

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Fabiana Martins de Oliveira Campos

**TERAPIA PERIODONTAL ASSOCIADA AO USO DE
CLOREXIDINA.**

**EXISTE RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA
BACTERIANA BUCAL, NITRITO SALIVAR E PRESSÃO
ARTERIAL?**

Taubaté – SP

2023

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Fabiana Martins de Oliveira Campos

**TERAPIA PERIODONTAL ASSOCIADA AO USO DE
CLOREXIDINA.**

**EXISTE RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA
BACTERIANA BUCAL, NITRITO SALIVAR E PRESSÃO
ARTERIAL?**

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre pelo
Curso de Mestrado em Ciências da
Saúde do Departamento de
Odontologia da Universidade Taubaté-
SP.

Área de Concentração: Clínica
Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto
Cortelli

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sheila
Cavalca Cortelli

Taubaté – SP

2023

Fabiana Martins de Oliveira Campos

**TERAPIA PERIODONTAL ASSOCIADA AO USO DE CLOREXIDINA.
EXISTE RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA BACTERIANA BUCAL, NITRITO
SALIVAR E PRESSÃO ARTERIAL?**

Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre pelo
Curso de Mestrado em Ciências da
Saúde do Departamento de
Odontologia da Universidade Taubaté-
SP.

Área de Concentração: Clínica
Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto
Cortelli

Coorientadora: Profa. Dra. Sheila
Cavalca Cortelli

Data: 30/08/2023

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: José Roberto Cortelli (Orientador)

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Davi Romeiro de Aquino

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Emanuel da Silva Rovai

Assinatura: _____

Prof. Dra. Priscila de Macedo Maximo

Assinatura: _____

**Grupo Especial de Tratamento da Informação – GETI
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBi
Universidade de Taubaté - UNITAU**

F736a Campos, Fabiana Martins de Oliveira

Terapia periodontal associada ao uso de clorexidina. Existe relação entre a frequência bacteriana bucal, nitrito salivar e pressão arterial? / Fabiana Martins de Oliveira Campos. -- 2023.

65 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Taubaté, 2023.

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Departamento de Odontologia.

Coorientação: Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, Departamento de Odontologia.

1. Bactéria. 2. Óxido nítrico. 3. Saliva. 4. Língua. 5. Doenças Periodontais. I. Universidade de Taubaté. Programa de Pós-graduação em Odontologia. II. Título.

CDD – 617.632

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó Zinha, que nos deixou no ano passado e aos meus avós Elias, Orestes e Irene que zelam por mim ao lado de Deus. Devo tudo a eles.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a Deus, sem ele nada seria possível na minha vida.

Aos meus pais Pedro e Neide por todo incentivo, carinho, paciência e compreensão, não foi fácil chegar até aqui, mas sem vocês nada seria possível.

A minha irmã Renata por todo companheirismo e amor, obrigada por me escolher ser madrinha da Sara e do Rui, eles são a minha vida, eu amo tanto vocês.

A minha prima Isabelle Schalch de Oliveira Campos, por todo incentivo e apoio, obrigada por tudo.

E a toda minha família, que são muitos, obrigada cada um, eu amo vocês.

Aos professores da pós-graduação da Universidade de Taubaté (Professores José Roberto Cortelli, Sheila Cavalca Cortelli, Davi Aquino, Emanuel da Silva Rovai, Rodrigo Augusto da Silva, Priscila Christiane Suzy Liporoni, Laís Regiane da Silva Concílio, Marina Amaral), pela confiança, aprendizado, orientação, cuidado e carinho durante esses 2 anos de Mestrado.

A CAPES, pela bolsa e incentivo a pesquisa, que proporcionou que esse momento fosse realizado.

**TERAPIA PERIODONTAL ASSOCIADA AO USO DE CLOREXIDINA.
EXISTE RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA BACTERIANA BUCAL, NITRITO
SALIVAR E PRESSÃO ARTERIAL?**

