

GLORIA MARCELA RAMÍREZ LEMUS

**Efeito de um creme dental contendo ácido oleanólico na redução da gengivite:
um ensaio clínico randomizado, duplo cego**

São Paulo
2020

GLORIA MARCELA RAMÍREZ LEMUS

**Efeito de um creme dental contendo ácido oleanólico na redução da gengivite:
um ensaio clínico randomizado, duplo cego**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe A. Romito

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ramírez Lemus, Gloria Marcela.

Efeito de um creme dental contendo ácido oleanólico na redução da gengivite: um ensaio clínico randomizado, duplo cego / Gloria Marcela Ramírez Lemus; orientador Giuseppe Alexandre Romito. -- São Paulo, 2020.

76 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Ácido oleanólico. 2. Gengivite. 3. Cremes dentais. 4. Placa dentária. 5. Clorexidina. I. Romito, Giuseppe Alexandre. II. Título.

Ramírez Lemus GM. Efeito de um creme dental contendo ácido oleanólico na redução da gengivite: um ensaio clínico randomizado, duplo cego. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 08/08/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Giuseppe Alexandre Romito

Instituição: Universidade de São Paulo. Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Cristina Cunha Villar

Instituição: Universidade de São Paulo. Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Juliano Cavagni

Instituição: Universidade Federal Rio Grande do Sul. Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Bruno Gurgel

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho,

A **Deus**, quem primeiro me deu o milagre da vida. Agradeço ter me dado a oportunidade de vir para outro país para estudar, acredito verdadeiramente que Deus nos dá muito mais do que podemos imaginar ou pedir. Agradeço o fato de sentir sua presença e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida. Agradeço ter seu amor em meu coração, porque isso me permite que durante o caminho de cada sono possa ter gratidão nos momentos bons e também nas dificuldades. Agradeço a Deus, por me ensinar que cada experiência, muito além das expectativas, é uma oportunidade de crescer e aprender em cada área da vida. Agradeço infinitamente, Senhor, por acalmar meu coração nos momentos em que me senti fraca, por teu infinito amor, paciência, carinho, compaixão e bondade.

Agradeço aos meus pais, **Héctor Gonzalo Ramírez** e **Gloria Lemus**, por seu apoio e amor incondicional. Por suas palavras de carinho e compreensão. Por me ensinar valores e princípios que me tornaram a pessoa que eu sou. Sou imensamente grata a Deus por escolhê-los como os meus pais, porque vejo a Sua graça e bondade refletidas quando olho para vocês. Hoje, estou convencida mais uma vez de que sem o seu apoio, orações e conselhos sábios, esse caminho não teria tido os flashes de luz que iluminavam cada dia. Agradeço por me ensinar que se eu for como uma formiga e trabalhar forte e com dedicação, os sonhos nunca irão ser impossíveis de atingir. Obrigada por sempre estar disponíveis para mim e me ajudar em todos os aspectos da minha vida. Eu amo vocês e sempre estarão no meu coração!

Agradeço ao meu amor, **Johan Cortés Ospina**, ao teu lado encontrei o que significa o verdadeiro amor, não tenho palavras para agradecer a felicidade que você trouxe para a minha vida. Agora entendo o significado de poder dizer que encontrei alguém com quem posso vivenciar o que a Bíblia diz sobre o amor: o amor é paciente, gentil, não se comporta de maneira grosseira, não é egoísta, não se irrita com facilidade, não guarda rancor, desculpa tudo, acredita em tudo, espera tudo, apoia tudo. Agradeço por lutar ao meu lado e me apoiar em todos os meus sonhos. Amo e admiro você porque sempre consegue olhar o melhor de mim.

Agradeço aos meus irmãos, **Silvia Mercedes Ramírez** e **Héctor Deivy Ramírez**, por acompanhar aos meus pais enquanto eu estava fora do país e por me ensinar que ainda nos momentos mais difíceis temos que continuar lutando e não desistir.

Finalmente, agradeço à minha linda avó, **Mercedes García**, infelizmente você foi para o céu e não pode estar comigo fisicamente para compartilhar destes momentos, mas eu sempre sinto a tua companhia. Obrigada por cuidar de mim desde que eu cheguei ao mundo, obrigada por deixar os traços que você deixou em meu coração para nunca esquecer o verdadeiro valor das pessoas. Daqui, na terra, olho para o céu e agradeço por me ensinar tanto, este triunfo também é teu.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito**, por ter me recebido como orientada e pelo apoio prestado para alcançar e concluir o projeto de pesquisa. Agradeço o fato de trazer ensinamentos para minha vida como profissional e como pessoa.

A minha co-orientadora, **Profa. Dra. Cristina Cunha Villar**, por seu apoio durante a realização do projeto, agradeço sua dedicação e vontade de me ensinar e inspirar minha carreira profissional.

À **Latin American Oral Health Association (LAOHA)** pela oportunidade de formar parte dessa maravilhosa iniciativa e pela bolsa que eu recebi, obrigada por colaborar para tornar realidade o sonho de concluir um doutorado e de levar conhecimento e novas estratégias de pesquisa ao meu país. Agradeço aos Diretores, **Bernal Stewart** e **Zilson Malheiros**, pelo apoio e parceria ao longo deste processo.

Aos Professores que fizeram parte da importante e valiosa aquisição de conhecimento durante minha formação, **Prof. Dr. João Batista César Neto**, **Prof. Assoc. Cláudio Mendes Pannuti**, **Profa. Dra. Marinella Houlzhausen Caldeira**, **Profa. Dra. Luciana Saraiva**, **Prof. Dr. Giorgio de Micheli**, **Prof. Dr. Luis Antonio Pugliesi Alves de Lima**, **Prof. Dr. Marco Antonio Paupério Georgetti**, **Profa. Dra. Marina Clemente Conde**, **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, **Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes** e **Profa. Dra. Mariana Minatel Braga**, muito obrigada por trabalhar para formar profissionais com excelentes capacidades e senso crítico para contribuir no ramo de Odontologia.

Aos colegas do Departamento, Laís Nakao, Carlos Rubio, Daniela Yoshida, Biannka Cardoso, Ligia Ustulin, Tomaz Alves, Catarina Rocha, Marcelo Fonseca, Thiago Reina, Bill Okuma, Herbert Soares, Letícia Gasparoni, Manuela Rocha, Ananda Fini, Mariane Sloniak, Carlos Benítez, Amália Cataruci e Natali Shimabukuro por compartilhar seus conhecimentos e experiências durante minha formação.

Aos meus amigos que tive a sorte de conhecer quando fiz disciplinas em outros departamentos, Letícia Arima, Renata Marques, João Pedro, Mariana Lopes e Carla Caleffi, agradeço cada momento, conselho e todo o apoio que recebi nas diferentes etapas deste aprendizado.

Aos colegas da LAOHA, pela amizade e companhia, pela oportunidade de aprender com cada um de vocês, todos são pessoas que admiro e realmente desejo o melhor para cada um, Carlos Manuel Rubio, Willie Bustillos, Gerson Langa, Belén Retamal-Valdés, Carlos Guillermo Benítez, Mariana Linhares, Mariana Lopes, Jonathan Meza, Mohamed Hassan, Catharina Marques, Flavia Levy, Violeta Contreras, Viviana Ávila e Rubiel Marín.

Aos funcionários, secretárias do Departamento e da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP, que me deram seu apoio e colaboração quando necessário.

Agradeço o acolhimento da Faculdade de Odontologia e da Universidade de São Paulo, porque, agora, são uma parte importante e inesquecível da minha carreira profissional.

Agradeço à Pontifícia Universidad Javeriana, aos **Profs. Drs. Maria Beatriz Ferro, Juan Jaime Serrano e Ricardo Dueñas**, pela sua confiança, apoio e colaboração para incentivar minhas aspirações profissionais. Vocês são e sempre serão uma fonte de inspiração para minha vida como profissionais e seres humanos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Ramírez Lemus GM. Efeito de um creme dental contendo ácido oleanólico na redução da gengivite - um ensaio clínico randomizado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de um creme dental contendo ácido oleanólico (AO) na redução da inflamação gengival. Este ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado incluiu 99 indivíduos com gengivite moderada. Após um período de *washout* de 1 semana, os indivíduos foram randomizados em três grupos: i) grupo AO (creme dental com flúor contendo 0,1% AO e enxaguatório bucal com placebo); ii) controle negativo (creme dental com flúor e enxaguatório bucal com placebo); e iii) grupo CHX (creme dental com flúor e enxaguatório bucal com clorexidina ao 0,12%). Os indivíduos foram avaliados clinicamente na inclusão, *baseline* e após 4 dias, 1 semana e 2 semanas de uso duas vezes ao dia dos produtos alocados. Os indivíduos receberam um diário para documentação dos eventos de sangramento durante a escovação e foi coletada uma amostra de saliva não estimulada. Após duas semanas de uso do produto, todos os grupos apresentaram reduções no índice gengival (IG), IG interproximal, índice de severidade gengival (ISG), índice de placa (IP) e IP interproximal. Após duas semanas de uso do produto, todos os grupos apresentaram reduções significativas em todos os parâmetros clínicos avaliados. Não houve diferenças estatisticamente significantes nos valores do ISG entre os grupos no *baseline* e nas visitas de 1 e 2 semanas ($p > 0,05$). Em relação ao IP, não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento no *baseline* ($p=0,453$), no entanto, os pacientes do grupo CHX apresentaram escores estatisticamente mais baixos em relação aos grupos controle negativo e AO no dia 4, 1 semana e 2 semanas ($p < 0,05$). Os níveis de transferrina não mostraram diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Nos eventos de sangramento auto-relatados, apenas o grupo AO apresentou uma redução significativa. A frequência de efeitos adversos foi semelhante entre os grupos. Conclusão: Um creme dental contendo OA mostrou eficácia na redução da placa bacteriana e gengivite, obtendo escores gengivais semelhantes ao CHX, embora com menor efeito antibiofilme.

Palavras-chave: Ácido oleanólico. Gengivite. Creme dental. Placa dental. Clorexidina.

ABSTRACT

Ramírez Lemus GM. Effect of a toothpaste containing oleanolic acid in reducing gingivitis- a randomized clinical trial [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

The aim of this study was to assess the efficacy of an oleanolic acid (OA) containing toothpaste in reducing gingival inflammation in patients with gingivitis. Methods: This double blind, controlled, randomized clinical trial included 99 subjects with moderate gingivitis. Following a 1-week washout, subjects were randomized into three groups: i) OA group (fluoride toothpaste containing 0.1% OA and placebo mouthwash); ii) negative control (fluoride toothpaste and placebo mouthwash); and iii) CHX group (fluoride toothpaste and 0.12% chlorhexidine (CHX) mouthwash). Subjects were clinically assessed at inclusion, baseline, and after 4 days, 1 week and 2 weeks of twice daily use of the allocated products. Subjects received a diary for documentation of bleeding events during brushing and an unstimulated saliva sample was collected. Data was analyzed by t-test, ANOVA and Kruskal-Wallis tests. Results: After two weeks of product use, all groups showed reductions in gingival index (GI), interproximal GI, gingival severity index (GSI), plaque index (PI) and interproximal PI. After two weeks of product use, all groups showed significant reductions in all evaluated clinical parameters. There were no statistically significant differences in GSI values among the groups at baseline, and at the 1- and 2-week visits ($p > 0.05$). Regarding PI, there were no significant differences between the treatment groups in the baseline ($p = 0.453$), however, patients in the CHX group showed statistically lower scores in relation to the negative control and AO groups at day-4, 1-week and 2-weeks ($p < 0.05$). Transferrin levels did not show significant differences between the groups ($p > 0.05$). In self-reported bleeding events only the AO group presented a significant reduction. Frequency of adverse events was similar between the groups. Conclusion: An OA containing toothpaste showed efficacy in reducing plaque and gingivitis, obtaining gingival scores similar to CHX, albeit its lower antibiofilm effect.

Keywords: Oleanolic acid. Gingivitis. Toothpaste. Dental plaque. Chlorhexidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Cronograma de visita dos pacientes.....	40
Figura 5.1 - Fluxograma demonstrativo do desenho do estudo.....	42
Figura 5.2 - Comparação da média do índice gengival entre os grupos experimentais	44
Figura 5.3 - Comparação da média do índice gengival interproximal entre os grupos experimentais.....	45
Figura 5.4 - Comparação da média do índice de severidade gengival entre os grupos experimentais.....	46
Figura 5.5 - Comparação da média da porcentagem de sangramento auto-relatado em eventos de escovação entre os grupos	48
Figura 5.6 - Comparação da média do índice de placa entre os grupos experimentais	49
Figura 5.7 - Comparação da média do índice de placa interproximal entre os grupos experimentais.....	50
Figura 5.8 - Comparação dos níveis médios de transferrina salivar entre os grupos experimentais no período experimental	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAO	Acetato de ácido oleanólico
AO	Ácido oleanólico
CHX	Clorexidina
CPITN	Community Periodontal Index of Treatment Needs
DP	Desvio Padrão
EA	Efeitos Adversos
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-6	Interleucina 6
IG	Índice gengival
IP	Índice de placa
ISG	Índice de severidade gengival
LPS	Lipopolissacarídeos
MW	Molecular Weight
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells
NHANES III	National Health and Nutrition Examination Survey
PPM	Partes por milhão
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≥	Maior ou igual
>	Maior
mm	Milímetros
ml	Mililitros
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
g	Força centrífuga relativa
mg/dl	Miligramas por decilitro
α	Alfa

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Gengivite	22
2.2	Epidemiologia da gengivite	23
2.3	Controle químico no tratamento da gengivite.....	25
2.4	Propriedades do ácido oleanólico	26
3	PROPOSIÇÃO	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Desenho do estudo	32
4.2	População do estudo	32
4.3	Avaliações clínicas e laboratoriais	34
4.3.1	Clínicas	34
4.3.1.1	<i>Avaliação de Tecidos Moles e Duros</i>	34
4.3.1.2	<i>Índice Gengival</i>	35
4.3.1.3	<i>Índice de Severidade Gengival</i>	35
4.3.1.4	<i>Diário de Sangramento</i>	35
4.3.1.5	<i>Avaliação de Placa Bacteriana</i>	36
4.3.2	Laboratoriais	36
4.3.2.1	<i>Coleta de Saliva</i>	36
4.3.2.2	<i>Determinação da contaminação sanguínea na saliva</i>	37
4.4	Perspectiva geral do estudo	37
4.5	Análise Estadística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Dados demográficos	42
5.2	Índice Gengival	43
5.3	Índice Gengival Interproximal	44
5.4	Índice de Severidade Gengival	45
5.5	Eventos de sangramento auto-relatados durante a escovação dos dentes.....	47
5.6	Índice de Placa Bacteriana	48
5.7	Índice de Placa Interproximal	49
5.8	Transferrina Salivar	50
5.9	Segurança	51
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

A gengivite é definida como uma reação inflamatória inespecífica ao acúmulo de biofilme na margem gengival, sem destruição subjacente do aparelho de inserção (Lang; Bartold, 2018; American Academy of Periodontology; 2000). A prevalência de gengivite é alta em todas as idades. De acordo com dados epidemiológicos, a gengivite afeta até 99% da população mundial (Li et al., 2010; Sheiham; Netuveli, 2002; Corbet et al., 2002; Carvajal et al., 2016; Murillo et al., 2018).

