois sistemas mais robustos e com possibilidade de permanência do fármaco detectável em níveis clínicos por mais tempo que os estudos anteriores, que permaneciam detectáveis por um período máximo de 24 horas^{5, 86}.

Outro fator que colaborou na manutenção do fármaco intrabolsa, foi a colocação do cimento periodontal cirúrgico em ambos os grupos que receberam sistema de liberação local do metronidazol associado ao benzoato de metronidazol, após o tratamento periodontal convencional. O cimento cirúrgico atuou como barreira física, impedindo ou pelo menos dificultando a saída do fármaco logo após a sua inserção, permitindo então a atuação mais prolongada e a maior permanência do fármaco intrabolsa periodontal, contrastando com a metodologia do trabalho de Miani et al., 2012⁵ em que nenhuma barreira física foi instalada após a inserção do gel contendo metronidazol, o que pode ter facilitado a remoção do fármaco através dos fluídos salivares, reduzindo sua permanência nos sítios avaliados.

6.3 Avaliação da profundidade de sondagem

No presente estudo, pôde-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Porém, quando avaliado apenas os tempos, houve diferença estatística com relação diretamente proporcional, ou seja, quanto mais tempo decorrido após o tratamento, menores eram os índices de profundidade de sondagem. Ainda foi possível observar que após 7 dias do tratamento, houve uma

queda acentuada nos valores, mantendo-se constante até os 180 dias pós-tratamento.

Entretanto, podemos verificar que no grupo que recebeu o fármaco por meio do filme, houve uma diminuição dos valores de profundidade de sondagem, porém não de forma constante, mas com adesão dos tecidos superior aos outros dois grupos, com os níveis de ressecção gengival menores.

Sugere-se que a liberação de Metronidazol intrabolsa nesse grupo foi reduzida ou cessada, devido ao tempo de vida útil do filme. Dessa forma, pode-se observar um *burst* no grupo do filme nas primeiras 48 horas, que coincidiu com o período em que havia presença do filme na bolsa (o tempo variou de 2 a 5 dias entre os pacientes). Ou seja, as áreas com bolsas de 6-9 mm apresentaram em sua maioria profundidades de 3-4 mm.

Os resultados do presente estudo corroboram com os trabalhos de Riep; Purucker; Bernimoulin, 1999; Jansson; Bratthall; Soderholm, 2003; Perinetti et al.,

2004; Leiknes et al., 2007; Singh et al., 2009^{63, 67, 68, 71, 84}, que ao avaliarem a terapia periodontal convencional (RAR) associada ou não à aplicação local de Metronidazol, não obtiveram diferença estatística dos parâmetros clínicos avaliados entre os grupos. Mas o mesmo confronto, com resultados, referente aos parâmetros microbiológicos que demonstrou forte redução das bactérias periodontopatogênicas quando se compara os grupos com associação dos tratamentos frente ao tratamento convencional.

Por outro lado, autores como Lie et al. (1998) e Stelzel & Florès-de-Jacoby, (2000) observaram diferenças significantes quando da associação da terapia periodontal convencional (RAR) e ao metronidazol local, mas não chegaram a concluir se havia significância clínica nesta associação. Na presente pesquisa podemos concluir que houveram sinais clínicos e microbiológicos que demonstram uma evolução importante frente aos trabalhos encontrados na literatura especializada.

Segundo a Academia Americana de Periodontia (1997)¹⁰ a saúde periodontal pode ser observada clinicamente a partir de quatro a seis semanas após a realização do tratamento, em que se pode verificar a melhora clínica dos parâmetros avaliados.

Para Griffiths et al., 2000 este período corresponde ao início da fase de manutenção (em média 90 dias após o tratamento), como também pode ser observado no presente estudo, mas com resultados promissores por até 180 dias, o que permite um período de saúde maior que nos demais estudos. Esse fato propoem indícios que além da terapia ter sido efetiva, a motivação dos pacientes para com sua higiene oral e manutenção profissional, são primordiais para o controle da doença periodontal crônica.

6.4 Avaliação do sangramento à sondagem

O primeiro sinal que evidencia a presença de inflamação é o sangramento à sondagem provocado ou espontâneo. Apesar deste parâmetro não indicar a severidade da doença, é um indicador de extrema importância no diagnóstico e na avaliação das condições periodontais após a realização do tratamento proposto⁸⁷.

Nesse sentido, a ausência de sangramento indica saúde, entretanto Salvi et al (2002)⁶² demonstraram que qualquer força maior que 0,25N durante a sondagem

periodontal pode causar sangramento em sítios saudáveis, mesmo em um periodonto intacto. Além disso, a presença do sangramento não indica que está ocorrendo progressão ou atividade da doença, apenas que os tecidos estão inflamados.

No presente estudo, cerca de 80% dos pacientes apresentavam sangramento à sondagem no T=0 para os três grupos, apresentando uma redução para 17,7% após 180 dias do tratamento para o grupo RAR+ Filme, 80% para RAR e 54% para RAR+GEL, demonstrando que no parâmetro clínico SS, o filme se mostrou fortemente promissor. Esses resultados estão de acordo com Armitage, 2003⁸⁸ e Coelho et al., 2008⁸⁷, que avaliaram o sangramento à sondagem em

pacientes no T0 e 30 dias após, e observaram diminuição progressiva nos valores após o tratamento periodontal convencional. Os resultados apresentados neste estudo, mostraram diferença estatística entre os grupos filme + RAR x RAR e gel + RAR x RAR.

Vale ressaltar que a associação dos fármacos ao tratamento periodontal convencional promoveu diminuição do sangramento à sondagem. Entretanto, quando analisado a forma de liberação do fármaco, o gel reduziu significativamente o sangramento à sondagem quando comparado ao filme, que apresentou resposta mais rápida e estável ao longo do período avaliado.