RESUMO

Clorexidina (CHX), um antisséptico bucal eficaz por suas propriedades antimicrobianas e quando utilizado de forma racional pode ser uma ferramenta importante no controle da doença periodontal. A via enterossalivar nitrato-nitrito-óxido nítrico resulta em produção sistêmica de óxido nítrico a partir de nitrato dietético inorgânico promovendo vasodilatação e regulação da pressão arterial (PA). Bactérias localizadas na porção posterior da língua são capazes de converter nitrato em nitrito, todavia o impacto do uso de enxaguatórios bucais na redução destas bactérias parece inibir esta conversão levando a eventos indesejáveis como alteração de PA. Hipotetizou-se que a terapia periodontal mecânica com o uso de CHX se associa a comunidades bacterianas disbióticas no dorso lingual podendo alterar a disponibilidade de nitrito na saliva e interferir na PA. Assim, este estudo avaliou, em indivíduos com histórico de doença periodontal, o impacto da terapia de raspagem e aplainamento radicular associada ao uso de CHX na quantificação de espécies *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Comparou-se os valores de PA e de nitrito salivar pré e pós-terapia como também a eficácia clínica longitudinal da terapia proposta. O desfecho primário foi a diferença na quantificação bacteriana lingual pré e pós-tratamento. Foram incluídos 40 participantes com histórico de PA normal subdivididos em dois grupos de 20 indivíduos, a saber, grupo teste (RAR+CHX); grupo controle (RAR). Os dados foram comparados longitudinalmente intragrupo (pré vs. pós-tratamento) e intergrupos (CHX vs. sem enxaguatório). Os resultados mostraram que de forma geral não houve diferenças significativas entre os dois grupos para as variáveis investigadas. Logo, podemos concluir que o uso de clorexidina em 14 dias tanto não inibiu as bactérias investigadas como também na disponibilidade de nitrito salivar, conseqüentemente não houve impacto na PA. Estudos clínicos prospectivos de longa duração deve ser conduzidos para corroborar ou refutar nossos achados.

Palavras-chave: Bactéria; Óxido nítrico; Saliva; Língua; Doenças periodontais.

PERIODONTAL THERAPY ASSOCIATED WITH THE USE OF CHLORHEXIDINE.

IS THERE A RELATIONSHIP BETWEEN ORAL BACTERIAL FREQUENCY, SALIVARY NITRITE AND BLOOD PRESSURE?

ABSTRACT

Chlorhexidine (CHX), an effective oral antiseptic due to its antimicrobial properties, when used rationally, can be an important tool in the control of periodontal disease. The enterosalivar nitrate-nitrite-nitric oxide pathway results in systemic production of nitric oxide from inorganic dietary nitrate promoting vasodilation and blood pressure (BP) regulation. Bacteria located in the posterior portion of the tongue are capable of converting nitrate into nitrite, however the impact of the use of mouthwashes in reducing these bacteria seems to inhibit this conversion, leading to undesirable events such as alteration of BP. It was hypothesized that mechanical periodontal therapy with the use of CHX is associated with dysbiotic bacterial communities on the lingual dorsum, which may alter the availability of nitrite in saliva and interfere with BP. Thus, this study evaluated, in individuals with a history of periodontal disease, the impact of scaling and root planing therapy associated with the use of CHX in the quantification of species *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. We evaluated in pre- and post-therapy the levels of BP and salivary nitrite values, as well as the longitudinal clinical efficacy of the pre-and post-therapy. The primary outcome was the difference in pre- and post-treatment lingual bacterial counts. Forty participants with a history of normal BP were included, subdivided into two groups of 20 individuals, namely, test group (SRP+CHX); control group (SRP). Data were longitudinally compared intragroup (pre vs. post-treatment) and intergroup (CHX vs. no mouthrinse). The results showed that, in general, there were no significant differences between the two groups for any of the investigated variables. Therefore, we can conclude that the use of chlorhexidine in 14 days did not inhibit the investigated bacteria as well as the availability of salivary nitrite, consequently there was no impact on BP. Long-term prospective clinical studies must be conducted to corroborate or refute our findings.

Keywords: Bacteria; Nitric oxide; Saliva; Tongue; Periodontal diseases.

Sumário

1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1 Doença Periodontal.....	10
1.2 Hipertensão Arterial (HA)	10
1.3 Periodontite e HA	11
1.4 Oxido nítrico	11
1.5 Enxaguatórios bucais	12
1.6 Enxaguatórios bucais e nitrito	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Primário.....	14
2.2 Secundários	14
3. METODOLOGIA	15
3.1 Princípios éticos	15
3.2 Desfecho primário e cálculo amostral	15
3.3 Delineamento do estudo	16
3.4 Treinamento e concordância Intra-examinador.....	17
3.5 Critérios de inclusão.....	18
3.6 Critérios de exclusão.....	18
3.7 Procedimentos	18
3.7.1 Exame clínico periodontal	18
3.7.2 Coleta lingual para quantificação bacteriana	18
3.7.3 Coleta salivar para dosagem de nitrito.....	19
3.7.4 Avaliação da PA.....	19
3.8 Alocação dos participantes	19
3.9 Processamentos Laboratoriais – Amostras linguais.....	20
3.10 Processamentos Laboratoriais – Amostras salivares.....	23
3.11 Análise Estatística	24

4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doença Periodontal

A doença periodontal caracteriza-se por ser uma doença destrutiva que afeta as estruturas de suporte dos dentes incluindo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. Dentre as doenças periodontais destaca-se a periodontite crônica que se inicia pela presença de uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica. Além disso, a doença periodontal por seu caráter infecto-inflamatório produz efeitos sistêmicos indesejáveis que limitam a manutenção de uma boa condição geral de saúde (Bretz et al. 2005).