Embora nem todos os pacientes com gengivite evoluam para periodontite, o tratamento da gengivite é uma estratégia de prevenção primária para periodontite e uma estratégia de prevenção secundária para periodontite recorrente (Chapple et al., 2015; Tonetti et al., 2015). Além disso, estudos longitudinais demonstraram que a gengivite persistente representa um fator de risco para perda dentária (Lang et al., 2009). Dado o possível impacto a longo prazo da gengivite no risco de periodontite e perda dentária e sua alta prevalência mundial, devem ser feitos esforços para garantir que a gengivite seja adequadamente prevenida e tratada (Lang et al., 2009; Chapple et al., 2015).

A gengivite pode ser tratada e evitada com sucesso pelo controle regular do biofilme supragengival (Arweiler et al., 2018). Espera-se que o controle mecânico diário auto-realizado tenha um papel essencial na redução do biofilme supragengival e da gengivite, no entanto, requer cooperação e motivação do paciente. Entretanto, mesmo nas condições consideradas ideais, uma única escovação manual diária remove apenas 42% do biofilme (Chapple et al., 2015). Para superar essas limitações, o uso adjuvante do controle químico da placa bacteriana foi proposto como estratégia para melhorar o controle supragengival do biofilme e da gengivite, especialmente em indivíduos não capazes de controlar eficazmente o biofilme exclusivamente por meios mecânicos.

Existem evidências da eficácia de diferentes formulações químicas para o manejo do biofilme dentário e da inflamação gengival (Serrano et al., 2015; Figuero et al., 2019). Um número significativo de agentes químicos utilizados no controle do biofilme apresentam eficiência na inibição do crescimento e metabolismo bacteriano *in vitro*. No entanto, sua eficácia clínica é frequentemente limitada por sua curta substantividade, formação de

complexos com outros ingredientes, desnaturaçãõ do ingrediente ativo, competiçãõ por sítios de ligaçãõ, sensibilidade ao pH e/ou efeitos colaterais indesejáveis (Marsh, 1991; Sheen et al., 2001). Conseqüentemente, a busca por novas formulações químicas antiplaca para o tratamento da gengivite continua.

O ácido oleanólico (AO) é um composto triterpenóide pentacíclico comum encontrado naturalmente em diferentes fontes de plantas. Nos últimos 20 anos, uma quantidade significativa de pesquisas concentrou-se em modificações químicas do ácido oleanólico para torná-lo mais eficaz, resultando em centenas de análogos com ampla gama de atividades biológicas incluindo: anti-oxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anti-angiogênicas e imunomoduladoras (Žibera et al., 2017). Com base em suas propriedades, é razoável supor que os cremes dentais contendo AO possam melhorar o controle do biofilme supragengival e da gengivite (Ayeleso et al., 2017).

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 Gengivite

A gengivite induzida por placa bacteriana é uma resposta inflamatória dos tecidos gengivais resultante do acúmulo de microorganismos localizada na e abaixo da margem gengival. A composição bacteriana do biofilme subgengival associado às doenças periodontais resulta de interações dinâmicas com o seu microambiente. O início ocorre pela falta de remoção ou interrupção do biofilme, devido a uma perda de simbiose entre o biofilme e a resposta inflamatória imunológica pelo hospedeiro e o desenvolvimento de uma disbiose incipiente (Murakami et al., 2018). O estado de disbiose pode resultar no crescimento excessivo de componentes mais virulentos do biofilme levando conseqüentemente a uma exacerbação de inflamação periodontal (Lang; Bartold, 2018). A gengivite geralmente é indolor e frequentemente caracterizada por alterações clínicas sutis, onde na maioria dos pacientes desconhecem a doença ou é incapaz de reconhecê-la (Trombelli et al., 2018). As características universais da gengivite incluem: sinais e sintomas clínicos de inflamação confinados à gengiva livre e inserida, reversibilidade da inflamação interrompendo / removendo o biofilme; a presença de uma alta carga de biofilme para iniciar e / ou exacerbar a gravidade da lesão (varia entre os indivíduos); níveis de inserção estáveis em um periodonto, que pode ou não ter sofrido uma perda de inserção ou de osso alveolar (Murakami et al., 2018).

Outro aspecto muito importante é o particular significado clínico da gengivite ao ser considerada precursora da periodontite. A evidência que suporta essa relação vem de estudos longitudinais, nos quais tanto o desenvolvimento quanto a progressão da perda de inserção estiveram associados a maiores níveis basais de inflamação gengival (Clerehugh et al., 1995; Albandar et al., 1998; Ramseier et al., 2017). Entretanto é importante entender que embora a gengivite e a periodontite sejam consideradas a continuação do mesmo processo inflamatório, nem todos os casos de gengivite evoluem para periodontite. Entretanto, é claro que a periodontite começa como gengivite e,

embora seja difícil determinar os processos biológicos envolvidos na progressão para a periodontite, alguns fatores de susceptibilidade, provavelmente incluídos abrangem disbiose microbiana, crescimento excessivo de bactérias patogênicas, reativação do herpesvirus, alteração do sistema imunológico e suscetibilidade genética e/ou adquirida entre outros (Botero et al., 2015).

Concluindo-se que o controle do biofilme e o controle da gengivite são essenciais para impedir a progressão da doença, a perda de inserção e, finalmente, a perda do dente.

2.2 Epidemiologia da gengivite

Devido a alta prevalência da gengivite na população do mundo é importante observar os resultados dos dados disponíveis nos diferentes continentes. Começando com a prevalência de gengivite na Europa, pode-se concluir que, de acordo com diferentes estudos em vários países, a inflamação gengival leve (inflamação na área da gengiva livre) é comum e a maioria dos adultos apresenta uma perda de inserção periodontal leve a moderada em alguns locais de alguns dentes (Sheiham; Netuveli, 2002).

No continente africano, os dados obtidos sobre doenças periodontais indicam que as condições de higiene bucal são precárias e a presença de gengivite é comum e pronunciada. Os dados obtidos no Índice de Necessidade de Tratamento Periodontal Comunitário (CPITN) indicam condições de higiene bucal muito precárias, com alta ocorrência de bolsas rasas (Baelum; Scheutz, 2002).

Em relação às condições periodontais em países de baixa e média renda da Ásia e Oceania, foi encontrada uma alta porcentagem de cálculo e sangramento gengival de acordo com o índice CPITN. Nos países de renda média e alta, a porcentagem de indivíduos com gengivite e cálculo foi semelhante novamente quando comparados os dois grupos de países (Corbet et al., 2002).

No continente Americano encontramos que na América do Norte, levando em consideração a análise baseada da III Terceira Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição

nos Estados Unidos (NHANES III) no final dos anos 90, onde o status gengival foi classificado como gengivite extensa ou limitada, metade das pessoas foi diagnosticada com sangramento gengival em um ou mais sítios. Em relação à classificação por extensão da inflamação gengival, 32% dos adultos examinados apresentaram gengivite extensa ou limitada, concluindo que o sangramento gengival é comum na população dos Estados Unidos (Albanar; Kingman, 1999). Já um estudo mais recente em uma população adulta representativa dos Estados Unidos (Loma Linda, Seattle e Boston), usando o índice gengival de Loe-Silness de 1963, encontrou-se uma média geral de 1.055, sendo que apenas 6,1% dos indivíduos apresentaram IG médio $<0,50$; a maioria (93,9%) foi $\geq 0,50$, e mais da metade (55,7%) sendo $\geq 1,00$ (Li et al., 2010).

Na América do Sul tem-se encontrado que 34,7% da população de jovens latino-americanos apresentam gengivite, com a maior prevalência encontrada na Colômbia (77%) e Bolívia (73%) e a menor prevalência no México (23%). Os indicadores de risco mais comuns para gengivite na América Latina têm sido relatados como falta de higiene bucal e o baixo nível socioeconômico (Carvajal et al., 2020). Já na população de adultos, foi publicado um artigo avaliando a prevalência e severidade da inflamação gengival e indicadores de risco associados em 3 países: Brasil, Argentina e Chile. Um total de 95,6% dos adultos apresentou inflamação gengival; quanto à gravidade, 22,5% dos participantes apresentaram inflamação gengival leve, 74% moderada e 3,6% grave (Carvajal et al., 2016). O mesmo desenho de estudo realizado no México, Costa Rica e Colômbia mostrou que a prevalência de gengivite foi de 99,6%. Quanto à gravidade, a inflamação gengival moderada foi a forma predominante (84,1%), sem diferenças estatisticamente significantes entre as cidades ou o gênero (Murillo et al., 2018).

Devido à alta prevalência reportada na literatura nos diferentes continentes do mundo, devem se implementar estratégias para prevenir, controlar e tratar adequadamente a gengivite.

2.3 Controle químico no tratamento da gengivite

A prevalência, quase onipresente, de gengivite pode levar à crença de que o controle mecânico dos biofilmes periodontais não é eficiente. Muitos indivíduos acham difícil ou até impossível atingir o nível exato de remoção de biofilme necessário. Dentro dos diversos motivos para esse incumprimento estão a cultura, nível de educação, situação financeira, idade, entre outros. A ocorrência generalizada desta doença e essa dificuldade em ter um controle ideal do biofilme fornece uma justificativa para suplementar o uso de cremes dentais com agentes anti-gengivite que possam aumentar a remoção mecânica do biofilme (Archila et al., 2004).

Apesar de conhecer a necessidade de controle do biofilme na prevenção de doenças periodontais, a realidade é que a maioria dos indivíduos não realiza um controle adequado. Outra limitação importante do controle mecânico é que esse método é eficaz apenas nas superfícies duras da cavidade oral, e já foi demonstrado que os microrganismos envolvidos na etiologia das doenças periodontais podem se alojar nas superfícies de tecidos moles da boca, contribuindo à colonização de superfícies dentárias. Os agentes químicos antiplaca, presentes em vários produtos de higiene oral, podem atingir essas superfícies de tecidos moles e, assim, melhorar o controle do crescimento de biofilme e atrasar o acúmulo microbiano nos dentes (Teles; Teles, 2009).

Os cremes dentais podem ser definidos como preparações de uso comum que são utilizadas em conjunto com a escovação com o objetivo de limpar os dentes, transportando produtos químicos que podem ter um efeito terapêutico com o objetivo de ajudar no controle do biofilme e a gengivite. Os cremes dentais contêm diferentes ingredientes tais como: agentes ativos, partículas abrasivas, detergentes, umectantes e aromatizantes, da mesma forma, aglutinantes, água e conservantes podem estar presentes (Sheen et al., 2001). Hoje em dia, os cremes dentais têm objetivos cosméticos e terapêuticos, ajudam a limpar a superfície do dente durante a escovação e proporcionam hálito fresco, além de um efeito terapêutico principalmente através de seus efeitos anticárie, anti-halitose, antiplaca ou anti-inflamatório. Portanto, o uso adjuvante de cremes dentais pode aumentar a eficácia da escovação, uma vez que somente a ação

mecânica reduzirá a quantidade de biofilme e interromperá sua estrutura, facilitando o mecanismo de ação farmacológico da formulação do creme dental (Sanz et al. 2013).

Conceitualmente, os agentes antiplaca poderiam ser usados para: a) interferir na adesão de bactérias orais às superfícies e impedir a formação do biofilme; b) interferir nos mecanismos de coagregação ou afetar a vitalidade bacteriana e assim prevenir o crescimento adicional de colônias; c) remover ou interromper os biofilmes existentes ou d) alterar a composição e/ou patogenicidade do biofilme (Baehni; Takeuchi, 2003; Sanz et al., 2013). Os agentes antiplaca, por conseguinte, apresentam benefícios claros, como redução no acúmulo de nova placa, redução ou remoção da placa existente, supressão do crescimento da microflora patogênica ou inibição da produção de fatores de virulência. No entanto, é relevante entender que os agentes químicos de controle do biofilme atuam como uma terapia adjuvante ao controle mecânico convencional do biofilme que é a base para a prevenção de doenças bucais. Do mesmo modo, a questão da saúde pública é outro aspecto importante da situação. De fato, como a escovação é a medida de higiene bucal mais comum, o uso de agentes químicos em cremes dentais pode ser uma maneira muito eficaz de atingir populações inteiras. Uma redução na prevalência de gengivite entre a população através de medidas de higiene bucal melhoradas teria um grande impacto nas despesas com cuidados periodontais. Portanto, é essencial que os profissionais conheçam o efeito desses agentes para que sejam adequadamente formulados acorde com as características de cada paciente, e assim, prevenir doenças dentárias induzidas por placa (Baehni; Takeuchi, 2003; Jafer et al., 2016).

2.4 Propriedades do ácido oleanólico

O ácido oleanólico (AO) é um produto natural que tem sido isolado de várias plantas alimentícias e medicinais, principalmente no azeite de oliva. AO é um composto tri-terpenóide que desempenha um papel na defesa contra patógenos vegetais. Portanto, espera-se que o AO possua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos (Ayeleso et al., 2017). Suas propriedades são diversas, além de seu

conhecido papel hepatoprotetor, outras atividades biológicas que têm sido descritas incluem efeitos anticâncer, anti-osteoporose, anti-obesidade, anti-diabético, anti-inflamatório e imunorregulador, entre outros (Lin et al., 2016). Sua atividade antioxidante também é interessante, uma vez que o estresse oxidativo é conhecido por estar envolvido na patogênese de várias doenças crônicas (incluindo periodontite) e, portanto, a terapia antioxidante é uma estratégia promissora para o manejo e tratamento dessas doenças (Ayeleso et al., 2017).

O AO e seus derivados foram estudados por possuírem usos terapêuticos potenciais em várias doenças como osteoporose, diabetes, obesidade, doenças de pele, depressão, doença de Alzheimer, doença cardiovascular, doença renal crônica, hepatite, colestase, hiperlipemia e tumores (Lin et al., 2016). Nos últimos anos, inúmeras investigações têm o objetivo de fazer modificações químicas do AO para torná-lo mais eficaz e/ou desenvolver derivados solúveis em água, o que resultou em centenas de novos compostos com várias atividades biológicas (Žibera et al., 2017).