6.5 Avaliação do Nível Clínico de Inserção

É o parâmetro que determina a extensão da destruição dos tecidos periodontais e deve ser realizada em pelo menos dois períodos diferentes⁸⁹⁻⁹².

No presente estudo, houve diferença estatística significativa para ambos os grupos avaliados (RAR, gel + RAR e filme + RAR) com diminuição progressiva no

NCI após 90 dias do tratamento, sendo mais expressivos nos grupos que receberam apenas a RAR e gel + RAR, quando comparado com o grupo que recebeu filme +

RAR. Isto pode ser explicado uma vez que o filme atua como barreira física e pode atrapalhar a reinserção das fibras periodontais, tornando-se menos previsível.

6.6 Avaliação Microbiológica pelo DNA Checkerboard

As técnicas tradicionais de cultura não permitem que sejam realizados estudos em larga escala que possam identificar os complexos ecossistemas microbiológicos. Além disso, devido à dificuldade de se cultivar bactérias anaeróbias, muitas vezes parte da microbiota subgengival é subestimada. O método DNA *Checkerboard* permite identificar microrganismos de difícil cultivo, possibilitando o diagnóstico quantitativo e simultâneo de um grande número de espécies em várias amostras. É uma técnica rápida, quando comparada aos métodos tradicionais de

cultura, sensível, e permite um melhor conhecimento sobre a microbiota periodontal, assim como o efeito das terapias periodontais na composição e manutenção dos biofilmes (SOCRANSKY et al., 2004).

Desta forma, o uso da técnica de hibridização DNA Checkerboard neste estudo, permitiu a avaliação de 38 espécies bacterianas na microbiota subgingival de 45 pacientes portadores de periodontite crônica, antes e após 7 até 180 dias da instituição das terapias de RAR, RAR + GEL contendo metronidazol e RAR + Filme contendo metronidazol. A maioria dessas espécies foi selecionada por serem consideradas as primeiras colonizadoras do biofilme bacteriano dentário ou por seus

Potenciais papéis no surgimento e desenvolvimento das doenças periodontais (Zee et al., 1996; Socransky et al., 1998).

Alguns estudos têm demonstrado que as espécies *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* constituem patógenos fundamentais para o desenvolvimento da periodontite (Pedrazzoli, Kilian, Karring, 1992; Perinetti et al., 2004; Bogren et al., 2008; Singh et al., 2009).

Outros estudos têm observado baixa efetividade destes agentes sobre a microbiota patogênica, ou limitados benefícios quando comparados à RAR isolada (Rudhart et al., 1998; Riep, Purucker, Bernimoulin, 1999; Jansson et al., 2004)

Em contrapartida, Singh et al., 2009 após utilizar uma esponja colágena impregnada com metronidazol, em bolsas periodontais de pacientes com periodontite, observaram redução significativa na proporção de bactérias gram negativas e um aumento das gram positivas após o uso deste sistema como coadjuvante da terapia convencional, utilizando a técnica da cultura para a análise microbiológica. O método PCR foi utilizado para identificar a presença de patógenos específicos como *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, confirmando que a incidência destas espécies foi reduzida após o tratamento com o metronidazol.

Quando se compara especificamente estas espécies no presente estudo, o metronidazol e o benzoato de metronidazol, foram capazes de reduzir as

espécies gram negativas e gram positivas, mesmo não ocorrendo redução significativa das gram positivas, contrapondo com Singh et. al 2009

Os dados microbiológicos do presente estudo mostraram que os três Grupos (RAR, RAR + Filme e RAR + gel) possuíam inicialmente (*baseline*) um perfil de colonização compatível com periodontite crônica, com níveis elevados de espécies do complexo laranja e, principalmente, do complexo vermelho. Quando os grupos foram comparados, levando-se em consideração a presença e quantidade de microrganismos, foi encontrada uma significativa diferença, entre os grupos no *baseline*, e nos tempos estudados. Diferente dos resultados apresentados por Miani et. al, 2012.

Entretanto, as limitações desta terapia na flora subgengival foram descritas por Haffajee et al. (1997), ao observar que apenas as espécies do complexo vermelho foram reduzidas após a RAR, e nenhuma das espécies avaliadas, inclusive as do complexo vermelho, foram eliminadas completamente com esta terapia. Segundo os autores, logo após a instituição da RAR, ocorre uma rápida recolonização das bolsas periodontais pela maioria das espécies, inclusive as benéficas, em 1 ou 2 semanas, a níveis comparáveis ao observado antes do tratamento.

Esses fatores após a criteriosa análise clínica, microbiológica e dos resultados, pode-se afirmar que foi obtido sucesso em relação à terapia proposta, com redução significativa dos microrganismos periodontopatogênicos para as duas formas adjuvantes Gel e Filme até 180 dias, no entanto, com melhores aplicações frente aos resultados para a terapia RAR+Filme. O que confronta os estudos de Rooney et al. 2002, Badersten; Nilveus; Egelberg, 1984; Shiloah; Patters, 1994; Haffajee et al, 1997; Khosravi et al., 2004; Cugini et al., 2000; López, 2006).

A forma com que a instrumentação mecânica foi conduzida neste estudo, também poderia gerar dúvidas em relação aos reais motivos que levaram à baixa eficiência da RAR em alterar a microbiota subgengival. Tem sido relatado que o tratamento da boca toda realizado em um único estágio promove melhores

resultados microbiológicos do que a instrumentação mecânica feita por quadrantes em sessões distintas (QUIRYNEN et al., 1999), reduzindo o risco de recolonização.