1.2 Hipertensão Arterial (HA)

A HA é uma doença crônica caracterizada por níveis elevados da pressão sanguínea nas artérias. Ela acontece quando os valores das pressões máxima e mínima são iguais ou ultrapassam respectivamente os 140/90 mmHg. A pressão alta é um dos principais fatores de risco para a ocorrência de acidente vascular cerebral, enfarte, aneurisma arterial e insuficiência renal e cardíaca (Go et al. 2013). A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 600 milhões de pessoas tenham HA, com crescimento global de 60% dos casos até 2025, além de cerca de 7,1 milhões de mortes anuais (WHO, 2010). De acordo com o Center for Disease Control and Prevention (2018), depois da obesidade e inatividade física a HA é o terceiro maior fator de risco para as doenças cardiovasculares nos Estados Unidos. O Ministério da Saúde publicou um relatório apontando que o número de adultos com diagnóstico médico de hipertensão aumentou 3,7% em 15 anos no Brasil. Os índices saíram de 22,6% em 2006 a 26,3% em 2021. O relatório mostra ainda um aumento na prevalência do indicador entre os homens, variando 5,9% para mais (Ministério da Saúde, 2022).

1.3 Periodontite e HA

Estudos mostram que a pressão arterial (PA) é mais elevada entre indivíduos com doença periodontal do que em indivíduos sem a doença (Desvarieux et al. 2010; Tsakos et al. 2010). Dados da WHO (2018) investigando 12.000 indivíduos adultos dentados observou-se uma associação positiva e linear entre a doença periodontal e níveis de PA. Tsakos et al (2010) já havia relatado uma associação positiva e linear entre a pressão sistólica e a severidade da doença periodontal em indivíduos de meia idade.

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, com meia-vida de 4 a 6 segundos produzido por ação de uma enzima NO-sintase a partir do substrato L-arginina. Os efeitos positivos do NO incluem aspectos da manutenção de tônus vascular e permeabilidade, inibição de plaquetas agregação e adesão de leucócitos, proteção contra antioxidantes, neurotransmissão e respiração mitocondrial (Blot. 2021). Devido à alta volatilidade o NO pode ser indiretamente mensurado nos fluidos corporais através de produtos mais estáveis como o nitrito (NO₂) decorrentes da reação do NO com oxigênio. Adicionalmente, no contexto de produção de NO deve-se ter em mente que a arginase é outra enzima que utiliza o substrato L-arginina competindo com a iNOS. Desse modo, o aumento nas concentrações de arginase reduzem a atividade da iNOS e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de NO. Além dessa via de sintetização a partir da L-arginina mais recentemente foi descrita uma segunda via de produção de NO no sangue e nos tecidos a partir de nitratos e nitritos de origem endógena ou dietética com a participação ativa de bactérias bucais. Com uma ingestão moderada de vegetais a fonte dietética de nitrato já se sobrepõe à fonte endógena. Evidências têm sido demonstradas em estudos pré-clínicos e clínicos que a suplementação de dieta rica em nitrato beneficia a regulação da pressão arterial (Sobko et al. 2010; Kapil et al. 2015).

Cerca de 25% do nitrato circulante é absorvido pelas glândulas salivares e secretado na saliva sendo então reduzido a nitrito por ação das bactérias

buciais produtoras de nitrato redutase (Lundberg et al. 2018). Ou seja, após o nitrato ser levado para as glândulas salivares, o próximo passo no ciclo enterosalivar é a sua conversão em nitrito por bactérias redutoras de nitrato na cavidade bucal. Entre as bactérias mais associadas com a conversão nitrato-nitrito estão algumas espécies dos gêneros *Streptococcus* (Palmerini et al, 2003) e *Veillonella* (Mashima et al. 2011) entre outras. Um número expressivo de bactérias possui a capacidade de converter nitrato em nitrito, todavia, a identificação e *modus operandi*, destas bactérias *in vivo* em mamíferos ainda é um desafio.

1.5 Enxaguatórios bucais

Enxaguatórios bucais são ferramentas importantes no controle do biofilme e na redução de inflamação gengival quando utilizados como adjuntos a escovação dental e uso de fio dental. A CHX é um bisbiguanídeo catiônico de amplo espectro antimicrobiano, que tem ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Heasman & Seymour, 1994). O seu mecanismo de ação antibacteriano se deve ao fato da molécula catiônica da CHX ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio (Rölla & Melsen, 1975). A CHX (0,02%) é indiscutivelmente um dos mais agentes antimicrobianos amplamente utilizados por profissionais de saúde bucal, bem como o público com e sem doença oral, para reduzir a carga na cavidade oral a pretexto de prevenir e gerir doença bucal (Brookes et al. 2021). Exposições mais longas e repetidas ao CHX resultaram de forma semelhante no desenvolvimento de variantes bacterianas mais patogênicas, como *Streptococcus mutans* e *Porphyromonas gingivalis*. Isso é relevante porque essas espécies estão relacionadas à cárie e a alguns tipos de doença periodontal, respectivamente. No entanto, atualmente, não há estudos suficientes investigando os efeitos da CHX no microbioma oral, particularmente em doença (Brookes et al. 2021).