Na área odontológica a evidência disponível ainda é escassa. Um estudo avaliou a atividade antibacteriana de ácidos triterpênicos, ácido oleanólico (AO) e ácido ursólico (AU) e derivados semi-sintéticos contra patógenos orais *in vitro*, especificamente contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados concluíram que todos os compostos isolados, misturas e derivados semi-sintéticos apresentaram atividade contra todas as bactérias testadas, mostrando que os agentes antiplaca e anticárie podem ser promissores, no entanto, neste estudo, o efeito desses dois compostos na formação do biofilme bacteriano não foi avaliado (Scalon et al., 2007). Por esse motivo, em 2013, outros autores decidiram também avaliar o papel do AO e AU *in vitro*, inibindo microrganismos cariogênicos, bem como o biofilme. Nesse estudo, observou-se que ambos os compostos apresentaram atividade antibacteriana contra quatro *Streptococcus spp.* e dois *Actinomyces spp.*, sugerindo que AO e AU têm potencial para serem utilizados como agentes antibacterianos para prevenir a cárie dentária.

Em relação à doença periodontal, apenas um estudo de 2019 avaliou o papel do ácido oleanólico nesta área. Este estudo foi desenhado para avaliar o efeito de um novo composto, acetato de ácido oleanólico (AAO), com administração local, na cicatrização e

melhoria da qualidade da formação óssea na região do alvéolo e ao redor dele, após induzir periodontite (modelo induzido por ligadura em camundongos). O AAO é um derivado do ácido oleanólico, seus efeitos anti-inflamatórios são modulados pela inibição da hiperpermeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão celular (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectinas) e adesão e migração de monócitos e neutrófilos. A expressão diminuída das moléculas de adesão celular impede a adesão dos leucócitos às células endoteliais e depois regula o extravasamento nos tecidos adjacentes. Além disso, a manutenção da integridade da barreira vascular impede a migração transendotelial excessiva de neutrófilos, resultando na secreção de proteases, metabólitos tóxicos e citocinas. Todos esses processos facilitam a inflamação que pode danificar os tecidos inflamados. Portanto, a regulação da migração transendotelial de leucócitos é muito importante para o controle de danos nos tecidos inflamatórios, por exemplo, perda óssea inflamatória. Neste estudo, foi observado um aumento na localização das fibras de colágeno no alvéolo e nas regiões do processo ósseo alveolar das amostras tratadas com AAO. Da mesma forma, foi observado um aumento nos tecidos recém mineralizados nas amostras tratadas com AAO, uma diminuição na atividade da IL-6 após 1 semana de tratamento, sugerindo um papel anti-inflamatório. Os níveis de osteocalcina foram mais altos nas amostras tratadas com AAO, sugerindo que este pode facilitar a diferenciação dos osteoblastos e, assim, melhorar a formação óssea. Conclui-se neste artigo que o AAO pode ser um potencial agente terapêutico para o manejo da periodontite e melhorar o processo de nova formação óssea na área do alvéolo pós-extração. No entanto, estudos futuros relacionados à perda dentária traumática, formas leves de periodontite e administração sistêmica de AAO são necessários para o tratamento da periodontite em modelos animais (Adhikari et al., 2019).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de cremes dentais contendo ácido oleanólico na redução da inflamação gengival em pacientes com gengivite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este foi um ensaio clínico controlado randomizado, de centro único, duplo-cego, paralelo, conduzido na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. O protocolo do estudo e o formulário de consentimento foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Este estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE: 73129517.4.0000.0075 (Anexo A). O estudo foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki e atendeu aos critérios de Boas Práticas Clínicas. Os pacientes receberam informações detalhadas sobre o estudo, que estão descritas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) antes de sua inclusão como participantes da pesquisa, e assinaram este documento após a sua clara compreensão de todas as etapas da pesquisa.

4.2 População do estudo

Para este estudo, voluntários masculinos e femininos, com idades entre 18 e 65 anos deveriam ter os seguintes critérios para ser incluídos:

1. Boa saúde geral;
2. Capacidade de ler, entender e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
3. Disposição para fornecer informações relacionadas ao seu histórico médico;
4. Disposição para cumprir os procedimentos de estudo e horários de amostragem;

5. Pelo menos 20 dentes permanentes naturais sem coroa (excluindo terceiros molares);
6. Índice gengival médio $\geq 1,5$ e pelo menos 6 dentes com no mínimo um local de sangramento na sondagem marginal;

Os critérios de exclusão de participantes para este estudo foram:

1. Gravidez ou amamentação;
2. Uso de produtos de tabaco;
3. História de abuso de álcool ou drogas;
4. Diagnóstico de AIDS ou hepatite (se conhecido pelos sujeitos);
5. Condições médicas (especialmente problemas cardíacos ou hepáticos, distúrbios hemorrágicos, discrasias sanguíneas) ou qualquer uso atual de medicamentos que o investigador considere podem comprometer a segurança do paciente, bem como a qualidade dos resultados do estudo;
6. Condição médica que requer pré-medicação antes das consultas/procedimentos odontológicos;
7. História de alergia a produtos de higiene bucal usados anteriormente ou alergias conhecidas a qualquer um dos ingredientes conhecidos dos produtos do estudo;
8. Uso de antibióticos ou anti-inflamatórios, imunossupressores, antimicrobianos ou anticoagulantes ou antibióticos nos 30 dias anteriores ao início do estudo e durante o curso do estudo;
9. Uso contínuo de medicamentos conhecidos por afetar os tecidos gengivais (p.ex. bloqueadores dos canais de cálcio, fenitoína, ciclosporina);
10. Aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis;
11. Próteses parciais removíveis;
12. Tumor(es) dos tecidos moles ou duros da cavidade oral;
13. Cinco ou mais lesões de cárie que requerem tratamento restaurador imediato.
14. Mais de 2 bolsas periodontais (> 4 mm de profundidade) com sangramento à sondagem;

15. Qualquer condição gengival como hiperplasia e crescimento excessivo que causaria dificuldade na avaliação;
16. Participação em qualquer outro estudo clínico envolvendo produtos de higiene bucal no mês anterior;
17. Condição médica existente que proíbe o sujeito de não comer ou beber por períodos de até 2 horas.

O estudo abriu as inscrições em fevereiro de 2018 e as visitas finais foram concluídas em junho de 2018.

4.3 Avaliações clínicas e laboratoriais

4.3.1 Clínicas

Os índices foram avaliados por duas examinadoras experientes, treinadas e cegas (CCV, LS) em seis locais por dente (mesiovestibular, centrovestibular, distovestibular, mesolingual, centrolingual e distolingual), em um protocolo de boca toda (exceto terceiros molares) usando uma sonda periodontal (PCP-UNC 15, Hu-Friedy Manufacturing Co., Chicago, IL, U.S.A). Os parâmetros avaliados foram:

4.3.1.1 Avaliação de Tecidos Moles e Duros

A avaliação dos tecidos moles e duros orais foi realizada através de um exame visual da cavidade bucal e da área peri-oral. Foram avaliados o palato mole e duro, mucosa gengival, mucosa bucal, pregas mucogengivais, língua, área sublingual e submandibular, glândulas salivares e áreas tonsilar e faríngea. Quaisquer achados anormais observados após a visita de *baseline* foram registrados como efeitos adversos.

4.3.1.2 *Índice Gengival*

A pontuação do índice gengival de Löe & Silness (Löe, 1967) foi atribuída a todas as superfícies escoráveis. Uma pontuação média da boca inteira para cada sujeito foi determinada adicionando os valores dados pelo examinador a cada superfície avaliada e dividindo esse número pelo número total de superfícies pontuadas.

Os escores vão de 0 a 3 acorde com as seguintes características: 0- Ausência de inflamação; 1-Inflamação leve: leve mudança da cor e edema leve com pouca alteração na textura. Não sangramento na sondagem; 2- Inflamação moderada: vermelhidão, edema e hipertrofia moderados. Sangramento na sondagem; 3- Inflamação severa: vermelhidão, hipertrofia e edema acentuados. Tendência para sangramento espontâneo.

4.3.1.3 *Índice de Severidade Gengival*

Com base nos dados do IG, sem avaliação clínica separada ou adicional, é uma proporção que reflete a porcentagem de locais gengivais que sangram (classificação de 0 a 1). De acordo com os critérios de classificação, se o IG foi pontuado 0 ou 1, o ISG foi pontuado 0 (sem sangramento). Uma pontuação do IG de 2 ou 3 foi pontuada como ISG 1 (sangramento). Uma pontuação no ISG $\geq 0,5$ indicou um nível considerável de gengivite (Jose et al., 2015).

4.3.1.4 *Diário de Sangramento*

Um diário pessoal foi entregue aos sujeitos da pesquisa para permitir que relatassem sistematicamente se tinham tido ou não eventos de sangramento durante a escovação.

4.3.1.5 *Avaliação de Placa Bacteriana*

Primeiro, usando uma solução vermelha/azul para corar a placa, foi atribuída uma pontuação do índice de placa (IP) de Quigley & Hein (Quigley; Hein, 1962) pela modificação de Turesky (Turesky et al., 1970). Uma pontuação na boca inteira para cada sujeito foi determinada adicionando os valores dados pelo examinador a cada superfície pontuada e dividindo esse número pelo número total de superfícies avaliadas.

Os escores vão de 0 a 5 acorde com as seguintes características: 0- Ausência de placa; 1- Manchas separadas de placa na margem cervical; 2- Uma faixa fina e contínua de placa (até 1 mm) na margem cervical; 3- Faixa de placa mais larga que 1 mm, menor que 1/3 da superfície; 4- Placa que cobre mais de 1/3, mas menos de 2/3 da superfície; 5- Placa cobrindo 2/3 ou mais da superfície.

4.3.2 **Laboratoriais**

A quantificação de transferrina na saliva foi determinada através da coleta pré sondagem periodontal.

4.3.2.1 *Coleta de Saliva*

Os indivíduos foram submetidos à coleta de saliva pré avaliação periodontal. Em resumo, a coleta de um (1) ml de saliva não estimulada foi realizada sem nenhum estímulo mastigatório ou gustativo e foi baseada no gotejamento passivo da saliva em um copo (Sculley; Langley-Evans, 2003). Os indivíduos foram convidados a sentar-se confortavelmente em uma cadeira com os cotovelos apoiados nos joelhos e com a cabeça inclinada para a frente entre os braços, para permitir que a saliva coletada no assoalho da boca fosse drenada passivamente do lábio inferior para um copo de plástico. Movimentos da língua, bochechas ou lábios foram evitados durante a coleta. As amostras

de saliva coletadas foram armazenadas em duas alíquotas de 500 µl a -80°C até análises. No dia do teste, as amostras de saliva foram levadas à temperatura ambiente e centrifugadas a 1000g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para o teste.

Todos os sujeitos foram questionados para autorizar o armazenamento de amostras a longo prazo e na disponibilidade dessas amostras para análises futuras.

4.3.2.2 *Determinação da contaminação sanguínea na saliva*

A transferrina é uma proteína grande (76.000 MW) presente em abundância no sangue que normalmente está presente apenas em pequenas quantidades na saliva, sendo usada como um marcador substituto da contaminação sanguínea. Todas as amostras de saliva não estimulada foram testadas usando um kit de imunoenensaio enzimático que detecta quantitativamente a transferrina em amostras de saliva (Salimetrics LLC, State College, PA). O teste utiliza 20 µl de saliva, tem um limite mínimo de detecção de 0,08 mg/dl e coeficientes médios de variação intra e inter-ensaios inferiores a 7%. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a concentração de transferrina foi expressa em mg/dl.

4.4 Perspectiva geral do estudo

Os sujeitos tiveram que completar seis visitas (Figura 4.1). Na visita de triagem, os critérios de elegibilidade foram verificados e os dados demográficos, histórico médico e medicamentos concomitantes foram registrados. Todos os participantes incluídos foram designados consecutivamente a um número de randomização de acordo com a entrada cronológica no estudo. Posteriormente, os indivíduos incluídos foram à clínica odontológica após evitar qualquer procedimento de higiene bucal por doze horas e comer e beber por quatro horas (exceto água). Os sujeitos incluídos também foram instruídos a abster-se de usar fio dental durante o estudo.

Na visita *pré-washout*, os critérios de elegibilidade foram verificados novamente e os tecidos moles e duros da cavidade oral foram examinados. Amostras de saliva pré-sondagem foram coletadas. Em seguida, a inflamação gengival foi avaliada pelo índice gengival (IG), IG interproximal e ISG, também foram avaliados o índice de placa (IP) e o IP interproximal. Nesta visita, os pacientes receberam creme dental de *washout*, uma escova de dentes de cerdas macias e um diário para documentação dos eventos de sangramento durante a escovação. Os sujeitos foram instruídos a escovar usando exclusivamente os produtos fornecidos por dois minutos, duas vezes ao dia (manhã e noite) durante o período de *washout* de 1 semana.

Na visita de *baseline*, todas as amostras de estudo acima mencionadas foram coletadas e os parâmetros clínicos foram registrados, e os produtos de *washout* restantes foram devolvidos. Posteriormente, os indivíduos foram aleatoriamente designados para o grupo AO, CHX (clorexidina) ou controle negativo, usando uma lista de randomização de blocos gerada por computador (tamanho do bloco=4) distribuída por um coordenador do estudo que não estava envolvido no recrutamento ou exame dos sujeitos. Todos os indivíduos foram instruídos por um indivíduo não envolvido no exame clínico ou no registro de dados a escovar os dentes por dois minutos duas vezes ao dia (manhã e noite) e enxaguar por 30 segundos com 20 ml de enxaguatório bucal designado por um período de duas semanas.

Os indivíduos foram designados para um dos seguintes grupos e receberam os produtos incluídos em cada regime descrito a continuação:

I. Grupo AO

- Creme dental com flúor contendo ácido oleanólico ao 0,1% e Eugenol ao 0,05% em uma base de fosfato dicálcico (dical);
- Escova de dentes manual com cerdas macias (Extra Clean Soft, Colgate Palmolive, New York, USA);
- Enxaguatório bucal com placebo em uma base sem álcool.

II. Grupo controle negativo

- Creme dental com flúor disponível comercialmente em uma base dical contendo 1450 ppm de flúor (Colgate Cavity Protection, New York, USA);
- Escova de dentes manual com cerdas macias[†];
- Enxaguatório bucal com placebo em uma base sem álcool.