Entretanto, estudos mais recentes não conseguiram comprovar essa melhora significativa a favor do tratamento em estágio único (APATZIDOU et al., 2004. ZIJNGE et al., 2010). Mesmo assim, Zijnge et al. (2010) demonstraram uma redução significativa para a espécie *T. denticola* com o tratamento em estágio único.

Este estudo confronta resultados, de Miani et. al. 2012 e Jansson et. al. 2004, pois houve redução na quantificação das espécies periodontopatogênicas, corroborado com os resultados clínicos. Observa-se que o RAR foi capaz de reduzir a quantidade de algumas espécies. Entretanto, com os tratamentos houve uma redução muito mais significativa.

Dentre as 35 espécies avaliadas, o procedimento de RAR foi capaz de atuar sobre 16, enquanto o filme e gel sobre 31 e 29 respectivamente, apresentando redução dos indicadores de doença até 180 dias, com drástica diminuição do sangramento à sondagem para o filme, que pode ser classificado como o sinal primário de presença/ausência de saúde tanto para o profissional quanto para o paciente.

Uma observação intrigante no estudo de Miani et. al. 2012, foi que no grupo que recebeu apenas a RAR, não houve uma redução significativa na contagem do total de espécies avaliadas após o tratamento.

Os níveis das espécies consideradas patogênicas ou possíveis patógenos relacionados à periodontite, como as do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. Forsythensis*, *T. denticola*), laranja (*S. constelatus*, *P. micros*, *P. intermédia*, *F. periodonticum* e *F. nucleatum*) e as espécies *actinomycescomitans* b, permaneceram praticamente inalteradas. O mesmo pôde ser observado com bactérias menos relacionadas à doença periodontal como, por exemplo, algumas espécies de estreptococos.

Os resultados de Miani et. al. 2012, são divergentes em comparação a alguns relatos na literatura, nos quais a RAR foi capaz de reduzir o número total de

bactérias ou ao menos afetar a composição da microbiota subgengival (Badersten; Nilveus; Egelberg, 1984; Haffajee et al, 1997; Khosravi et al., 2004; Cugini et al., 2000; López, 2006). No entanto é o que também pôde ser verificado neste estudo, redução significativa em aproximadamente metade das espécies analisadas.

Este estudo complementou anteriores realizados por Sato et al. 2008 e Miani et al. 2010, resolvendo algumas limitações como: aumentando número de amostras empregadas nas avaliações clínica e microbiológica. Nesses estudos foram relatados que fatores relacionados à resposta imunológica individual de cada organismo podem ter um impacto fundamental no sucesso dos tratamentos, e neste sentido, um número aumentado de amostras poderia proporcionar resultados mais relevantes quanto à eficácia das terapias empregadas. Demonstrando que esta pesquisa foi acertiva nesses quesitos

Novas formulações para o tratamento adjuvante da periodontite foram desenvolvidas com melhores características mucoadesivas, e que proporcionaram uma liberação sustentada de fármacos no sítio doente, sendo testadas na busca de resultados mais favoráveis com esses sistemas de liberação intrabolsa periodontal, observação feita por Miani et al. 2010, e suprida para o desenvolvimento deste trabalho.

6.7 Considerações clínicas

Um tratamento periodontal não-cirúrgico eficaz diminui a PS, aumenta o NCI (proporcional à profundidade da bolsa) e reduz o SS, porém, o paciente deve estar ciente de que a recessão gengival (aproximadamente 2mm) é uma consequência esperada e que pôde ser comprovada clinicamente nesse estudo. Porém, colocando o paciente em estado de saúde periodontal, posteriormente podem ser realizadas algumas técnicas para melhorar a estética da região com recessão, como a dupla papila, deslocamento lateral de retalho ou enxerto de tecido conjuntivo.

O acúmulo de placa bacteriana, ocasionada principalmente pela falta de higiene oral, desencadeia respostas imunológicas e inflamatórias que são características dos quadros de gengivite e periodontite.

Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano. A gengivite pode aparecer após poucos dias de má higiene. Estas alterações inflamatórias são solucionadas ou revertidas quando se retomam as medidas adequadas para a limpeza dentária.

A progressão da gengivite para periodontite tem forte influência da susceptibilidade de cada organismo, a resposta do organismo também pode ser modificada por hormônios, como no caso de puberdade ou gravidez ou pelo uso de alguns tipos de medicamentos.

A presença de sangramento à sondagem tem sido tradicionalmente tomada como um indicador clínico objetivo do processo inflamatório do tecido conjuntivo, ainda que não diferencie a gengivite da periodontite. É interessante o fato de que o sangramento é um sinal mais sensível e precoce do que as alterações visuais, além de já ter sido relacionado a um aumento dos microrganismos sabidamente envolvidos na etiologia das doenças periodontais¹⁹.

O sangramento à sondagem é um fator preditivo e também indicativo da estabilidade periodontal em pacientes^{20 21}. Observou-se neste estudo diferenças muito marcantes entre a RAR e a RAR associada aos tratamentos com o gel e filme, para a RAR, há sangramento em torno de metade dos pacientes para os tempos T7, T15, T30 e T90, retornando para a maioria com sangramento em T180, já os pacientes tratados com as formulações, no caso do gel houve redução de sangramento de T30 a T90, com uma evolução progressiva ao longo dos tempos e retornando para cerca de metade dos pacientes com sangramento em T180. No caso do filme, houve uma melhora rápida e mais permanente, também retornando para cerca de metade dos pacientes com sangramento em T180.

A permanência do filme no interior da bolsa periodontal foi de no máximo 7 dias, assim, não é esperada a presença do fármaco nos maiores tempos.