1.6 Enxaguatórios bucais e nitrito

Estudos em modelo animal (Petersson et al. 2009) ou em humanos (Kapil et al. 2013) mostraram que a diminuição das enzimas bacterianas redutoras de nitrato acarretada pelo uso de CHX se correlacionou com a diminuição dos níveis de nitrito bucal na ordem de 90% em humanos, além de diminuição plasmática de 25% e aumento da PA entre 2 e 3.5mmHg. Ou seja, o uso de CHX reduziu os níveis de nitrito oral e plasmático e resultou em um aumento sustentado da PA em humanos. Vale ressaltar que no artigo publicado por Kapil et al (2013) os autores destacam limitações no desenho do estudo pois (1) não houve randomização da amostra populacional e, (2) não houve a composição de um grupo placebo. Finalmente, o estudo de Kapil incluiu somente 19 jovens voluntários saudáveis. Pouco se sabe sobre o impacto de diferentes soluções antissépticas para bochechos na via nitrato-nitrito-NO. Embora a hipótese permaneça sem comprovação, com base nas meta-análises disponíveis e estudos observacionais de coorte, recomenda-se restringir o uso de antissépticos orais a indicações comprovadas (Blot. 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar em indivíduos com doença periodontal, o impacto da terapia periodontal não cirúrgica associada ao uso de CHX na frequência de espécies *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.2 Secundários

- Comparar os níveis de nitrito salivar pré e pós-terapia;
- Comparar os valores de pressão arterial pré e pós terapia;
- Avaliar a eficácia clínica longitudinal da terapia periodontal em 3 meses.

3. METODOLOGIA

- Local de execução: Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté
- Aspectos regulatórios: a condução seguiu os princípios de boas práticas clínicas

3.1 Princípios éticos

Os indivíduos foram alocados na clínica odontológica da UNITAU. Os participantes foram verbalmente informados sobre os objetivos da pesquisa, e escolheram livremente por sua participação o que foi documentada através da assinatura do TCLE. Este projeto foi aprovado pelo CEP-UNITAU sob número (CAAE: 17482019.5.0000.5501).

3.2 Desfecho primário e cálculo amostral

O desfecho primário estabelecido foi a diferença na quantificação bacteriana lingual pré e pós-tratamento. Para a definição do número de participantes incluídos no presente estudo foi realizado um cálculo amostral. Para tanto, baseados na revisão literária foram selecionados artigos com características de desfechos semelhantes ao proposto. A variável utilizada foi a frequência dos patógenos periodontais avaliados. Aplicou-se a seguinte fórmula estatística:

$$DMS = \underline{t_{5\%}} \sqrt{\frac{2 \cdot DMe}{N}}$$

Onde, DMS é a diferença mínima significativa que se deseja observar (selecionou-se 10% de diferença), t (5%), um valor tabelado de 2 e DMe que é a medida de dispersão observada, sendo o desvio padrão selecionado. Após a realização do teste estatístico para os patógenos e adotando uma margem de

segurança de 10%, verificou-se a necessidade de inclusão de 20 indivíduos em cada braço do estudo.

3.3 Delineamento do estudo

O Quadro 1 e 2 mostram os procedimentos realizados a cada visita considerando que a visita V1 realizou-se o exame clínico inicial para estabelecimento do diagnóstico periodontal e as coletas (saliva, língua e subgengival). O tratamento propriamente dito aconteceu nas visitas V2 e V3 e por fim a V4 foi o retorno de 90 dias para exame clínico periodontal e as coletas (saliva, língua e subgengival) e finalização do estudo.

Quadro 1: Descrição dos procedimentos realizados em cada visita do estudo.

Visita 1	Visita 2 (7 dias após a visita 1)
Assinatura do TCLE	Mensuração e registro da pressão arterial
Obtenção de dados demográficos e anamnese	** Verificação do uso regular de enxaguatório bucal
Verificação do uso regular de enxaguatório bucal	Raspagem e aplainamento radicular (1ª sessão)
Mensuração e registro da pressão arterial	Reagendamento para visita 3
Exame clínico inicial	
Diagnostico periodontal	
Coleta de saliva	
Coleta microbiana da língua	
Coleta microbiana subgengival (4 maiores sítios com PS)	
Entrega da ficha para marcação do enxaguatório bucal (GT)	
Reagendamento para visita 2	

Quadro 2: Descrição dos procedimentos que foram realizados em cada visita do estudo.