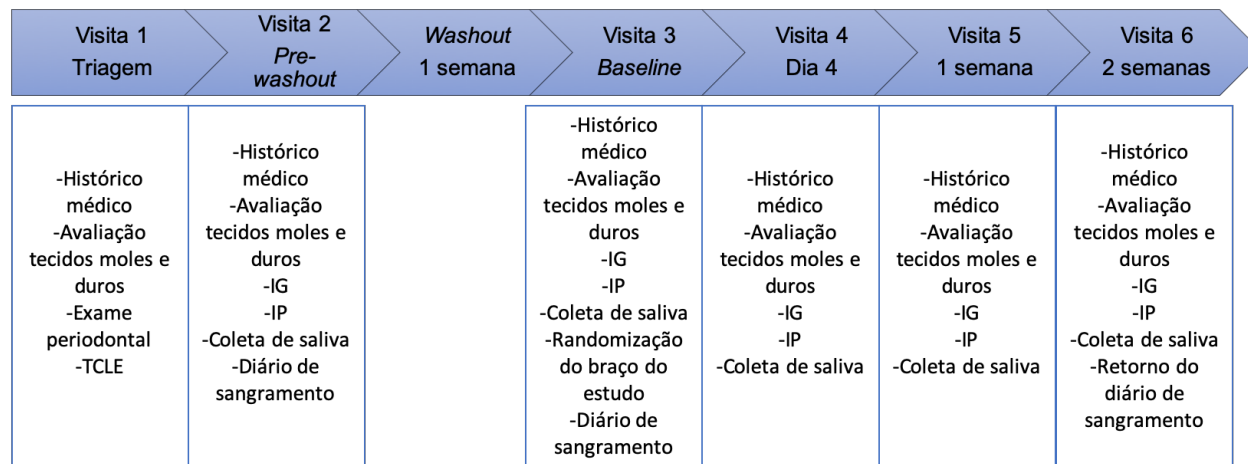
III. Grupo CHX

- Creme dental com flúor disponível comercialmente em uma base dical contendo 1450 ppm de flúor[‡];
- Escova de dentes manual com cerdas macias[†];
- Enxaguatório bucal à base de clorexidina a 0,12 % (Periogard, Colgate Palmolive, New York, USA).

Os produtos do estudo foram embalados e codificados para garantir o cegamento dos sujeitos e dos pesquisadores. Os códigos dos produtos não foram revelados até a conclusão do estudo.

Os indivíduos foram instruídos a retornar após 4 dias, 1 semana e 2 semanas de uso do produto. Em cada visita, todas as amostras de estudo acima mencionadas foram coletadas e os parâmetros clínicos foram registrados. Após 2 semanas de uso do produto, os produtos do estudo e os diários de sangramento foram devolvidos e os participantes concluíram sua participação no estudo. Efeitos adversos (EA) foram documentados ao longo do estudo.

Figura 4.1- Cronograma de visitas dos pacientes



4.5 Análise Estatística

O tamanho da amostra de 90 (30 por grupo de tratamento) foi calculado para detectar uma diferença mínima de 0,2 unidades no ISG (diferença de 10% entre os grupos de tratamento). Esse tamanho de amostra inclui uma taxa de desistência de 10%. O tamanho da amostra foi determinado com base em um desvio padrão para a medida de resposta de 0,58, um nível de significância $\alpha = 0,05$, uma taxa de atrito de 10% e um nível de poder de 80%.

Na análise do tratamento para cada produto, foi realizado um teste t pareado nas pontuações médias para testar a hipótese nula de que não há redução significativa do *baseline* para a pós-pontuação. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi empregada para análises de tratamento de dados normalmente distribuídos, seguidas pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Kruskal-Wallis com o teste de comparações múltiplas post hoc Dunn foi usado para comparar dados sem distribuição normal. As comparações foram determinadas como significantes no nível 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

276 indivíduos foram avaliados e noventa e nove (99) entraram no estudo clínico e foram randomizados em um dos três grupos de tratamento (Figura 5.1). Cinco (5) sujeitos não retornaram à clínica após atenderem aos critérios de inclusão do estudo. Sete (7) indivíduos não retornaram à clínica após a visita inicial por motivos desconhecidos. Um (1) sujeito foi excluído devido ao uso de antibióticos de amplo espectro. Um (1) sujeito foi excluído por ter encontrado um emprego e não podia assistir mais. Três (3) sujeitos perderam uma visita, um devido a um problema de saúde e dois devido ao seu trabalho. No final, 82 indivíduos completaram o estudo clínico de três semanas e seus dados foram analisados por protocolo (Figura 5.1). Um resumo do sexo e idade da população estudada é apresentado na tabela 5.1.

Figura 5.1 - Fluxograma demonstrativo do desenho do estudo

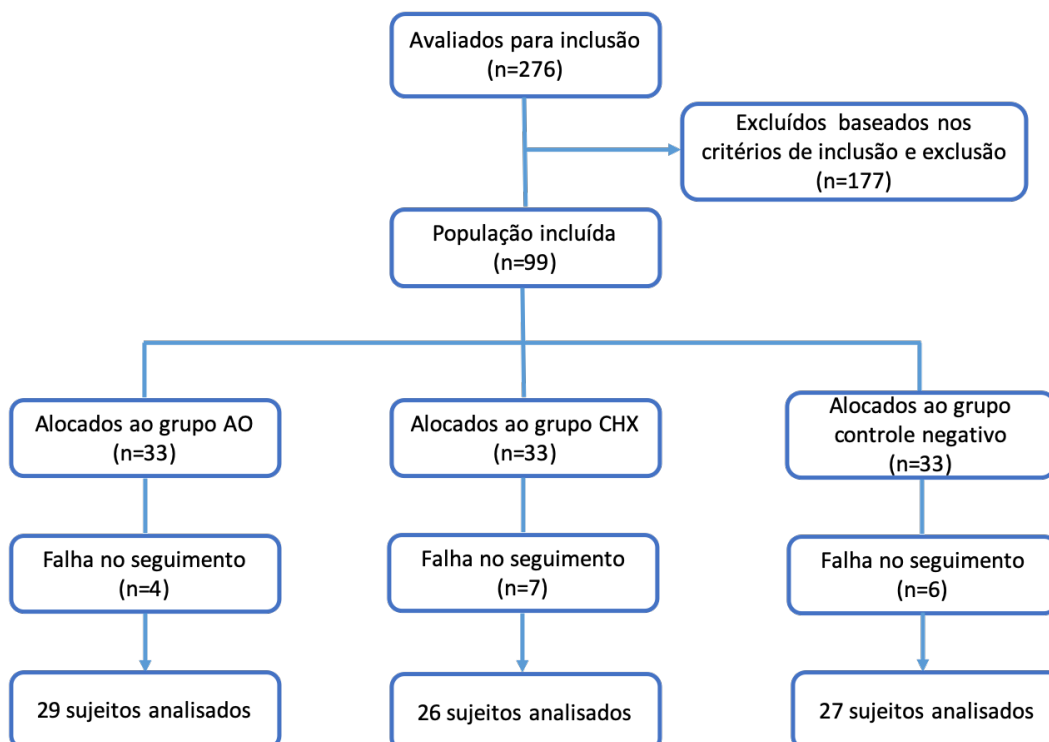


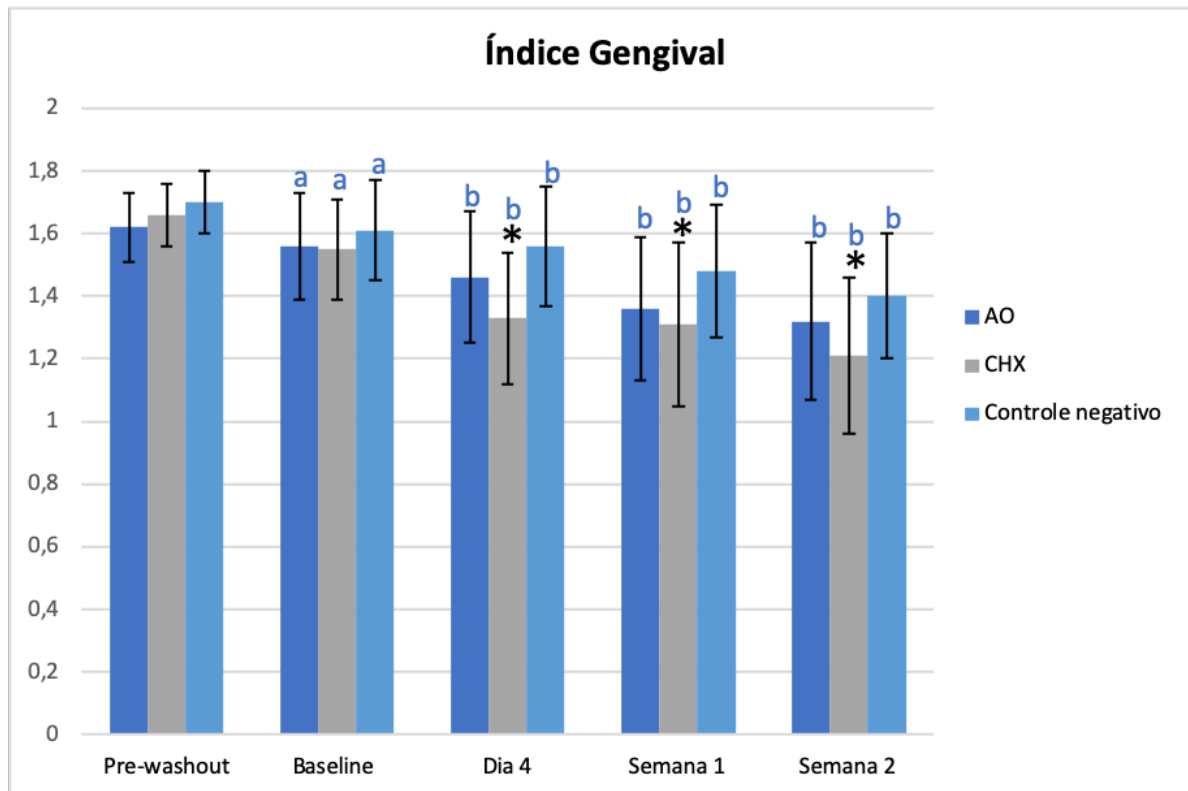
Tabela 5.1- Resumo da idade e sexo dos indivíduos que completaram o estudo clínico.

Grupos Experimentais	Idade		Gênero	
	Média ± DP	Faixa	Mulheres	Homens
AO (n=29)¹	30.62 ± 11.38	(18-61)	14(48.28%)	15 (51.72%)
CHX (n=26)²	33.08 ± 11.01	(18-59)	17 (65.38%)	9 (34.62%)
Controle Negativo (n=27)³	33.15 ± 12.52	(20-66)	14 (51.85%)	13 (48.15%)
Total (n= 82)	33.239 ± 11.57		45(54.88%)	37 (45.12%)

5.2 Índice Gengival

Todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas nos escores médios do índice gengival durante o período experimental, em comparação aos escores do *baseline* (Figura 5.2). Em relação aos indivíduos do grupo controle negativo, os indivíduos do grupo CHX exibiram escores médios gengivais estatisticamente mais baixos nas avaliações do dia 4, 1 e 2 semanas (Figura 5.2). Os indivíduos nos grupos CHX e AO exibiram escores médios similares no índice gengival ao longo do estudo (Figura 5.2). Finalmente, os indivíduos do grupo CHX tiveram uma redução delta significativamente maior no escore médio do índice gengival no dia 4, em comparação com os indivíduos nos grupos controle negativo ($p < 0,001$) e AO ($p < 0,001$). Os valores delta não diferiram entre os grupos de tratamento nas avaliações de 1 semana e 2 semanas ($p = 0,10$ e $p = 0,08$, respectivamente).

Figura 5.2 - Comparação da média do índice gengival entre os grupos experimentais



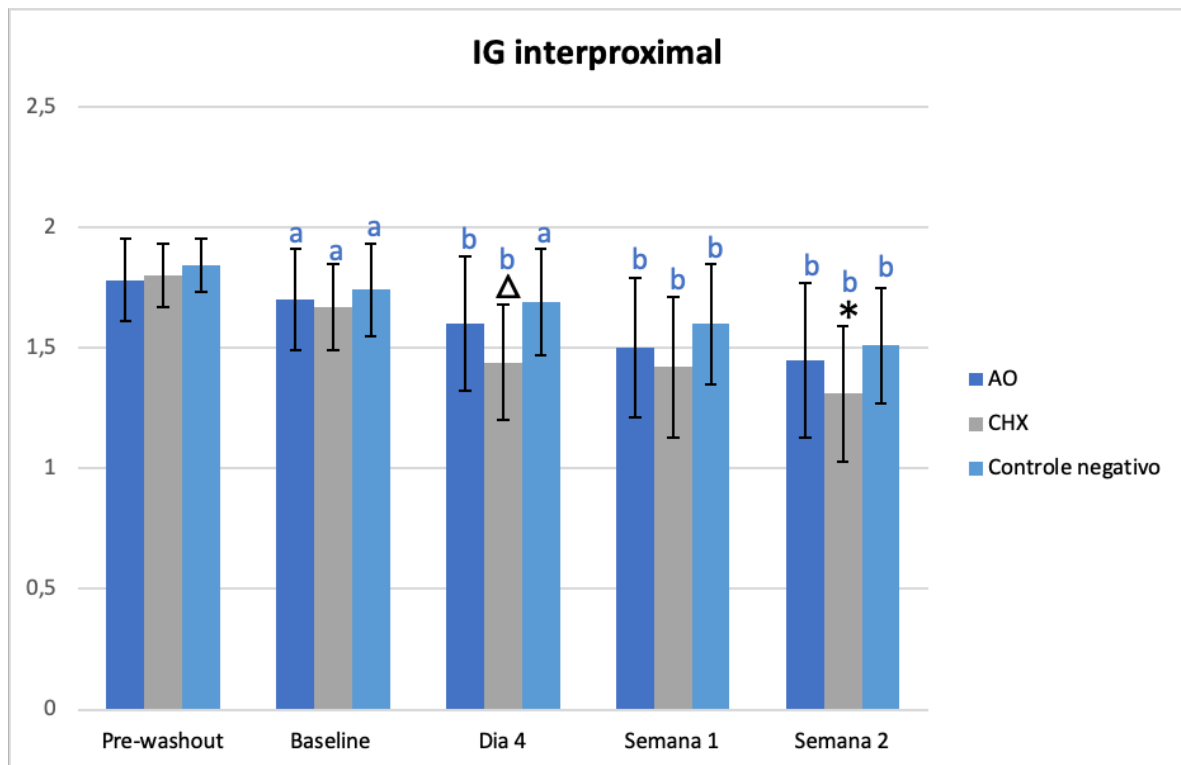
*Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey para controle negativo, usando $\alpha = 0,05$. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

5.3 Índice Gengival Interproximal

Com uma exceção, todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas nos escores médios do índice gengival interproximal durante o período experimental, em comparação com os escores do *baseline* (Figura 5.3). Em relação aos indivíduos nos grupos controle negativo e AO, os indivíduos no grupo CHX exibiram um escore médio do índice gengival interproximal significativamente menor no dia 4 (Figura 5.3). Na visita de duas semanas, os sujeitos do grupo CHX exibiram uma pontuação média do índice gengival interproximal significativamente menor do que os sujeitos do grupo controle negativo, mas não diferiram dos sujeitos do grupo AO (Figura 5.3).