A melhora dos quadros periodontais depende tanto de um tratamento adequado, executado pelo profissional, mas também, da melhora dos hábitos do paciente. Assim, acreditamos que um fator relevante para o sucesso do tratamento

por esse longo período de tempo foi a motivação do paciente para melhorar esses cuidados com a observação da melhora do quadro de sangramento, que é o parâmetro indicativo mais facilmente percebido por aqueles que não são profissionais.

O paciente também deve ser informado de que a higiene oral deve permanecer rigorosa depois do tratamento periodontal, para que não haja reinfecção das bolsas periodontais e recorrência da doença periodontal destrutiva.

Não obstante a esses fatos, nossos resultados demonstraram ser promissores frente à utilização das formulações desenvolvidas e testadas clinicamente até 90 dias, considerando-se a hipótese de recolonização por volta de 180 dias, mas ainda com indícios de melhora da saúde periodontal quando comparados ao *baseline*. Esses fatores clínicos geraram perspectivas positivas para a sequência da linha de pesquisa, já bem fundamentada, para a entrega de um produto final com perspectivas de uso comercial.

Contribuição Clínica do Estudo

Com o trabalho interdisciplinar envolvendo farmacêuticos e cirurgiões-dentistas, foi possível desenvolver um produto com boas perspectivas de uso comercial, através de um protocolo de aplicação bem definido, e com resultados que se mostraram promissores para novos estudos e uso na clínica diária, favorecendo a recuperação da saúde em indivíduos acometidos pela periodontite, ainda uma patogenia de caráter controlável e muito dependente da motivação dos clientes por ela acometidos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados do desenvolvimento e da avaliação *in vivo* dos sistemas bioadesivos contendo metronidazol e conjugado de benzoato de metronidazol, objetivando o tratamento adjuvante da periodontite crônica em humanos e, dentro das limitações do estudo, é lícito concluir que:

- Os sistemas poliméricos desenvolvidos e avaliados neste estudo, somados à RAR, indicaram que houve redução estatisticamente significativa quando comparados ao tratamento clínico convencional (RAR).
- Os pacientes que receberam tratamento periodontal convencional associado à aplicação do fármaco através do filme (RAR + filme) apresentaram redução progressiva nos valores de profundidade de sondagem, que se mantiveram até os 180 dias após o tratamento;
- A análise microbiológica para as espécies *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* b, patógenos fundamentais para o desenvolvimento da periodontite, demonstrou que houve a redução drástica para 3 dessas espécies pelo uso do gel + RAR, com redução de todas essas espécies para o grupo filme + RAR. Esses achados são corroborados pelos dados clínicos, com uma melhora clínica superior para o sistema filmógeno.

Referências

REFERÊNCIAS¹

1. Miani PK. Avaliação de um gel contendo metronidazol para o tratamento adjuvante da periodontite crônica. Ribeirão Preto, 2010. 170f. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. (Tese de Doutorado em Reabilitação Oral), 2010.
2. Badersten A, Nilveus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1984;11(1):63-76.
3. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol*. 1984;11(3):193-207.
4. J L. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia. 4 edição ed. 2005.
5. Miani PK, do Nascimento C, Sato S, Filho AV, da Fonseca MJ, Pedrazzi V. In vivo evaluation of a metronidazole-containing gel for the adjuvant treatment of chronic periodontitis: preliminary results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1611-8.
6. Weyne S. Curso para a atualização e educação continuada em odontologia preventiva (cariologia). *Revista Brasileira de Odontologia*. 1986;43(2):58-64.
7. Pedrazzi V. Sistemas bioadesivos intrabuciais para a liberação programada de fármacos: avaliação da resistência à remoção de um dispositivo acrílico e um polimérico. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1999; Doutorado:169 f.
8. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontal Res*. 2006;41(5):361-73.
9. Azoubel MCF, Azoubel E, Actis A, DÁguiar RCF. A influência dos antiinflamatórios não-esteroidais no controle da doença periodontal. *Innov Implant J - Biomater Esthet*. 2009;2(1):58-61.
10. Periodontology AAo. Comprehensive periodontal therapy: a statement by the American Academy of Periodontology *. *J Periodontol*. 2011;82(7):943-9.
11. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol*. 2001;28(7):597-609.

¹De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors - padrão ANSI, adaptado pela U.S. National Library of Medicine (estilo VANCOUVER). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed> (acessado em 10 de abril de 2017).

12. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2006;42:180-218.
13. Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol*. 1994;65(9):827-34.
14. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24(5):324-34.
15. López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006;33(9):648-60.
16. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol*. 1990;61(9):579-84.
17. Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol*. 2000;71(1):14-21.
18. Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000*. 2002;28:56-71.
19. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res*. 2005;84(1):59-63.
20. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1988;59(4):222-30.
21. Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe TJ, Dierickx K, Cassiman JJ, van Steenberghe D. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* strains to cultured epithelial cells from patients with a history of chronic adult periodontitis or from patients less susceptible to periodontitis. *J Periodontol*. 2001;72(5):626-33.
22. Colombo AV, Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 5):609-15.
23. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol*. 1990;61(9):579-84.

24. Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*. 2000;27(1):30-6.
25. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000*. 2006;42:219-58.
26. Mombelli A, Samaranayake LP. Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J*. 2004;54(1):3-14.
27. Pähkla ER, Koppel T, Saag M, Pähkla R. Metronidazole concentrations in plasma, saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):163-6.
28. Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol*. 1991;62(4):247-57.
29. Ribeiro EeP, Bittencourt S, Zanin IC, Bovi Ambrosano GM, Sallum EA, Nociti FH, et al. Full-mouth ultrasonic debridement associated with amoxicillin and metronidazole in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009;80(8):1254-64.
30. Loesche WJ, Grossman N, Giordano J. Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *J Clin Periodontol*. 1993;20(2):96-104.
31. Rizzo A, Paolillo R, Guida L, Annunziata M, Bevilacqua N, Tufano MA. Effect of metronidazole and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(7):744-50.
32. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*. 2010;50 Suppl 1:S16-23.
33. Clark DC, Shenker S, Stulginski P, Schwartz S. Effectiveness of routine periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole therapy in a sample of mentally retarded adolescents. *J Periodontol*. 1983;54(11):658-65.
34. Britt MR, Pohlod DJ. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol*. 1986;57(2):104-7.
35. Levin-Goldstein D. The local drug delivery of tetracycline, metronidazole, and chlorhexidine in periodontal therapy. *J Dent Hyg*. 1992;66(9):410-6.
36. Tenenbaum H, Jehl F, Gallion C, Dahan M. Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1997;24(11):804-7.
37. Kurtzman GM, Hughes MK. Evolution of Comprehensive Care, Part 3. Periodontal Treatment Continues to Evolve. *Dent Today*. 2015;34(5):90, 2, 4-7.

38. Wainwright M, Crossley KB. Photosensitising agents — circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeter Biodegrad*. 2004;53(2):119-26.
39. Oruba Z, Łabuz P, Macyk W, Gajewska MC. Antimicrobial photodynamic therapy - a discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015.
40. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(12):889-905.
41. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2000-6.
42. Goodson JM, Haffajee A, Socransky SS. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. *J Clin Periodontol*. 1979;6(2):83-92.
43. Bruschi ML, Panzeri H, Freitas O, Lara EHG, Gremião MPD. Sistemas de Liberação de Fármaco Intrabolsa Periodontal. *Revist a Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006;42(1):29 - 47.
44. Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. *J Periodontol*. 1983;54(10):575-9.
45. Goodson JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:142-68.
46. Soskolne WA. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):164-74.
47. Addy M, Rawle L, Handley R, Newman HN, Coventry JF. The development and in vitro evaluation of acrylic strips and dialysis tubing for local drug delivery. *JPeriodontol*. 1982;53(11):693-9.
48. Soskolne WA, Chajek T, Flashner M, Landau I, Stabholtz A, Kolatch B, et al. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *J Clin Periodontol*. 1998;25(12):1017-21.
49. Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol*. 1989;16(4):259-64.
50. Cetin EO, Buduneli N, Atlihan E, Kirilmaz L. In vitro studies on controlled-release cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin, and meloxicam. *J Clin Periodontol*. 2004;31(12):1117-21.
51. Nakagawa T, Yamada S, Oosuka Y, Saito A, Hosaka Y, Ishikawa T, et al. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline) following scaling and root planing in recurrent periodontal pockets. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1991;32(2):63-70.

52. Graça MA, Watts TL, Wilson RF, Palmer RM. A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria. *J Clin Periodontol.* 1997;24(4):249-53.
53. Needleman IG, Watts TL. The effect of 1% metronidazole gel in routine maintenance of persistent furcation involvement in human beings. *J Periodontol.* 1989;60(12):699-703.
54. Ainamo J, Lie T, Ellingsen BH, Hansen BF, Johansson LA, Karring T, et al. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1992;19(9 Pt 2):723-9.
55. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Quadrant root planning versus same day full-mouth planning. II. Microbiological findings. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v.31, 2004; 31: 141-48.
56. Do Nascimento, C.; Monesi, N.; da Silva, J. A.; de Albuquerque, R. F. Junior. An alternative method for direct DNA probe labeling and detection on checkerboard hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, Jun. 2010. In Press.
57. Klinge B, Attström R, Karring T, Kisch J, Lewin B, Stoltze K. 3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. *J Clin Periodontol.* 1992;19(9 Pt 2):708-14.
58. Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T. Comparative clinical and microbiological effects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1992;19(9 Pt 2):715-22.
59. Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Adjunctive systemic and locally delivered metronidazole in the treatment of periodontitis: a controlled clinical study. *Br Dent J.* 1998;184(11):548-52.
60. Yewey GL, Duysen EG, Cox SM, Dunn RL. Delivery of proteins from a controlled release injectable implant. *Pharm Biotechnol.* 1997;10:93-117.
61. Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Bandt CL, Hanes PJ, Killoy WJ, et al. Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II. Clinical results. *J Periodontol.* 1997;68(2):119-26.
62. Awartani FA, Zulqarnain BJ. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *Quintessence Int.* 1998;29(1):41-8.
63. Griffiths GS, Smart GJ, Bulman JS, Weiss G, Shrowder J, Newman HN. Comparison of clinical outcomes following treatment of chronic adult periodontitis with subgingival scaling or subgingival scaling plus metronidazole gel. *J Clin Periodontol.* 2000;27(12):910-7.