Visita 3 (7 dias após visita 2)	Visita 4 (90 dias)
Mensuração e registro da pressão arterial	Mensuração e registro da pressão arterial
** Verificação do uso regular de enxaguatório bucal	** Verificação do uso regular de enxaguatório bucal
Raspagem e aplainamento radicular (2ª sessão)	Exame clínico periodontal
Coleta de saliva	Coleta de saliva
Coleta microbiana da língua	Coleta microbiana da língua
Coleta microbiana subgingival (4 maiores sítios com PS)	Coleta microbiana subgingival (4 maiores sítios com PS)
Reagendamento para visita 4	Finalização do estudo.
Recebimento da ficha para marcação do enxaguatório bucal (GT)	

3.4 Treinamento e concordância Intra-examinador

Um treinamento foi realizado previamente ao início do estudo quanto a realização dos exames clínicos, microbiológicos, salivares e mensuração de PA. O treinamento incluiu procedimentos clínicos e laboratoriais. Além de treinado, o examinador clínico foi calibrado. Os dados de profundidade de

sondagem (PS) e nível de inserção clínica (NIC) obtidos durante o treinamento foram submetidos ao teste não-paramétrico *Kappa* para a concordância intra examinador do estudo (JRC). O examinador está calibrado quando dos valores de concordância se apresentarem $> 0,90$. A terapia RAR foi realizada por um segundo examinador (FMOC) experiente para o procedimento.

3.5 Critérios de inclusão

a) idade acima de 18 anos; b) mínimo de 12 dentes em boca; c) diagnóstico de gengivite/periodontite crônica Estágio II e III (Tonetti et al. 2018);

3.6 Critérios de exclusão

a) alérgicos a CHX; b) pacientes grávidas ou aleitamento materno; c) aqueles com incapacidade de cumprir o protocolo do estudo.

3.7 Procedimentos

3.7.1 Exame clínico periodontal

Os exames clínicos periodontais (PS; NIC; Índices de placa e gengival) foram realizados pelo mesmo examinador nas visitas designadas (ver Quadro 1 e 2).

- Profundidade de sondagem (PS): medida pela distância entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival.
- Nível clínico de inserção (NCI): medido pela soma da profundidade de sondagem e da distância da linha esmalte-cimento até a margem gengival.
- Índice de placa visível (IP): presença (+) ou ausência (–) de placa.
- Sangramento à sondagem (SS): presença (+) ou ausência (–) de sangramento observado durante 30 segundos após a sondagem.

3.7.2 Coleta lingual para quantificação bacteriana

Amostras foram coletadas da superfície dorsal posterior da língua usando uma alça plástica de 10ul descartável esterilizada (Cral®) deslizando suavemente no sentido póstero-anterior por 5 vezes até o preenchimento da

alça plástica. A alça foi colocada em um tubo estéril de 1,5ml e 1ml de água ultrapura (MilliUni) adicionado. Em seguida, as amostras foram agitadas em *vortex* e 500ul e transferidos para outro tubo de 1,5ml, que foi centrifugado a 10.000xg por três minutos e o sobrenadante descartado, restando apenas o precipitado (*pellet*). A extração do DNA foi realizada a partir do *pellet*. Todas as amostras foram devidamente identificadas por número para posterior processamento.

3.7.3 Coleta salivar para dosagem de nitrito

As amostras salivares foram coletadas pela manhã e/ou à tarde. Durante a coleta eles permaneceram sentados, com a cabeça levemente inclinada (cerca de 45°) em ambiente calmo, e 2,0 ml de saliva total não estimulada foram coletados em tubos Falcon estéreis. As amostras foram centrifugadas por 10 min, 15.000xg e 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80°C.

3.7.4 Avaliação da PA

A PA foi aferida usando monitor de pressão arterial de pulso control HEM-6124 da Omron no período da manhã e/ou à tarde com o participante confortavelmente sentado na cadeira odontológica com a cabeça reta e pernas descruzadas e os braços relaxados. A pressão arterial foi aferida 2 vezes no início da consulta e ao final dela. A primeira aferição foi realizada após 5 minutos com o participante sentado na cadeira utilizando o braço direito, e a segunda foi feita ao término da consulta. A média das mensurações obtidas de cada participante foi registrada em fichas próprias.

3.8 Alocação dos participantes

Os participantes foram alocados para um dos 2 braços do estudo de acordo com a história pregressa do uso de enxaguatórios bucais. Em seguida os participantes receberam tratamento de raspagem dental em duas sessões tendo como base a terapia de raspagem e aplainamento radicular (RAR) como descrito abaixo:

- **Grupo RAR {controle (n=20 participantes)}:** O procedimento de raspagem dental foi realizado por um único operador dividido em duas sessões de 60 minutos com 7 dias de diferença.
- **Grupo RAR {Clorexidina (n=20 participantes)}:** O procedimento de raspagem dental foi realizado por um único operador dividido em duas sessões de 60 minutos com 7 dias de diferença com a inclusão de solução de CHX a 0.12% por 14 dias.