Os indivíduos do grupo CHX tiveram uma redução delta significativamente maior na pontuação média do índice gengival interproximal no dia 4, em comparação com os indivíduos nos grupos controle negativo ($p < 0,001$) e AO ($p < 0,001$). Os valores delta não diferiram entre os grupos de tratamento nas avaliações de 1 e 2 semanas ($p = 0,07$ e $p = 0,06$, respectivamente).

Figura 5.3 - Comparação da média do índice gengival interproximal entre os grupos experimentais



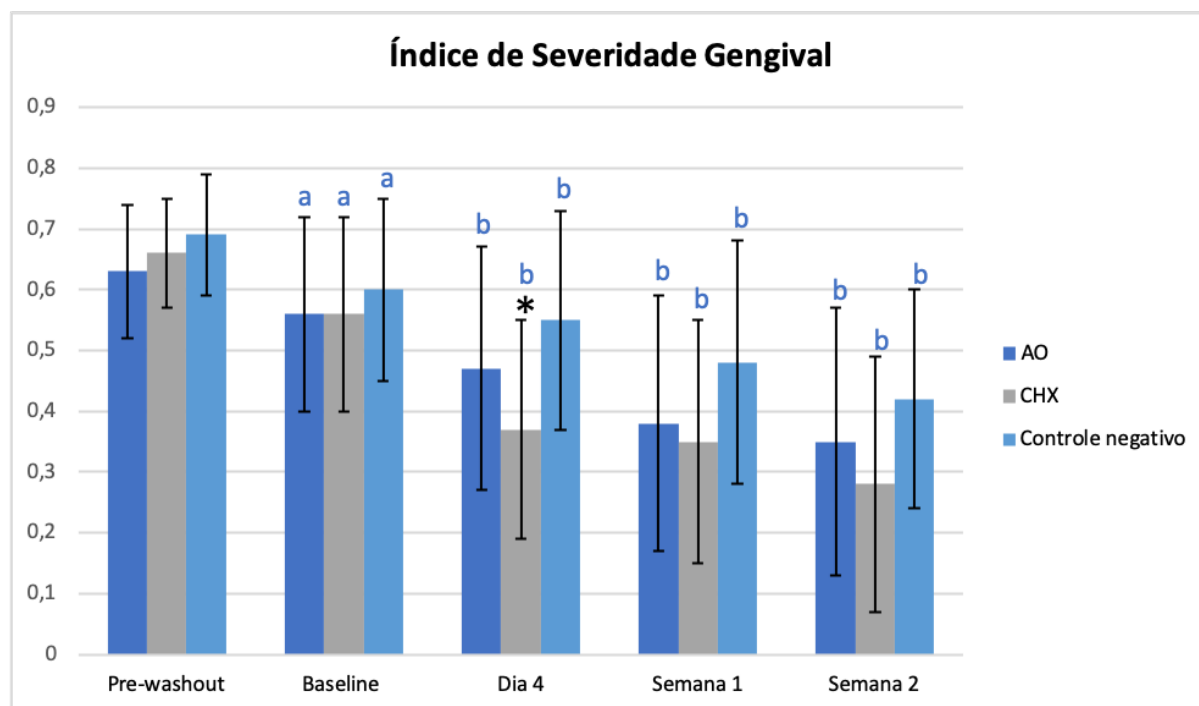
Δ Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, para os grupos controle negativo e AO, usando $\alpha = 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

5.4 Índice de Severidade Gengival

Todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas nos escores médios do índice de severidade gengival durante o período experimental, em comparação com os escores de baseline (Figura 5.4). Não foram encontradas diferenças

estatisticamente significantes entre os grupos de tratamento em relação aos escores médios do ISG medidos nas avaliações de 1 semana e 2 semanas. Em relação aos sujeitos do grupo controle negativo, os sujeitos do grupo CHX exibiram um escore médio mais baixo no ISG no dia 4, sem diferir dos sujeitos do grupo AO (Figura 5.4). Por fim, os indivíduos do grupo CHX tiveram uma redução delta significativamente maior no escore médio do índice de severidade gengival no dia 4, em comparação com os indivíduos no grupo controle negativo ($p < 0,001$) e AO ($p < 0,001$). Os valores delta não diferiram entre os grupos de tratamento nas avaliações de 1 semana e 2 semanas ($p = 0,10$ e $p = 0,08$, respectivamente).

Figura 5.4 - Comparação da média do índice de severidade gengival entre os grupos experimentais



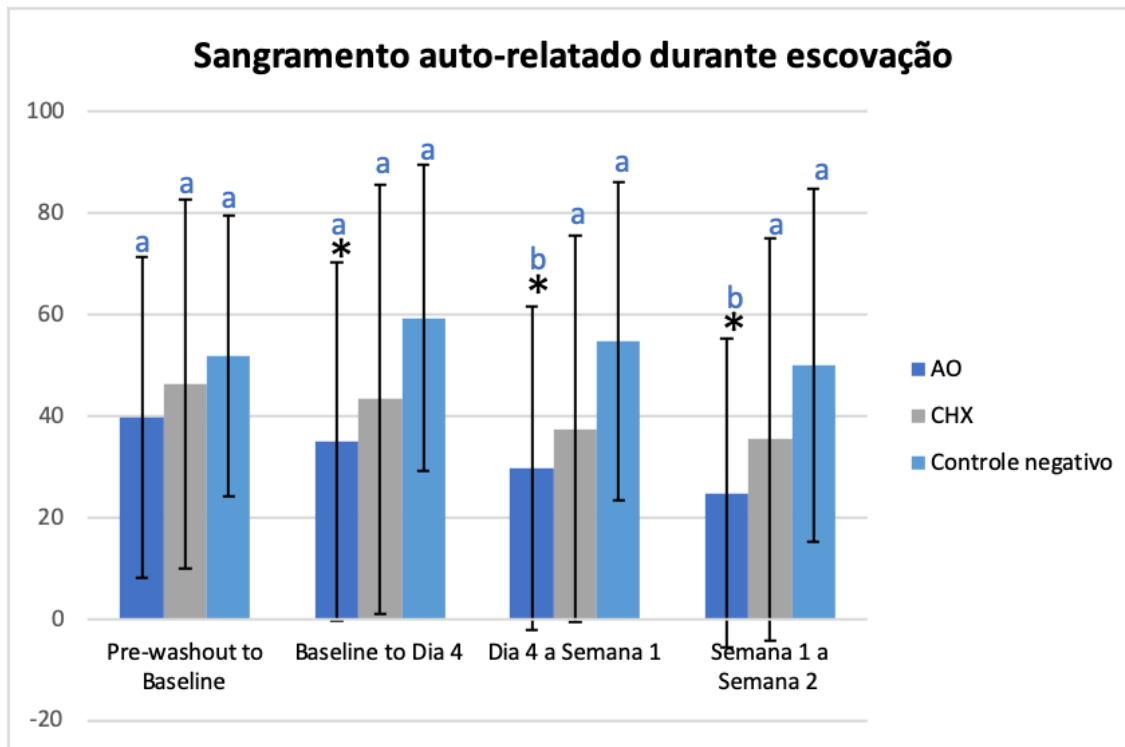
* Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey para controle negativo, usando $\alpha = 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

5.5 Eventos de sangramento auto-relatados durante a escovação dos dentes

O grupo AO promoveu uma redução significativa na porcentagem média de sangramento gengival auto-relatado à escovação nos intervalos de avaliação do dia 4 à semana 1 e semana 1 à semana 2, em comparação com a porcentagem no intervalo *pré-washout* até o período de *baseline* (período de *washout*) (Figura 5.5). Os grupos controle negativo e CHX falharam em reduzir a porcentagem média de sangramento gengival auto-relatado ao escovar (Figura 5.5).

Em relação aos indivíduos do grupo controle negativo, os indivíduos do grupo AO relataram uma porcentagem estatisticamente menor de sangramento gengival durante a escovação dos dentes no período do *baseline* até o dia 4, dia 4 à semana 1 e semana 1 à semana 2 (Figura 5.5). Finalmente, as alterações delta na porcentagem média de sangramento gengival durante a escovação não foram significativamente diferentes entre os grupos de tratamento ($p = 0,15$ no intervalo do *baseline* até o dia 4; $p = 0,10$ no intervalo do dia 4 a semana 1; $p = 0,19$ no intervalo de semana 1 a semana 2).

Figura 5.5 - Comparação da média da porcentagem de sangramento auto-relatado em eventos de escovação entre os grupos experimentais



* Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey para controle negativo, usando $\alpha = 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

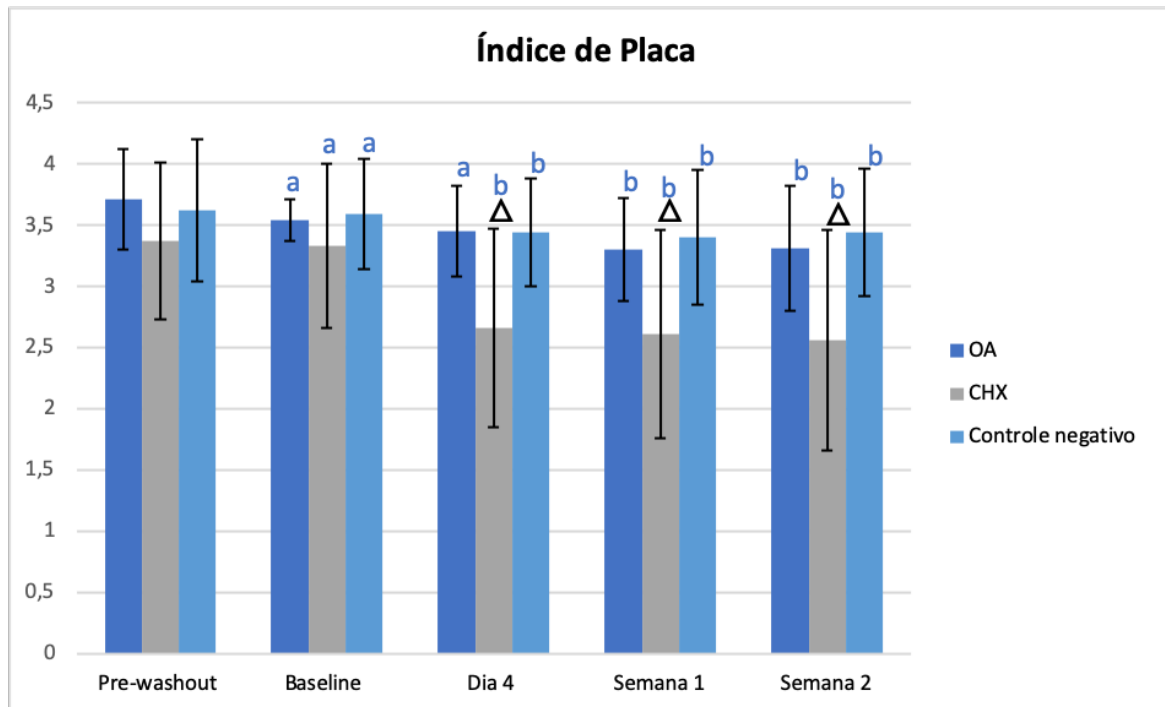
5.6 Índice de Placa Bacteriana

Com uma exceção, todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas nos escores médios do índice de placa ao longo do período experimental avaliado, em comparação com os escores do *baseline*. Os indivíduos do grupo AO falharam em diminuir a pontuação média do índice de placa na visita do dia 4 ($p = 0,082$) (Figura 5.6).

Em relação aos indivíduos nos grupos controle negativo e AO, os indivíduos no grupo CHX exibiram um escore médio estatisticamente menor no índice de placa nas avaliações nos dias 4, 1 e 2 semanas (Figura 5.6). Por fim, o grupo CHX apresentou reduções delta significativamente maiores nos escores médios do índice de placa nas

avaliações no dia 4, 1 e 2 semanas, em comparação com os grupos controle negativo e AO ($p = 0,0019$ e $p = 0,0004$, respectivamente).

Figura 5.6 - Comparação da média do índice de placa entre os grupos experimentais



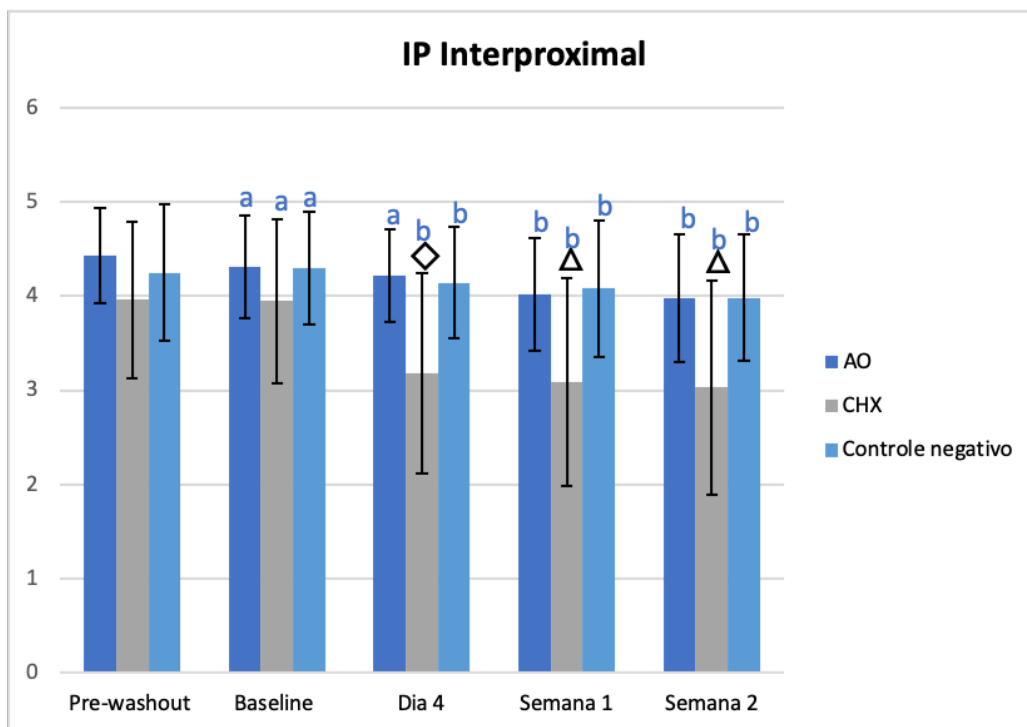
Δ Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, para os grupos controle negativo e AO, usando $\alpha = 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

5.7 Índice de Placa Interproximal

Com uma exceção, todos os grupos de tratamento promoveram reduções significativas nos escores médios do índice de placa interproximal durante o período experimental avaliado, em comparação com os escores do *baseline* (Figura 5.7). Na visita do dia 4, o grupo CHX exibiu um escore médio na placa interproximal significativamente menor que o grupo AO (Figura 5.7). Em relação aos indivíduos nos grupos controle negativo e AO, os indivíduos no grupo CHX exibiram um escore médio na placa interproximal significativamente mais baixa nas avaliações de 1 e 2 semanas (Figura 5.7). Da mesma forma, o grupo CHX apresentou maiores reduções delta no escore médio do

índice interproximal da placa em comparação com os grupos controle negativo e AO nas avaliações no dia 4, 1 semana e 2 semanas (comparações com controle negativo $p = 0,01$ no dia 4; $p = 0,02$ em 1 semana e $p = 0,02$ em 2 semanas; comparações com AO $p = 0,01$ no dia 4; $p = 0,01$ em 1 semana e $p = 0,02$ em 2 semanas).