64. Salvi GE, Mombelli A, Mayfield L, Rutar A, Suvan J, Garrett S, et al. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 2002;29(6):540-50.
65. Jansson H, Bratthall G, Söderholm G. Clinical outcome observed in subjects with recurrent periodontal disease following local treatment with 25% metronidazole gel. *J Periodontol*. 2003;74(3):372-7.
66. Paquette D, Oringer R, Lessem J, Offenbacher S, Genco R, Persson GR, et al. Locally delivered minocycline microspheres for the treatment of periodontitis in smokers. *J Clin Periodontol*. 2003;30(9):787-94.
67. Renvert S, Lessem J, Dahlén G, Lindahl C, Svensson M. Topical minocycline microspheres versus topical chlorhexidine gel as an adjunct to mechanical debridement of incipient peri-implant infections: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2006;33(5):362-9.
68. Jansson H, Hamberg K, Söderholm G, Bratthall G. The microbial outcome observed with polymerase chain reaction in subjects with recurrent periodontal disease following local treatment with 25% metronidazole gel. *Swed Dent J*. 2004;28(2):67-76.
69. Perinetti G, Paolantonio M, Cordella C, D'Ercole S, Serra E, Piccolomini R. Clinical and microbiological effects of subgingival administration of two active gels on persistent pockets of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2004;31(4):273-81.
70. Leiknes T, Leknes KN, Bøe OE, Skavland RJ, Lie T. Topical use of a metronidazole gel in the treatment of sites with symptoms of recurring chronic inflammation. *J Periodontol*. 2007;78(8):1538-44.
71. Kaner D, Christan C, Dietrich T, Bernimoulin JP, Kleber BM, Friedmann A. Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2007;78(7):1201-8.
72. Barat R, Srinatha A, Pandit JK, Anupurba S, Mittal N. Chitosan inserts for periodontitis: influence of drug loading, plasticizer and crosslinking on in vitro metronidazole release. *Acta Pharm*. 2007;57(4):469-77.
73. Singh S, Roy S, Chumber SK. Evaluation of two local drug delivery systems as adjuncts to mechanotherapy as compared to mechanotherapy alone in management of chronic periodontitis: A clinical, microbiological, and molecular study. *J Indian Soc Periodontol*. 2009;13(3):126-32.
74. Kumari N, Pathak K. Dual controlled release, in situ gelling periodontal sol of metronidazole benzoate and serratiopeptidase: statistical optimization and mechanistic evaluation. *Curr Drug Deliv*. 2012;9(1):74-84.
75. Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, et al. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *J Clin Periodontol*. 2012;39(6):526-36.

- 76 Matesanz P, Herrera D, Echeverría A, O'Connor A, González I, Sanz M. A randomized clinical trial on the clinical and microbiological efficacy of a xanthan gel with chlorhexidine for subgingival use. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):55-66.
- 77 Da Silva MA, Oliveira RN, Mendonça RH, LourençoTG, Colombo AP, Tanaka MN, et al. Evaluation of metronidazole-loaded poly(3-hydroxybutyrate) membranes to potential application in periodontitis treatment. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015.
- 78 Paul TP, Emmatty R, Pulikkottil JJ, Rahman AA, Kumar SA, George N. Comparative Evaluation of Sustained Release Collagen Device Containing 5% Metronidazole (Metrogene) along With and Without Scaling and Root Planing at Regular Intervals with Treatment of Chronic Periodontitis: A Case Control Study. *J Int Oral Health*. 2015;7(6):18-22.
- 79 Bergamaschi CC, Santamaria MP, Berto LA, Cogo-Müller K, Motta RH, Salum EA, et al. Full mouth periodontal debridement with or without adjunctive metronidazole gel in smoking patients with chronic periodontitis: A pilot study. *JPeriodontal Res*. 2015.
- 80 Goodson JM. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res*. 1989;68(1):1625 - 32.
- 81 Eggert FM, Drewell L, Bigelow JA, Speck JE, Goldner M. The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch Oral Biol*. 1991;36(3):233-8.
- 82Galgut PN. The relevance of pH to gingivitis and periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2001;3(3):61-7.
- 83Gabarra F. *Dispositivos de liberação lenta de antimicrobianos no tratamento da periodontite*: revisão da literatura.: Universidade de São Paulo; 1996.
- 84Cid YP, Pedrazzi V, de Sousa VP, Pierre MB. In vitro characterization of chitosan gels for buccal delivery of celecoxib: influence of a penetration enhancer. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(1):101-11.
- 85Sato S, Fonseca MJ, Ciampo JO, Jabor JR, Pedrazzi V. Metronidazole-containing gel for the treatment of periodontitis: an in vivo evaluation. *Braz Oral Res*. 2008;22(2):145-50.
- 86Riep B, Purucker P, Bernimoulin JP. Repeated local metronidazole-therapy as adjunct to scaling and root planing in maintenance patients. *J Clin Periodontol*. 1999;26(11):710-5.
- 87Lie T, Bruun G, Bøe OE. Effects of topical metronidazole and tetracycline in treatment of adult periodontitis. *J Periodontol*. 1998;69(7):819-27.

- 88 Stelzel M, Florès-de-Jacoby L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 2000;27(6):447-52.
- 89 Coelho RS GE, Grangeiro ERN, Barbosa MR, Lima TSL, Cimões R. Índice de sangramento à sondagem como parâmetro de avaliação do tratamento básico periodontal. *Int J Dent*. 2008;7(3):166-72.
- 90 Armitage GC, Research SiaTCotAAoP. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2003;74(8):1237-47.
- 91 Page RC, DeRouen TA. Design issues specific to studies of periodontitis. *J Periodontal Res*. 1992;27(4 Pt 2):395-404; discussion 12-6
- 92 Pihlstrom B. Issues in the evaluation of clinical trials of periodontitis: a clinical perspective. *J Periodontal Res*. 1992;27(4 Pt 2):433-41.
- 93 Armitage GC. Manual periodontal probing in supportive periodontal treatment. *Periodontol 2000*. 1996;12:33-9.
- 94 Magnusson I. Computerized periodontal probing. *Periodontol 2000*. 1996;12:40-3.
- 95 Socransky, S. S.; Smith, C.; Martin, L.; Paster, B. J.; Dewhirst, F. E.; Levin, A. E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, Natick, v. 17, n. 4, p. 788-792, Oct. 1994.
- 96 Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Cugini, M. A.; Smith, C.; Kent, JR. R L. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 25, n. 2, p.134-44, Feb. 1998.
- 97 Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v.28, p. 12-55, 2002.
- 98 Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Smith, C.; Martin, L.; Haffajee, J. A.; Uzel, N. G.; Goodson, J. M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen, v.19, n. 6, p. 352-62, Dec. 2004.
- 99 Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v. 38, p. 135-87, 2005.
- 100 Somayaji, B. B.; Jariwala, U.; Jayachandran, P.; vidyalakshmi, D.; Dudhani, R. V. Evaluation of antimicrobial efficacy and release pattern of tetracycline and metronidazole using a local delivery system. *Journal of Periodontology*, Chicago, v. 69, n. 4, p. 409-413, Apr. 1998.