Todos os procedimentos de raspagem dental foram realizados com curetas Gracey e McCall e limas Hirschfield e por ultrassom. Para os participantes dos dois grupos foi realizada a terapia de raspagem e aplainamento radicular (RAR) em 2 consultas com intervalo de 7 dias.

Os participantes receberam o enxaguatório bucal designado, copos dosadores para registrar o volume do enxaguatório usado e um diário para marcar o horário do enxague. O horário do uso do enxaguatório foi registrado no diário do participante da pesquisa.

3.9 Processamentos Laboratoriais – Amostras linguais

Extração do DNA genômico bacteriano

A extração do DNA genômico foi realizada com o kit PureLink™ Genomic DNA Purification (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Especificamente, para as bactérias Gram-positivas (*Streptococcus oralis* e *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*), o material foi previamente homogeneizado em agitador mecânico por 60 seg. e 500µL da amostra e centrifugados (15.000xg por 3 min.). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado (pellet), foram adicionados 180µl de *Lysozyme Digestion Buffer* (contendo lisozima). O tubo foi agitado em vórtex, incubado a 37°C por 30 min. Foram adicionados 20ul de *Proteinase K* e 200ul de *Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer*. Após homogeneização, o tubo foi incubado a 55°C por 30 min. Foram adicionados 200ul de etanol (96-100%) e novamente

homogeneizados. Ao término deste processo, todo o lisado (aproximadamente 640µl) foi transferido para uma coluna (contendo membrana de sílica - “*PureLink™ Spin Column*”) acoplado a um tubo de coleção, e este conjunto foi centrifugado à 10.000×g por 1 min. Em seguida, foram realizadas duas lavagens da membrana com 500µl de *Wash Buffer 1* (15.000×g por 1 minuto) e *Wash Buffer 2* (15.000×g por 3 min.). Finalmente, 100µl de *PureLink™ Genomic Elution Buffer* foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica.

Para as bactérias Gram-negativas (*Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e Carga total bacteriana), o material foi previamente homogeneizado em agitador mecânico por 60 seg. e 500µL da amostra foram centrifugados (15.000×g por 3 min.). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado (pellet), foram adicionados 180ul de *PureLink™ Genomic Digestion Buffer* e 20µl de *Proteinase K*. Cada tubo de 1,5ml foi incubado à 55°C por 90 min. Após estes procedimentos, 20µl de *RNAase A* foi adicionado ao lisado, esta solução foi agitada e incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 200µl de *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* e 200µl de etanol (99,5%) foram adicionados e o tubo agitado por 5 seg. até a formação de uma solução homogênea. Ao término deste processo, todo o lisado (aproximadamente 640µl) foi transferido para uma coluna (contendo membrana de sílica - “*PureLink™ Spin Column*”) acoplado a um tubo de coleção, e este conjunto foi centrifugado à 10.000× g por 1 min. Em seguida, foram realizadas duas lavagens da membrana com 500µl de *Wash Buffer 1* (15.000×g por 1 minuto) e *Wash Buffer 2* (15.000×g por 3 min.). Finalmente, 100µl de *PureLink™ Genomic Elution Buffer* foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica.

Também foi extraído o DNA de uma cultura pura de cada bactéria, em que as cepas de referência foram obtidas do Instituto FIOCRUZ. As amostras liofilizadas foram cultivadas e seu DNA extraído, a fim de obter uma curva padrão que foi usada posteriormente na qPCR. O DNA extraído dessa cultura pura foi quantificado no NanoDrop 2000 Spectrophotometer da Thermo

Scientific. Uma diluição seriada (até 107) foi realizada e o limite de detecção para 102 cópias com 95% de positividade ajustado.

Análise microbiana por qPCR

A qPCR foi empregada com o sistema de detecção *LuminoCt® SYBR® Green qPCR Ready Mix* (Sigma-Aldrich). A concentração dos *primers*, bem como, as condições ideais para que ocorra o processo de amplificação foram previamente estabelecidas para cada conjunto de *primers* incluído no estudo. A qPCR foi realizada no aparelho *7500 Fast Real-Time PCR System* da *Applied Biosystems*. Um ciclo inicial a 95°C por cinco min.; 40 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 72°C por um min.; e um ciclo final de 72°C por cinco min. A quantificação de *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e da Carga total bacteriana foi realizada por comparação do ciclo que cruza a linha de *threshold* (Ct), ou seja, ciclo no qual a fluorescência se torna detectável acima da fluorescência de fundo (*background*), e é inversamente proporcional ao logaritmo do número de moléculas iniciais alvo obtido das amostras com os valores de Ct determinados de uma curva padrão construída com amostras (concentrações) conhecidas de DNA. Controles positivo e negativo foram empregados no estudo, sendo que o controle negativo não possui amostra, apenas água ultrapura MilliUNI e o controle positivo constitui em uma análise de Carga Total de bactérias utilizando-se uma cepa Universal para bactérias em que todas as amostras foram submetidas.