Figura 5.7 - Comparação da média do índice de placa Inter proximal entre os grupos experimentais



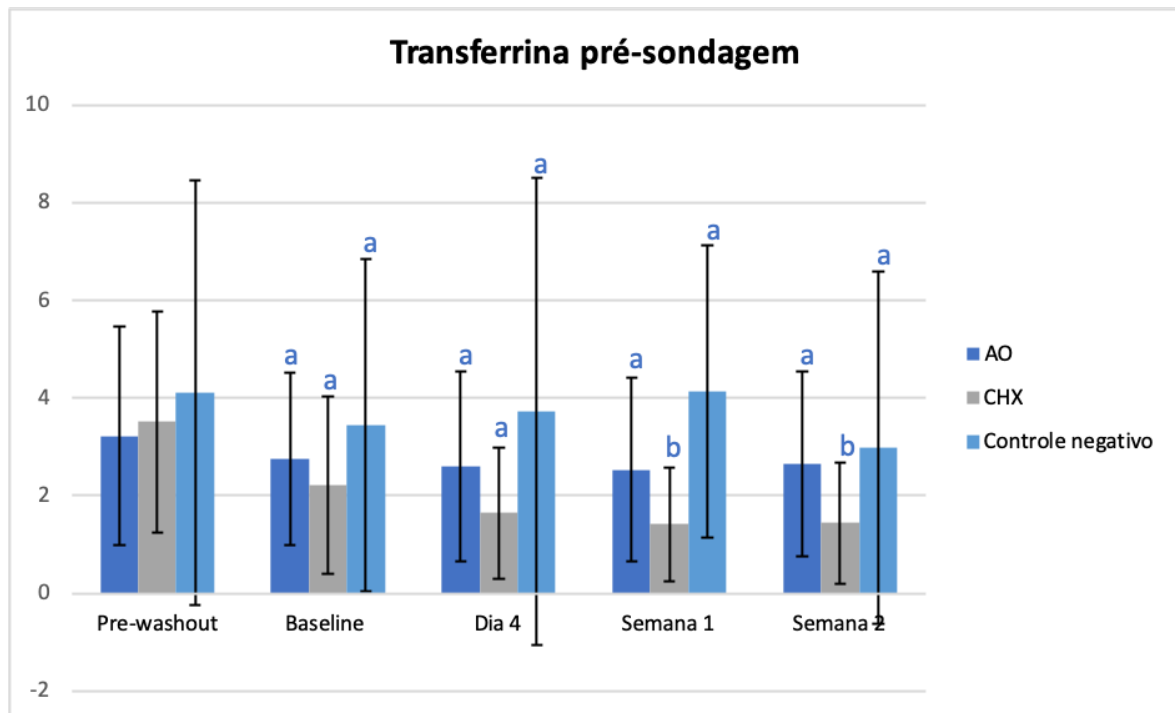
△ Significância da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, para os grupos controle negativo e AO, usando $\alpha = 0,05$; ◇ Significado da comparação do ANOVA, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, para o grupo AO, usando $\alpha = 0,05$; Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com a *baseline*.

5.8 Transferrina Salivar

Com uma exceção, nenhum dos grupos reduziu os níveis de transferrina salivar durante o período experimental, em comparação com os valores do *baseline*. A exceção foi o grupo CHX que apresentou uma redução nos níveis de transferrina salivar nas visitas de 1 e 2 semanas, em comparação com os valores do *baseline* (Figura 5.8). Não foram

encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de tratamento, em relação aos níveis médios de transferrina salivar (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Comparação dos níveis médios de transferrina salivar entre os grupos experimentais no período experimental



Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos, em comparação com o *baseline*.

5.9 Segurança

Estomatite aftosa foi diagnosticada na mucosa bucal de um paciente do grupo AO. Não foram observadas outras lesões de tecidos moles e / ou duros ao longo do estudo. Quatro indivíduos do grupo AO relataram leve sensação de queimação na ponta da língua. Um sujeito do controle negativo reclamou de leve sensação de queimação na mucosa bucal. Ressecamento bucal foi relatado por um sujeito do grupo AO e outro pelo grupo CHX. Os demais efeitos adversos foram relatados no grupo controle negativo e incluíram: hipersensibilidade à dentina (n = 1), sensibilidade ao longo da margem gengival (n = 1) e dormência leve da língua (n = 1).

6 DISCUSSÃO

Este estudo clínico controlado, duplo-cego, comparou a eficácia anti-gengivite de um creme dental experimental contendo AO usado em combinação com um enxaguatório placebo com a eficácia de um creme dental fluoretado usado em combinação com um enxaguatório placebo (grupo controle negativo) ou um enxaguatório bucal com clorexidina (grupo CHX). Dentro dos limites deste estudo, o creme dental contendo AO foi capaz de reduzir a inflamação gengival na mesma magnitude que a CHX.

No geral, todos os grupos apresentaram reduções na placa e gengivite dentro de 4 dias após o uso do produto, que foram mantidos até o final do estudo. Parte dessas reduções pode ser atribuída ao efeito positivo da participação do estudo na conscientização e motivação dos pacientes para manter uma boa higiene bucal (Owens et al., 1997) e / ou na instrução de escovar duas vezes ao dia, o qual foi realizado individualmente por cada paciente. Mais especificamente, as razões acima mencionadas provavelmente explicam a magnitude das melhorias no controle do biofilme e na saúde gengival exibidas por indivíduos que usaram creme dental com flúor e enxaguatório bucal com placebo.

Como esperado, as maiores reduções de placa e gengivite foram encontradas no grupo CHX, embora a CHX não tenha promovido a remissão completa da gengivite. De acordo com os nossos resultados, outros também demonstraram que a CHX é o agente antimicrobiano adjuvante mais eficaz para reduzir a placa bacteriana e a gengivite (Grossman et al., 1989; Overholser et al., 1990; Charles et al., 2004; Van Strydonck et al., 2012; James et al., 2017; Arweiler et al., 2018). Seu uso diário, no entanto, é limitado pela taxa cada vez maior de efeitos adversos após duas semanas de uso (Ernst et al., 2005; Van Strydonck et al., 2012). A superioridade clínica da CHX é explicada por sua capacidade de ser absorvida por vários substratos dentro da cavidade oral, incluindo mucosa oral, dentes, película adquirida e biofilme, e ser liberada gradualmente e lentamente ao longo do tempo, em sua forma ativa e em níveis capazes de manter efeitos bacteriostáticos inespecíficos por várias horas, resultando em baixo acúmulo do biofilme.

Por esses motivos, os enxaguatórios bucais contendo CHX ganharam uma designação padrão ouro (Jones, 1997) e foram incluídos neste estudo como controle positivo.

O enxágue com clorexidina promoveu maiores reduções tanto na placa supragengival quanto na gengivite do que no grupo controle negativo. De interesse, embora o AO não tenha sido capaz de reduzir a placa da mesma magnitude que a CHX, tanto a CHX quanto o AO foram comparáveis na redução da inflamação gengival quando usados como adjuvantes ao controle mecânico da placa. Como discutido acima, é bem aceito que a CHX reduz a gengivite através do controle da placa. Por outro lado, é provável que a capacidade do AO de reduzir a gengivite seja explicada por seu forte efeito anti-inflamatório, como a CHX (Pollier; Goossens, 2012). Nessa linha, um estudo *in vitro* utilizando monocamadas de células endoteliais da veia umbilical humana demonstrou que o AO dificulta respostas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) inibindo a expressão de moléculas de adesão celular (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectinas), que por sua vez, demonstraram comprometer a adesão e a transmigração de neutrófilos através de células endoteliais em um modelo *in vivo* (Lee et al., 2013). Por fim, o AO inibe a expressão de NF- κ B, o que resulta na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (Lee et al., 2013). Os efeitos anti-inflamatórios do AO levaram vários estudos intervencionistas a explorar o uso de AO e derivados dele no tratamento de doenças inflamatórias (Choi et al., 2013; Choi et al., 2016; Kim et al., 2018; Adhikari et al., 2019). Dados preliminares indicam que o AO pode mitigar as respostas inflamatórias e pode ser um potencial candidato terapêutico para o tratamento da artrite reumatoide (Choi et al., 2016), dermatite atópica (Choi et al., 2013), dermatite alérgica de contato (Choi et al., 2013), fibrose pulmonar (Kim et al., 2018) e periodontite (Adhikari et al., 2019).

Apesar de que os grupos AO e CHX mostraram escores gengivais semelhantes ao longo do estudo, é importante destacar que a CHX reduziu a inflamação gengival em maior extensão do que a OA durante os primeiros 4 dias de uso (maior redução delta). Além disso, o efeito antigengivite do grupo AO não foi diferente do efeito detectado no grupo controle negativo, mesmo após 2 semanas de uso. Embora a base desses resultados permaneça desconhecida, é possível que a OA tenha seu efeito anti-gengivite limitado por sua incapacidade de controlar a placa na mesma extensão que a CHX. O

efeito antigengivite do AO foi limitado pela instabilidade de controlar a placa na mesma extensão que a CHX. Apesar do fato do AO mostrar propriedades antimicrobianas, esses achados não foram consistentes com os resultados deste estudo, que é o primeiro a analisar o efeito antibiofilme em um ensaio clínico. Entre os motivos para explicar essa divergência, podemos constatar que estudos avaliando esse efeito antimicrobiano foram realizados avaliando sua ação contra bactérias cariogênicas (Scalon et al., 2017; Zhou et al., 2013), com poucas evidências de sua eficácia em bactérias periodontopatogênicas. Outro fator importante é que os estudos até agora disponíveis foram conduzidos avaliando as condições planctônicas em laboratório e não em situações clínicas com crescimento contínuo de biofilme, o que pode mostrar resultados diferentes.

O sangramento gengival auto-relatado é um meio aceito de avaliar a população e demonstrou prever achados de exames clínicos com baixa sensibilidade, mas alta especificidade (35-42% e 76-88%, respectivamente) (Blicher et al., 2005). Surpreendentemente, descobrimos que apenas AO reduziu o sangramento gengival auto-relatado ao escovar. Embora os mecanismos subjacentes a esse achado não tenham sido investigados em nosso estudo, outros estudos no campo da medicina demonstraram que o AO reduz a permeabilidade vascular cerebral e melhora a integridade do endotélio, regulando positivamente a expressão de junções oclusivas e junções aderentes (Han et al., 2018). No entanto, resta determinar se o AO tem os mesmos efeitos nos vasos sanguíneos gengivais.

A transferrina é uma glicoproteína do plasma sanguíneo que se liga ao ferro que desempenha um papel fundamental na regulação da concentração de ferro e sua distribuição do sangue para vários órgãos, como fígado, baço e medula óssea. A saliva pode ser contaminada por sangue originado de doenças periodontais ou lesões orais. À luz disso, a transferrina salivar foi medida neste estudo como um marcador substituto da contaminação sanguínea na saliva. Nem o AO nem o grupo placebo apresentaram reduções nos níveis de transferrina salivar durante o período experimental. Por outro lado, a CHX foi capaz de promover uma redução nos níveis de transferrina salivar após uma semana de uso. Assim, o maior controle da placa e redução da gengivite promovida pela CHX foi acompanhado por uma diminuição da transferrina salivar. No entanto, esses resultados justificam uma interpretação cautelosa, pois os níveis de transferrina salivar

podem ser influenciados por outros fatores além da doença periodontal, como idade, taxa de fluxo salivar, hormônios gonadais, número de dentes, aumento das forças de mordida e integridade da mucosa oral (Kang; Kho, 2019). Além disso, nenhum estudo clínico avaliou as alterações nos níveis de transferrina salivar em resposta ao tratamento da gengivite. Consequentemente, nossos dados não podem ser comparados com outros.

Embora o presente estudo tenha seguido rigorosamente as diretrizes do método científico, ele tem várias limitações que devem ser reconhecidas. A American Dental Association sugere que a eficácia de um produto adjuvante no controle do biofilme e da gengivite deve ser avaliada por um período de pelo menos quatro semanas (American Dental Association, 1997; American Dental Association, 2008). O período de avaliação do presente estudo, no entanto, não pode ser estendido além de duas semanas, pois o uso prolongado de CHX está associado a aumentos constantes de efeitos adversos. Além disso, o sangramento gengival auto-relatado ao escovar pode ter sido prejudicado pela subjetividade e eficácia dos pacientes em evidenciar o sangramento ao escovar os dentes. Finalmente, apesar de todos os pacientes terem sido instruídos individualmente a escovar os dentes e enxaguar depois, de acordo com o protocolo do estudo e o retorno dos produtos, a veracidade do cumprimento do estudo é limitada pela falta de um padrão-ouro de medição. Apesar dessas limitações, no entanto, o presente estudo clínico demonstrou que todos os grupos promoveram reduções na placa supragengival e na gengivite, embora não na mesma extensão.

7 CONCLUSÃO

Este estudo clínico sugere que o OA contendo creme dental pode controlar a inflamação gengival em uma extensão semelhante ao CHX, embora o efeito limitado do antibiofilme da OA e maior incidência de efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS¹

Adhikari N, Neupane S, Aryal YP, Choi M, Sohn WJ, Lee Y, et al. Effects of oleanolic acid acetate on bone formation in an experimental periodontitis model in mice. *J Periodontal Res.* 2019; 54(5): 533-45. doi: 10.1111/jre.12657.

Albandar JM, Kingman A, Brown LJ, Loe H. Gingival inflammation and subgingival calculus as determinants of disease progression in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998;25(3): 231-7. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02433.x.

Albandar JM, Kingman A. Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol.* 1999; 70(1):30-43. doi: 10.1902/jop.1999.70.1.30.

American Academy of Periodontology. Parameters on plaque-induced gingivitis. *J Periodontol.* 2000; 71(5):851-852. doi: 10.1902/jop.2000.71.5-S.851.

American Dental Association. Council of Scientific Affairs. Acceptance Program Guidelines: Chemotherapeutic products for control of gingivitis. Chicago; July 1997.