- 101 Soskolne, W. A. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal diseases *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, Boca Raton, v.8, n.2, p.164-74, 1997.
- 102 Soskolne, W. A.; Chajek, T.; Flashner, M.; Landau, I.; Stabholtz, A.; Kolatch, B.; Lerner, E. I. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 25, n. 12, p. 1017-1021, Dec. 1998.
- 103 Sosnik, A.; Cohn, D. Ethoxysilane-capped PEO–PPO–PEO triblocks: a new family of reverse thermo-responsive polymers. *Biomaterials*, Guilford, v. 25, n. 14, p. 2851-2858, Jun. 2004.
- 104 Stelzel, M.; Florès-De-Jacoby, L. Topical metronidazole application as an adjunct to scaling and root planning. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 27, n. 6, p.447-452, Jun. 2000.
- 105 Stoltze, K. Elimination of Elyzol 25% Dental gel matrix from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 22, n. 3, p. 185-187, Mar. 1995.
- 106 Stoltze, K.; Stellfeld, M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 19, n. 9 Pt 2, p. 693-697, Oct. 1992.
- 107 Teles, R. P.; Haffajee, A. D.; Socransky, S. S. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000*, Copenhagen, v.42, p. 180-218, 2006.
- 108 Teles, R. P.; Gursky, L. C.; Faveri, M.; Rosa, E. A.; Teles, F. R.; Feres, M.; Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 37, v.4, p. 313-23, Apr. 2010.
- 109 Theilade, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v.13, n.10, p. 905-11, Nov. 1986.
- 110 Tenenbaum, H.; JEHL, F., GALLION, C.; DAHAN, M. Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology*, Copenhagen, v. 24, n.11, p. 804–807, Nov. 1997.

- 111 Tiwari, G.; Tiwari, R., RAI, A. K. Studies on development of controlled delivery of combination drug(s) to periodontal pocket. Indian Journal of Dental Research, Ahmedabad, v.21, n.1, p.72-83, Jan-Mar. 2010.
- 112 Uitto, V. J.; Overall, C. M.; McCulloch, C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. Periodontology 2000, Copenhagen, v.31, n.1, p.77-104, 2003.
- 113 Van Oosten, M. A.; Notten, F. J.; Mikx, F. H. Metronidazole concentrations in human plasma, saliva, and gingival crevice fluid after a single dose. Journal of Dental Research, Chicago , v.65, n.12, p1420–1423. Dec. 1986.
- 114 Vandekerckhove, B.N.; Quirynen, M.; Van Steenberghe, D. The use locally delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis: a review of the literature. Journal of Clinical Periodontology, Copenhagen, v. 25, n. 11 Pt 2, p. 964-968, Nov. 1998.
- 115 Zambon, J. J. Periodontal Diseases: Microbial Factors. Annals of Periodontology, Chicago, vol. 1, n.1 p.879-925, Nov. 1996.
- 116 Zee, K.Y.; Samarayabe, L.P.; Attstrom, R. Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese rapid and slow plaque formers. Journal of Clinical Periodontology, Copenhagen, v. 23, n. 11, p. 1025-1031, Nov. 1996.
- 117 Zijlge, V.; Meijer ,H. F.; Lie, M. A.; Tromp, J. A.; Degener, J. E.; Harmsen, H. J.; Abbas, F. The recolonization hypothesis in a full-mouth or multiple-session treatment protocol: a blinded, randomized clinical trial. Journal of Clinical Periodontology, Copenhagen, v.37, n.6, p.518-25, Jun. 2010.

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A – Exemplo do *software* para as 35 espécies analisadas aplicando-se o teste de Friedman. Gerando 35 tabelas semelhantes para cada grupo. Total de 105 telas idênticas a abaixo.

Graphical prism (viewer mode) /JLZ - JA sb time pzrcol; stats of Data 1

File Edit View Insert Change Average Family Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Interpret Change Draw Write Text Export Print Send LA Help

Search results
Data tables
Data 1
Info
Project info: 1
Results
Friedman test of Data 1
Friedman test of Data 1
Go: stats of Data 1
Graphics
Data 1
Layouts

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
	A	A b	A	A	A	A	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
	b	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Col: state														
1 Number of values	28	28	28	28	28	28								
2 Minimum	0	0	0	0	0	0								
3 Friedman test of Data 1	0	0	0	0	0	0								
4 25% Percentile	0	0	0	0	0	0								
5 Median	0	0	0	0	0	0								
6 75% Percentile	214229	0	0	0	0	307398	396605							
7 Maximum	233374	165196	0	284371	332273	475087								
8 Mean	93473	29322	0	45163	111647	163473								
9 Std. Deviation	110070	67458	0	99128	152717	208641								
10 Std. Error of Mean	20801	10859	0	18733	28861	39429								
11 Lower 95% CI of mean	60792	7042	0	6715	52429	82570								
12 Upper 95% CI of mean	136154	51602	0	83591	170865	244375								
13 Sum	2617240	821022	0	1264279	3126119	4577232								
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														

Col: stats of Data 1

Column statistics

02:00
22/04/2017

APÊNDICE B Gráficos representam os dados obtidos no denominador intragrupo para a profundidade de sondagem

Apêndice B.1 Valores de sangramento à sondagem de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Gel).

Apêndice B.2 Valores de sangramento à sondagem de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Filme).