Descrição dos *primers* que foram utilizados no estudo por qPCR

QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA LINGUAL

Microrganismo	Primer
Carga total bacteriana	F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R ATTACCGCGGCTGCTGG

<i>Veillonella atypica</i>	F TCTCTTTGGGAAGAATTAGAACGC R GTGTAACAAGGGAGTACGGACC
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	F TGGGTTTAAAGGGTGCCTAG R CAATCGGAGTTCCTCGTGAT
<i>Veillonella parvula</i>	F GAACGTTTGTTGCGTGCTATTTTTGGT R TCGTCGCCATTTTCACGGGTAA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F CCTTTACCCACCAACTACC R GGACGGGTGAGTAATGCTTG
<i>Streptococcus mutans</i>	F ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG R CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC
<i>Streptococcus oralis</i>	F ACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACC R ACCACCTGTACCTCTGTCCCG
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F CGCCCGTCACACCACGAGA R ACACCCTCGGAACATCCCTCCTTAC
<i>Actinomyces naeslundii</i>	F CTGCTGCTGACATCGCCGCTCGTA R TCCGCTCGCGCCACCTCTCGTTA

3.10 Processamentos Laboratoriais – Amostras salivares

Previamente à análise, as amostras de saliva foram descongeladas e centrifugadas (12.000rpm x 5 min./4°C). Após este procedimento o sobrenadante (500 µl), foi coletado e transferido para um mini tubo tipo eppendorf. A este sobrenadante, foi adicionado solução salina tamponada com fosfato (PBS) (relação de 1:1) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), PMSF (1mM) e coquetel inibidor de protease (1:1000). A concentração de proteína total salivar dos homogeneizados foi determinada pelo método do ácido bicinchonicic (BCA), utilizando o Kit reagente QuantiPro BCA da Sigma-Aldrich. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no leitor de microplacas FuoStar Optima (BMG Labtec) em 595 nm.

Para quantificação dos níveis de nitrito salivar foi utilizada metodologia previamente empregada por nosso grupo através do método colorimétrico de Griess (Green et al. 1982). O reagente de Griess foi preparado misturando-se

3,86 mmol/L de dihidrocloridrato de naftiletienodiano com 58,07 mmol/L de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico na proporção de 1:1. Um volume de 40µl da amostra salivar descongelada e diluída em água ultrapura entre 4 e 20 vezes foi incubada com 40µl do reagente Griess por 15 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540nm usando o leitor de microplacas de 96 poços BMG Labtech Optima FLUOstar. A curva padrão foi gerada com nitrito de sódio em concentrações variando de 2 a 100 µmol/L.

3.11 Análise Estatística

O nível de significância adotado no presente estudo foi de 0,05 (5%) e os intervalos de confiança construídos foi com 95% de confiança estatística.

Foram utilizados testes estatísticos não paramétricos, pois testou-se a normalidade das variáveis quantitativas de desfecho principal através do teste de Kolmogorov-Smirnov ($N < 100$) e concluiu-se que não houve distribuição de normalidade assegurada.

Os resultados foram comparados entre os Grupos Controle (GC) e Teste (GT) para todos os parâmetros, onde para isso foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Essa comparação foi realizada para cada tempo analítico.

Nesta análise estatística foram utilizados os softwares: SPSS V26 (2019), Minitab 21.2 (2022) e Excel Office 2010.

Observações:

p-valores considerados estatisticamente significativos perante o nível de significância adotado.

p-valores que por estarem próximos do limite de aceitação, são considerados que tendem a ser significativos (até 5 pontos percentuais acima do valor do alfa adotado).

4. RESULTADOS

Tabela 1: Descrição dos dados demográficos da população incluída no estudo.

Dados demográficos		
Gênero	50% Homens	50% Mulheres
Idade	52,5% 18 a 45 anos	47,5% Acima de 45 anos
Diagnóstico	22,5% Gengivite	77,5% Periodontite

Tabela 2: Distribuição comparativa dos valores médios dos parâmetros clínicos periodontais entre os grupos teste e controle no tempo 1 (inicial) e tempo 2 (3 meses).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
IPV	Tempo 1	GC	0,534	0,536	0,211	0,808
		GT	0,526	0,551	0,260	
	Tempo 2	GC	0,102	0,103	0,082	0,937
		GT	0,144	0,089	0,173	
ISG	Tempo 1	GC	0,490	0,565	0,206	0,697
		GT	0,475	0,472	0,235	