American Dental Association. Council of Scientific Affairs. Acceptance Program Guidelines: Chemotherapeutic products for control of gingivitis. Chicago; 2008.

Archila L, Bartizek RD, Winston JL, Biesbrock AR, McClanahan SF, He T. The comparative efficacy of stabilized stannous fluoride/sodium hexametaphosphate dentifrice and sodium fluoride/triclosan/copolymer dentifrice for the control of gingivitis: a 6-month randomized clinical study. *J Periodontol.* 2004;75(12):1592-9. doi: 10.1902/jop.2004.75.12.1592.

Arweiler NB, Auschill TM, Sculean A. Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontol* 2000. 2018; 76(1):164-179. doi: 10.1111/prd.12152.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Ayeleso TB, Matumba MG, Mukwevho E. Oleanolic Acid and Its Derivates: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Molecules*. 2017; 22(11): 1-16. doi: 10.3390/molecules22111915.

Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*. 2003;9 Suppl 1:23-9. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.5.x.

Baelum V, Scheutz F. Periodontal diseases in Africa. *Periodontol 2000*. 2002; 29:79-103. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.290105.x.

Blicher B, Joshipura K, Eke P. Validation of self-reported periodontal disease: a systematic review. *J Dent Res*. 2005; 84(10):881-90. doi: 10.1177/154405910508401003.

Botero JE, Rösing CK, Duque A, Jaramillo A, Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):34-57. doi: 10.1111/prd.12072.

Carvajal P, Gómez M, Gomes S, Costa R, Toledo A, Solanes F, et al. Prevalence, severity, and risk indicators of gingival inflammation in a multi-center study on South American adults: a cross-sectional study. *J Appl Oral Sci*. 2016; 24(5):524-534. doi: 10.1590/1678-775720160178.

Carvajal P, Vernal R, Reinero D, Malheiros Z, Stewart B, Panutti CM, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section II: Introduction part II. *Braz Oral Res*. 2020; 34(Suppl1):e023. doi: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0023

Chapple IL, Van Der Weijden GA, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015; 42(Suppl. 16):S71-6. doi: 10.1111/jcpe.12366.

Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mandoki SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(10): 878-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2004.00578.x.

Choi JK, Kim SW, Kim DS, Lee JY, Lee S, Oh HM, et al. Oleanolic acid acetate inhibits rheumatoid arthritis by modulating T cell immune responses and matrix-degrading enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 290(1):1-9. doi: 10.1016/j.taap.2015.11.005.

Choi JK, Oh HM, Lee S, Park JW, Khang D, Lee SW, et al. Oleanolic acid acetate inhibits atopic dermatitis and allergic contact dermatitis in a murine model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 269(1):72-80. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.001.

Clerehugh V, Worthington HV, Lennon MA, Chandler R. Site progression of loss of attachment over 5 years in 14- to 19-year-old adolescents. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(1):15–21. doi: 10.1111/j.1600-051x.1995.tb01766.x.

Corbet EF, Zee KY, Lo EC. Periodontal diseases in Asia and Oceania. *Periodontol* 2000. 2002; 29:122-52. doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.290107.x.

Ernst CP, Canbek K, Dillenburger A, Willershausen B. Clinical study on the effectiveness and side effects of hexetidine and chlorhexidine mouthrinses versus a negative control. *Quintessence Int.* 2005; 36(8): 641-52.

Figuro E, Roldán S, Serrano J, Escribano M, Martín C, Preshaw PM . Efficacy of adjunctive therapies in patients with gingival inflammation. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2019; Dic 23. doi: 10.1111/jcpe.13244.

Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, Ferreti GA, Sturzenberger EP, Bollmer BW, et al. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *J Periodontol.* 1989; 60(8): 435-40. doi: 10.1902/jop.1989.60.8.435.

Han YW, Liu XJ, Zhao Y, Li XM. Role of Oleanolic acid in maintaining BBB integrity by targeting p38MAPK/VEGF/Src signaling pathway in rat model of subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol.* 2018; 839:12-20. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.09.018.

Jafer M, Patil S, Hosmani J, Bhandi SH, Chalisserry EP, Anil S. Chemical plaque control strategies in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *J Contemp Dent Pract.* 2016;17(4):337-43. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1851.

James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 31(3):1-251. doi: 10.1002/14651858.CD008676.pub2.

Jones CG. Chlorhexidine: is still the gold standard?. *Periodontol 2000*. 1997; 15:55-62. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x.

Jose A, Butler A, Payne D, Maclure R, Rimmer P, Bosma ML. A randomized clinical study to evaluate the efficacy of alcohol-free or alcohol-containing mouthrinses with chlorhexidine on gingival bleeding. *Br Dent J*. 2015; 219(3):125-30. doi: 10.1038/sj.bdj.2015.592.

Kang JH, Kho HS. Blood contamination in salivary diagnostics: current methods and their limitations. *Clin Chem Lab Med*. 2019; 57(8):1115-1124. doi: 10.1515/cclm-2018-0739.

Kim MS, Han JY, Kim SH, Jeon D, Kim HY, Lee SW, et al. Oleanolic acid acetate attenuates polyhexamethylene guanidine phosphate-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2018; 252-253:1-9. doi: 10.1016/j.resp.2018.03.001.

Lang P, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(20):9-16. doi: 10.1111/jcpe.12936.

Lang NP, Schätzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(10):3-8. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01415.x

Lee W, Yang EJ, Ku SK, Song KS, Bae JS. Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation*. 2013; 36(1): 94-102. doi: 10.1007/s10753-012-9523-9.

Li Y, Lee S, Hujoel P, Su M, Zhang W, Kim J, et al. Prevalence and severity of gingivitis in American Adults. *Am J Dent*. 2010; 23(1):9-13.

Lin C, Wen X, Sun H. Oleanolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2016; 6(6):643-55. doi: 10.1080/13543776.2016.1182988.

Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967; 38: 610-6. doi: 10.1902/jop.1967.38.6.610.

Marsh PD. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(6):462-7. doi: 10.1111/j.1600-051x.1991.tb02317.x.

Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque- induced gingival conditions. *J Periodontol.* 2018; 89(1):17-27. doi: 10.1002/JPER.17-0095.

Murillo G, Vargas MA, Castillo J, Serrano JJ, Ramirez GM, Humberto VJ, et al. Prevalence and Severity of Plaque-Induced Gingivitis in Three Latin American Cities: Mexico City-Mexico, Great Metropolitan Area-Costa Rica and Bogota-Colombia. *Odovtos* [Internet]. 2018; 20(2): 91-102.

Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE, Niheaus C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1990; 17(8): 575-9.

Owens J, Addy M, Faulkner J, Lockwood C, Adair R. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(10):732-7. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00190.x.

Pollier J, Goossens A. Oleanolic Acid. *Phytochemistry.* 2012; 77: 10-5. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.022.

Quigley GA, Hein JW. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc.* 1962; 65:26-9. doi: 10.14219/jada.archive.1962.0184

Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol.* 2017;44(12):1182–1191. doi: 10.1111/jcpe.12782.

Sanz M, Serrano J, Iñesta M, Santa Cruz I, Herrera D. Antiplaque and antigingivitis toothpastes. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:27-44. doi: 10.1159/000350465.

Scalon Cunha LC, Andrade e Silva ML, Cardoso Furtado NA, Vinhólis AH, Martins CH, da Silva Filho AA, Cunha WR. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2007; 62(9-10):668-72. doi: 10.1515/znc-2007-9-1007.

Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond).* 2003; 105(2): 167-72. doi: 10.1042/CS20030031.

Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 (Suppl 16):S106-38. doi: 10.1111/jcpe.12331.

Sheen S, Pontefract H, Moran J. The benefits of toothpaste--real or imagined? The effectiveness of toothpaste in the control of plaque, gingivitis, periodontitis, calculus and oral malodour. *Dent Update.* 2001; 28(3):144-7. doi: 10.12968/denu.2001.28.3.144.
Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000.* 2002; 29:104-21.

Teles RP, Teles FR. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?. *Braz Oral Res.* 2009; 23 Suppl 1:39-48. doi: 10.1590/s1806-83242009000500007.

Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol.* 2015; 42 Suppl 16:S1-4. doi: 10.1111/jcpe.12382.

Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(20):44-67. DOI: 10.1111/jcpe.12939.

Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol.* 1970; 41(1):41-3. doi: 10.1902/jop.1970.41.41.41.

Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis

patients: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(11): 1042-55. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x.

Žibera L, Šamec D, Mocan A, Nabavi SF, Bishayee A, Farooqi AA, et al. Oleanolic Acid Alters Multiple Cell Signaling Pathways: Implication in Cancer Prevention and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3): 643. doi: 10.3390/ijms18030643.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da eficácia de dentífrícios na redução do sangramento gengival

Pesquisador: Giuseppe Alexandre Romito

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73129517.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.340.538

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores: "O ácido oleanólico (AO) apresenta várias atividades biológicas / farmacológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos. Além disso, evidências recentes demonstraram que o ácido oleanólico também melhora a agregação plaquetária, sem afetar a coagulação plasmática. Embora vários dentífrícios comumente usados para escovação dentária possuam ação anti-gengivite, nenhum deles favorece a coagulação. Desta forma, o objetivo deste ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado será avaliar a o efeito de um dentífrício contendo ácido oleanólico em reduzir a taxa de sangramento gengival em pacientes diagnosticados com gengivite crônica. Após uma semana de washout, os sujeitos da pesquisa serão distribuídos aleatoriamente em um dos seguintes grupos: grupo teste (n = 30, escovação com dentífrício fluoretado contendo ácido oleanólico seguida por bochecho com solução placebo), grupo controle negativo (n = 30, escovação com dentífrício fluoretado convencional seguida por bochecho com solução placebo) e grupo controle positivo (n = 30, escovação com dentífrício fluoretado convencional seguida por bochecho com solução de digluconato de clorexidina 0.12%). Os participantes serão orientados a usar os produtos teste duas vezes ao dia, por duas semanas. O sangramento gengival será avaliado pelo índice de severidade gengival (ISG) e pelo Índice Gengival (IG) e a quantidade de placa será aferida por meio do Índice de Placa de Quigley & Hein modificado por Turesky (IP). Adicionalmente, serão avaliadas as concentrações de transferrina e citocinas inflamatórias na saliva e de mieloperoxidase e neutrófilos nas amostras de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

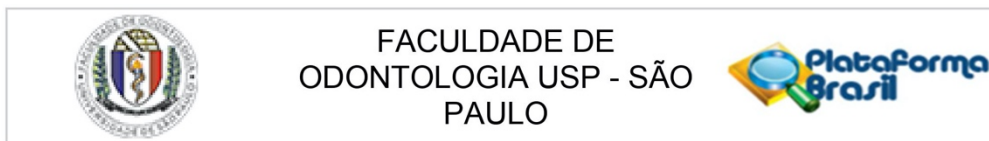
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.340.538

enxague oral. Os parâmetros clínicos e salivares/enxague serão obtidos no baseline, e nos dias 1, 4, 8 e 15. Os dados das variáveis respostas estão expressos como média \pm desvio padrão e serão testados quanto a sua normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Os dados que atenderam os pressupostos da estatística paramétrica serão avaliados por Análise de Variância (ANOVA) de duas entradas. Para identificar as diferenças entre as médias será utilizado o teste de Tukey (HSD). Os dados que não atenderam a premissa da estatística paramétrica serão avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis ou pelo teste de Friedman e para identificar as diferenças entre as médias será utilizado o teste de Dunn. Em todas as análises será utilizado um nível de significância de 5%."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

"Hipótese: Embora vários dentífrícios comumente usados para escovação dentária possuam ação antigengivite, nenhum deles favorece a coagulação. Portanto, com base nestes dados, a hipótese deste projeto é que dentífrícios contendo ácido oleanólico (AO) promovem uma maior redução na taxa de sangramento gengival.

Objetivo Primário: O objetivo deste estudo piloto randomizado e controlado será avaliar a eficácia de um dentífrício contendo ácido oleanólico (AO) na redução do sangramento gengival (índice de severidade gengival), após 2 semanas de uso, em indivíduos diagnosticados com gengivite crônica."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São citados pelos pesquisadores:

"Riscos: Em geral, não se espera que haja nenhum efeito secundário ao uso dos produtos em teste. Entretanto, existe a possibilidade de irritação de tecidos moles ou hipersensibilidade dentária com o uso dos produtos em teste. Se ocorrerem estas condições, se espera que desapareçam ao suspender o uso do produto. Todos os procedimentos acima descritos serão realizados por profissionais qualificados e preparados para isso.

Benefícios: A participação neste estudo pode não beneficiar os participantes pessoalmente. No entanto, os participantes receberão o diagnóstico do estado de saúde de suas gengivas e o fornecimento gratuito de produtos de higiene bucal durante a duração do estudo."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



Continuação do Parecer: 2.340.538

São citados pelos pesquisadores: "O grupo controle positivo deste estudo fará escovação dentária com um dentífrico fluoretado e na sequência fará um bochecho com solução de digluconato de clorexidina 0,12% (o produto mais eficaz no controle da placa e gengivite). Os outros dois (2) grupos experimentais farão a escovação dentária com um dentífrico fluoretado contendo ácido oleanólico e com um dentífrico fluoretado sem ácido oleanólico, respectivamente, e na sequência farão um bochecho com uma solução placebo. Assim o estudo terá: 1- um grupo experimental: escovação dentária com um dentífrico fluoretado contendo ácido oleanólico e bochecho com solução placebo. 2 - um grupo controle negativo: escovação dentária com um dentífrico fluoretado sem ácido oleanólico e bochecho com solução placebo. 3- um grupo controle positivo: escovação dentária com um dentífrico fluoretado sem ácido oleanólico e bochecho com solução de digluconato de clorexidina."

Portanto, todos os 90 participantes da pesquisa usaram dentífrico fluoretado

O dentífricos e soluções para bochechos foram descritas na brochura do pesquisador e TCLE, sendo eles: dentífrico para uso doméstico (Creme Dental Colgate Máxima Proteção Anticáries), dentífrico fluoretado contendo ácido oleanólico e eugenol (ainda não disponível para comercialização), solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate PerioGard) e solução placebo para bochecho.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta:

Carta de autorização do uso da clínica odontológica;

TCLE;

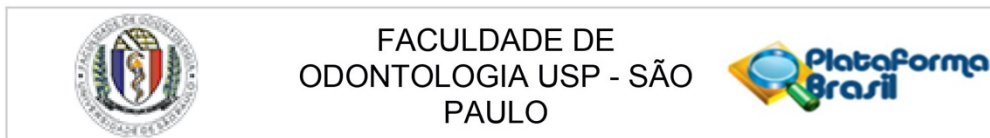
Folha de rosto;

Projeto anexado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil). Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.340.538

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto esta adequado para aprovação.