APÊNDICE C Gráficos representam os dados obtidos no denominado intragrupo para a profundidade de sondagem

Apêndice C.1 Valores de profundidade de sondagem de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Gel).

Apêndice C.2 Valores de profundidade de sondagem de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao filme (RAR + Filme).

APÊNDICE D Gráficos representam os dados obtidos no denominado intragrupo para a profundidade de sondagem

Apêndice D.1 Valores de resseção gengival de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Gel).

Apêndice D.2 Valores da resseção gengival de acordo com o tempo nos pacientes do intragrupo que receberam tratamento periodontal convencional associado ao gel (RAR + Gel).

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Forp-USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO Comitê de Ética em Pesquisa</p>
Of. CEP 170/2015	Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2015.
<p>Processo nº 2011.1.907.58.0</p>	
Senhor(a) Pesquisador(a),	
<p>Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 184ª Sessão, realizada em 30/09/2015, aprovou o Relatório Parcial do Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado "Avaliação clínica de formulações semi-sólidas e filmógenas contendo metronidazol para o tratamento da doença periodontal".</p>	
<p>Salientamos a necessidade de entregar, na Secretaria do CEP, os Relatórios Parciais em 15/03/2016 e 15/09/2016 e o Relatório Final em 15/03/2017.</p>	
Atenciosamente,	
<p> Prof. Dra. Simone Cecílio Hallak Regalo Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa</p>	
<p>Ilmo(a). Sr(a). Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi Departamento de Materiais Dentários e Prótese FORP/USP</p>	
./dc	
<hr/> <p>AVENIDA DO CAFÉ S/Nº - TEL: (16) 3315-0493 - FAX: (16) 3315-4102 14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP - BRASIL</p>	

ANEXO 2 - Exemplo do Termo de Compromisso assinado pelos voluntários da pesquisa

Eu, _____, fui convidado(a) e devidamente esclarecido(a) com a finalidade de autorizar minha participação como sujeito na pesquisa “Avaliação clínica de formulações semi- sólidas e filmógenas contendo metronidazol para o tratamento da doença periodonta I” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi (pesquisador responsável), Dr Paulo Linares Calefi e Dra Monica Danielle Ribeiro Bastos, e asseguro que me foram dadas todas as explicações necessárias para tomar a decisão de livre e espontânea vontade. Tenho conhecimento que:

Este trabalho visa comparar a eficiência de tratamento de dois sistemas de liberação local de metronidazol (antibiótico), sendo um na forma de gel e outro na forma de filme, no tratamento da doença da gengiva. Para isso será realizado um estudo clínico com 45 pacientes portadores de doença gengival crônica, os quais receberão o tratamento convencional (raspagem e alisamento da raiz dental), seguido ou não da aplicação local do gel ou filme. Os sujeitos não serão submetidos a regime de espera de tratamento entre uma etapa e outra ou de ausência de tratamento (placebo), e serão distribuídos por sorteio em 3 grupos: Grupo 1-Raspagem e alisamento da raiz; Grupo 2- Raspagem e alisamento da raiz + gel de metronidazol; Grupo 3 - - Raspagem e alisamento da raiz + filme de metronidazol. Parâmetros clínicos (profundidade à sondagem, nível clínico de inserção gengival e sangramento à sondagem), microbiológicos (colheita de placa bacteriana subgengival) e imunológicos (colheita de fluido gengival) serão avaliados no decorrer do estudo. A concentração do medicamento presente nas bolsas gengivais também será avaliada por meio da colheita do líquido gengival.

1. É condição seletiva desse estudo que os sujeitos possuam dentes naturais e/ou próteses dentárias fixas, e que não apresentem condições sistêmicas indicativas de doenças crônicas, nem estejam fazendo uso de qualquer tipo de antibiótico ou agente antimicrobiano;

2. Com este estudo espera-se avaliar o grau de melhora da saúde periodontal conseguido com tratamento clínico de raspagem e alisamento da raiz e/ou o emprego de sistemas para a liberação controlada de metronidazol;

3. Efeitos colaterais adversos severos não são esperados, pois os pacientes serão submetidos a um rigoroso questionário clínico e os produtos empregados para a obtenção dos sistemas terapêuticos são aprovados como complementos alimentares, e o princípio ativo (metronidazol) é indicado para tratamento de doença gengival;

4. Em caso de efeitos colaterais moderados a severos, serei excluído (a) do estudo para evitar qualquer tipo de dano à minha saúde;

5. Não está prevista a ocorrência de qualquer tipo de constrangimento ou ofensa aos indivíduos selecionados;

6. Os pesquisadores se comprometem a prestar assistência integral no decorrer da pesquisa;

7. Caso ocorra algum dano à minha saúde, em razão da minha participação na pesquisa, os pesquisadores serão responsáveis por quaisquer despesas;

8. Os pesquisadores manterão sigilo sobre a minha participação na pesquisa;

9. Como minha participação é voluntária, tenho direito de interrompê-la em qualquer momento, sem sofrer penalizações.

10. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.

Ribeirão Preto,..... de de 2015.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

PACIENTE OU RESPONSÁVEL

RG: _____

Telefone: () _____

Endereço: _____

PROF. DR. VINÍCIUS PEDRAZZI
(16) 3615-4008 / 3602-3983
pedrazzi@forp.usp.br

DR. PAULO LINRAES CALEFI
(16) 3615-4095 / 98128-5573
pcalefi@usp.br

DRA. MÔNICA DANIELLE RIBEIRO BASTOS
(16) 3621-8482 / 98119-5800
monica.danielle.bastos@usp.br

Nome do Secretário do CEP: Sra. Camila Floriano deCastro
Endereço e telefone do CEP: Seção de Apoio Acadêmico, Prédio da Administração
FORP/USP. Fone (16) 3315-4129