Quanto a participação da empresa patrocinadora, os pesquisadores explicaram na plataforma Brasil, em outras informações: "Este projeto de pesquisa será enviado para apreciação e possível obtenção de fomento pela Colgate-Palmolive. A Colgate-Palmolive solicita que os projetos submetidos para fomento já tenham a aprovação do CEP local. Caso o projeto receba o financiamento da Colgate-Palmolive, o CEP será imediatamente informado via documentação pertinente. Salienta-se que o projeto somente será conduzido, caso recebamos a verba necessária para a sua execução."

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_968272.pdf	06/10/2017 11:38:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_anti_sangramento_gengival.docx	05/10/2017 11:32:08	Cristina Cunha Villar	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_anti_sangramento_gengival.docx	05/10/2017 11:15:03	Cristina Cunha Villar	Aceito
Cronograma	Cronograma_anti_sangramento_gengival.docx	05/10/2017 10:51:07	Cristina Cunha Villar	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_pesquisa_clinica.pdf	09/08/2017 13:43:46	Cristina Cunha Villar	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	31/07/2017 15:48:17	Cristina Cunha Villar	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA USP - SÃO
PAULO



Continuação do Parecer: 2.340.538

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Título da Pesquisa:** Avaliação da eficácia de dentifrícios na redução do sangramento gengival**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**LOCAL:** Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Av. prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária – São Paulo – SP.**1. Dados de Identificação do Participante da Pesquisa ou Responsável Legal:**

Nome: _____
 Sexo: M () F () Data de Nascimento: ____/____/____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Estado: _____
 CEP: _____ Telefone () _____
 Numero do participante da pesquisa: _____

2. Informações sobre a pesquisa clinica:

Este documento é um convite para participação voluntária neste projeto. Você foi convidado porque é portador de gengivite. Se concordar em participar deste estudo clinico, você recebera gratuitamente de produtos de higiene bucal durante a duração do estudo.

Você poderá desistir de participar desta pesquisa em qualquer momento que quiser, se assim decidir, você não sofrerá nenhuma penalidade e não perderá nenhum de seus benefícios regulares. Deixar o estudo não afetara os seus tratamentos odontológicos.

2.1. Objetivos da pesquisa

Esta pesquisa, que se chama “Avaliação da eficácia de dentifrícios na redução do sangramento gengival”, vai estudar três pastas de dentes e um bochecho que são usados para a higiene oral. O objetivo deste estudo será comparar a eficiência destes produtos em reduzir o sangramento das gengivas.

2.2. Procedimentos do estudo clinico

Durante a sua participação nesse estudo clinico, você irá fazer seis (6) visitas a clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, São Paulo, SP). Abaixo estão descritos os procedimentos que serão realizados em cada uma delas.

Na primeira visita, você irá fornecer as suas informações de saúde (medica e odontológica), informações sobre os medicamentos que utiliza e suas informações como data de nascimento e sexo. No mesmo dia, será feito um exame/avaliação da boca. Com base no seu histórico médico e odontológico e nos resultados do exame da boca, o pesquisador determinará se você é um sujeito elegível para participar do estudo.

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica do Pesquisador: _____

A segunda visita é a visita de avaliação inicial. Nesta visita você será questionado quanto a mudanças na história médica e no uso de medicamentos. Na sequência, iremos coletar a sua saliva. Para esta coleta, você irá se acomodar confortavelmente em uma cadeira com a cabeça inclinada para frente entre os braços para que a saliva escoe da boca para um frasco plástico.

Após a coleta de saliva, você fará seis (6) bochechos com soro fisiológico e cuspirá o bochecho em um frasco plástico. Após este procedimento, o pesquisador irá fotografar seus dentes da frente com uma câmera digital. Em seguida, o pesquisador avaliará a quantidade de placa dentária e seu estado de saúde de sua gengiva tanto visualmente como por sondagem suave. A fim de tornar a placa em seus dentes visível, você irá enxaguar a boca com um corante colorido vermelho que foi aprovado para uso como aditivo alimentar. Ao término do exame de sua boca, iremos coletar uma segunda amostra de saliva. No final desta consulta, você receberá uma pasta de dente, uma escova de dente de adulto macia, um diário para documentação de eventos de sangramento durante a escovação e instruções para a fase de pré-tratamento.

Durante a fase de pré-tratamento, de duração de uma semana, você escovará seus dentes duas vezes ao dia (de manhã após o café da manhã, à noite após o jantar) por 2 minutos com os produtos do estudo e anotará no diário a ocorrência de sangramento durante a escovação.

Você retornará à clínica dentária após uma semana de pré-tratamento para a terceira consulta. Na terceira consulta, você será questionado quanto a mudanças na história médica e no uso de medicamentos. Na sequência, você irá se acomodar confortavelmente em uma cadeira com a cabeça inclinada para frente entre os braços para que a saliva escoe da boca para um frasco plástico. Após a coleta de saliva, você fará seis (6) bochechos com soro fisiológico e cuspirá o bochecho em um frasco plástico. Após este procedimento, o pesquisador irá fotografar seus dentes da frente com uma câmera digital. Em seguida, o pesquisador avaliará a quantidade de placa dentária e seu estado de saúde de sua gengiva tanto visualmente como por sondagem suave. Ao término do exame de sua boca, iremos coletar uma segunda amostra de saliva. No final da terceira consulta, você receberá os produtos do estudo e as instruções de uso. Resumidamente, você deverá escovar os dentes duas vezes por dia (de manhã após o café da manhã, à noite após o jantar) por dois (2) minutos com a pasta de dentes e a escova de dente fornecidas até que o estudo seja concluído. Você também deverá documentar os eventos de sangramento gengival durante a escovação em um diário e a bochechar por 30 segundos com o bochecho do estudo após escovar os dentes.

Você retornará à clínica dentária após (3) três dias para a quarta consulta. Na quarta consulta, você será questionado quanto a mudanças na história médica e no uso de medicamentos. Na sequência, iremos coletar a sua saliva e você fará seis (6) bochechos com soro fisiológico e cuspirá o bochecho em um frasco plástico. Após estes procedimentos, o pesquisador irá fotografar seus dentes da frente com uma câmera digital. Em seguida, o pesquisador avaliará a quantidade de placa dentária e seu estado de saúde de sua gengiva tanto visualmente como por sondagem suave. Na sequência, iremos coletar uma segunda amostra de saliva.

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica do Pesquisador: _____

Você retornará à clínica dentária após mais (3) quatro dias para a quinta consulta. Na quinta consulta, você será questionado quanto a mudanças na história médica e no uso de medicamentos. Na sequência, iremos coletar a sua saliva e você fará seis (6) bochechos com soro fisiológico e cuspirá o bochecho em um frasco plástico. Após estes procedimentos, o pesquisador irá fotografar seus dentes da frente com uma câmera digital. Em seguida, o pesquisador avaliará a quantidade de placa dentária e seu estado de saúde de sua gengiva tanto visualmente como por sondagem suave. Ao término do exame de sua boca, iremos coletar uma segunda amostra de saliva.

Após mais uma semana, você retornará à clínica dentária para a sexta e última consulta. Na sexta consulta, você será questionado quanto a mudanças na história médica e no uso de medicamentos. Na sequência, iremos coletar a sua saliva e você fará seis (6) bochechos com soro fisiológico e cuspirá o bochecho em um frasco plástico. Após estes procedimentos, o pesquisador irá fotografar seus dentes da frente com uma câmera digital. Em seguida, o pesquisador avaliará a quantidade de placa dentária e seu estado de saúde de sua gengiva tanto visualmente como por sondagem suave. Ao término do exame de sua boca, iremos coletar uma segunda amostra de saliva. Ao término desta consulta você terá concluído a participação no estudo. Desta forma, você irá parar de usar os produtos do estudo e retornará a sua rotina de higiene bucal. Todos os produtos do estudo que sobrarem deverão ser devolvidos ao pesquisador.

Você deverá suspender o consumo de álcool por um (1) dia e parar de comer ou beber (exceto água) e escovar os dentes por duas (2) horas antes de comparecer as visitas do estudo.

Além disso, solicita-se que você use somente os produtos fornecidos pelo pesquisador durante a sua participação no estudo. Esses produtos não deverão ser compartilhados com ninguém de sua família. Não será permitido utilizar outros recursos como fio dental ou estimuladores interdentais.

Tratamentos dentários de rotina não devem ser feitos durante o andamento do estudo, entretanto emergências podem ser tratadas.

2.3. Riscos e desconforto

Em geral, não se espera que haja nenhum efeito secundário ao uso dos produtos em teste. Entretanto, existe a possibilidade de irritação de tecidos moles ou hipersensibilidade dentária com o uso dos produtos em teste. Se ocorrerem estas condições, se espera que desapareçam ao suspender o uso do produto. Todos os procedimentos acima descritos serão realizados por profissionais qualificados e preparados para isso.

Se você tiver algum problema ou qualquer lesão relacionada à pesquisa, entre em contato com o Dr. Giuseppe Romito (telefone: 11-3091-7833). Se você não puder contatar o Dr. Giuseppe Romito, por favor, ligue para o seu médico primário. A empresa patrocinadora será responsável por custos médicos de lesões ou danos físicos resultantes do uso dos produtos em estudo, desde que você procure atendimento médico conforme indicado pelo pesquisador do estudo.

Caso você engravide durante o estudo, o pesquisador irá avisá-la sobre os possíveis riscos ao feto e discutirá opções de acompanhamento da gravidez com você.

Participantes da pesquisa que ficarem grávidas durante o estudo devem informar o pesquisador do estudo e seu ginecologista imediatamente. Participantes da pesquisa que estiverem amamentando ou engravidarem serão descontinuadas do estudo.

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica do Pesquisador: _____

2.4. Tempo (numero de sessões e tempo de cada procedimento)

Os participantes deste estudo serão vistos por um pesquisador examinador na inclusão, na visita inicial e nas visitas dos dias 1, 4, 8 e 15. Desta forma, 6 visitas são planejadas por participante que complete o estudo. O estudo somente será descontinuado após análise e manifestação do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que o aprovou. Somente nos casos de urgência ou emergência o pesquisador do estudo ou patrocinador poderá realizar a descontinuação em benefício do participante do estudo.

2.5. Benefícios

A participação neste estudo pode não te beneficiar pessoalmente. No entanto, você receberá um diagnóstico quanto ao estado de saúde de suas gengivas e o fornecimento gratuito de produtos de higiene bucal durante a duração do estudo.

2.6. Ajuda de custo

Você não será pago para participar deste estudo clínico. No entanto, todas as despesas de indas e vindas da clinica e alimentação durante a sua permanência no centro de pesquisa serão reembolsadas a você.

2.7. Garantia de sigilo da identidade do participante da pesquisa

O seu nome não será divulgado para ninguém, nem qualquer informação pessoal de sua ficha (como endereço, telefone e outras), de maneira nenhuma. Este projeto só tem interesse nas informações de saúde e nos resultados do tratamento. Em nenhum momento ninguém, além da equipe que vai te atender, saberá as suas informações de cadastro. O pesquisador do estudo e a sua equipe tem o dever de manter sigilo da sua identidade. Todos os seus dados coletados no estudo serão fornecidos ao patrocinador do estudo de forma codificada isto é, você será identificado apenas por um numero. Todos os seus dados serão utilizados apenas para fins de pesquisa.

Seus registros dentários / médicos serão mantidos em sigilo, de acordo com as leis estaduais e federais relativas à privacidade e confidencialidade da informação médica. Os prontuários serão armazenados em uma sala fechada segura, de acesso limitado, e somente pessoal de estudo delegado terá acesso aos dados e registros do estudo.

2.8. Direito de desistir da pesquisa

O participante da pesquisa poderá desistir de participar do projeto de pesquisa em qualquer momento e por qualquer motivo. O participante da pesquisa tem plena liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento da pesquisa, e esta decisão não vai gerar penalização por parte dos pesquisadores.

2.9. Reutilização de dados e do material biológico

Autoriza o uso das informações do seu tratamento e do material recolhido em outras pesquisas?
() NÃO autorizo a utilização de dados ou material biológico (saliva e enxague bucal) em outra pesquisa.

() SIM autorizo a utilização de dados ou material biológico (saliva e enxague bucal) em outra pesquisa.

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica do Pesquisador: _____

2.10. Para utilizar os dados ou material biológico (coleta de fluido gengival, saliva e sangue) em outra pesquisa, quer ser consultado?

() NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva e enxague bucal) em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

() SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva e enxague bucal) em outra pesquisa.

2.11. Novos achados

Você será informado de quaisquer novos achados significativos relacionados aos produtos ou procedimentos de estudo assim que forem conhecidos. Tais informações podem afetar sua decisão de continuar a participação no estudo.

3. CONTATO

Este estudo é coordenado pelo Dr. Giuseppe Romito (telefone: 11-3091-7833), o qual pode responder sobre qualquer dúvida referente a procedimentos do estudo. Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, pode ser perguntada ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo pelo número de telefone: (11) 3091.7960, e-mail cepfo@usp.br.

4. ENDEREÇO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Av. Prof. Lineu Prestes 2227, 05508-000 - São Paulo - SP, telefone:— E-mail: cepfo@usp.br) - Horário de atendimento ao público: de segunda a sexta-feira das 9 às 12h e 14 às 16h (exceto em feriados e recesso universitário).

O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012)

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ Rubrica do Pesquisador: _____

5. ASSINATURAS

Eu li e entendi as informações contidas neste documento. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas de forma que pude entender;

Eu tive bastante tempo para pensar, para falar com minha família e/ou outras pessoas conforme necessário para me ajudar na minha decisão;

Eu entendo que não estou abrindo mão dos meus direitos legais ao assinar esse documento;

Eu vou assinar e datar as duas vias deste documento. Estou ciente de que ambos serão rubricados em todas as páginas por mim (ou o meu representante legal) e pelo pesquisador responsável. Eu vou receber uma via e o pesquisador responsável ira manter a outra nos seus arquivos.

Eu concordo em participar voluntariamente deste estudo e sei que posso voltar atrás na minha decisão a qualquer momento sem qualquer penalização.

Participante da pesquisa

Nome (letra de forma)

Assinatura

Data

Rubrica do participante: _____

Pesquisador responsável ou pessoa delegada

As informações contidas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram discutidas com o participante de estudo ou seu/sua representante legal. Creio que essa pessoa tenha tido o tempo necessário para compreender o que foi explicado para ela/ele e consentido em participar do estudo de sua própria vontade. Declaro que vou seguir a resolução 466/2012 itens IV.3 e IV.4

Nome (letra de forma)

Assinatura

Data

Rubrica do participante: _____

REPRESENTANTE LEGAL DO PARTICIPANTE (SE APLICÁVEL)

Relação com o participante: _____

Nome (letra de forma)

Assinatura

Data

Rubrica do participante: _____