	Tempo 2	GC	0,169	0,116	0,153	0,071	0,447
		GT	0,198	0,145	0,175	0,081	
PS	Tempo 1	GC	2,513	2,556	0,362	0,155	0,789
		GT	2,730	2,376	0,729	0,305	
	Tempo 2	GC	2,342	2,263	0,478	0,221	0,164
		GT	2,660	2,417	0,720	0,333	
NCI	Tempo 1	GC	3,130	2,845	0,795	0,340	0,671
		GT	3,342	2,739	1,489	0,622	
	Tempo 2	GC	2,956	2,787	0,974	0,450	0,613
		GT	3,339	2,476	1,641	0,758	

IPV = Índice de placa visível

ISG = Índice de sangramento gengival

PS = Profundidade de sondagem

NCI = Nível clínico de inserção

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 3: Distribuição comparativa dos valores médios dos parâmetros periodontais entre os tempos 1 (inicial) e tempo 2 (3 meses).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor	
IPV	GC	Tempo 1	0,534	0,536	0,211	0,090	
		Tempo 2	0,102	0,103	0,082	0,038	
	GT	Tempo 1	0,526	0,551	0,260	0,109	<0,001
		Tempo 2					

	Tempo 2	0,144	0,089	0,173	0,080	
ISG	Tempo 1	0,490	0,565	0,206	0,088	<0,001
	Tempo 2	0,169	0,116	0,153	0,071	
	Tempo 1	0,475	0,472	0,235	0,098	<0,001
	Tempo 2	0,198	0,145	0,175	0,081	
PS	Tempo 1	2,513	2,556	0,362	0,155	0,237
	Tempo 2	2,342	2,263	0,478	0,221	
	Tempo 1	2,730	2,376	0,729	0,305	0,625
	Tempo 2	2,660	2,417	0,720	0,333	
NCI	Tempo 1	3,130	2,845	0,795	0,340	0,406
	Tempo 2	2,956	2,787	0,974	0,450	
	Tempo 1	3,342	2,739	1,489	0,622	0,683
	Tempo 2	3,339	2,476	1,641	0,758	

IPV = Índice de placa visível

ISG = Índice de sangramento gengival

PS = Profundidade de sondagem

NCI = Nível clínico de inserção

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 4: Distribuição comparativa dos valores médios de pressão arterial entre os grupos teste e controle nos tempos inicial, 7 e 14 dias e 3 meses.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Inicial	GC	22,25	22,00	3,20	1,44	0,776
	GT	22,41	23,10	3,34	1,43	
7 dias	GC	22,90	22,55	3,17	1,42	0,328
	GT	22,20	21,65	2,76	1,24	
14 dias	GC	22,54	22,68	2,46	1,13	0,494
	GT	21,99	22,15	2,70	1,22	
3 meses	GC	22,58	22,60	2,52	1,27	1,000
	GT	22,71	22,60	2,70	1,29	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 5: Distribuição comparativa dos valores médios de nitrito (ml e mg) entre os grupos teste e controle.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor	
Nitrito ml	T1	GC	15,56	15,86	6,17	3,65	0,068
		GT	20,94	18,77	8,46	4,60	
	T2	GC	19,57	16,12	7,63	4,51	0,818

	GT	20,73	19,87	9,04	5,34		
Nitrito mg	T3	GC	19,20	17,59	10,01	4,90	0,207
		GT	21,78	21,32	8,01	3,81	
	T1	GC	4,70	3,37	2,86	1,69	0,067
		GT	6,27	6,27	1,90	1,04	
	T2	GC	8,06	6,49	4,78	2,83	0,768
		GT	8,04	7,59	3,71	2,19	
T3	GC	6,08	4,63	4,16	2,04	0,195	
	GT	6,96	7,18	2,84	1,35		

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 6: Distribuição comparativa dos valores médios de pressão arterial entre os tempos 1 (inicial), 7, 14 dias e 3 meses.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
GC	Baseline	22,25	22,00	3,20	1,44	0,724
	7 dias	22,90	22,55	3,17	1,42	
	14 dias	22,54	22,68	2,46	1,13	
	3 meses	22,58	22,60	2,52	1,27	
GT	Baseline	22,41	23,10	3,34	1,43	0,860
	7 dias	22,20	21,65	2,76	1,24	
	14 dias	21,99	22,15	2,70	1,22	
	3 meses	22,71	22,60	2,70	1,29	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 7: Distribuição comparativa dos valores médios de nitrito (ml e mg) entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Nitrito ml	T1	15,56	15,86	6,17	3,65	
	GC T2	19,57	16,12	7,63	4,51	0,435
	T3	19,20	17,59	10,01	4,90	
	T1	20,94	18,77	8,46	4,60	
	GT T2	20,73	19,87	9,04	5,34	0,857
	T3	21,78	21,32	8,01	3,81	
Nitrito mg	T1	4,70	3,37	2,86	1,69	
	GC T2	8,06	6,49	4,78	2,83	0,190
	T3	6,08	4,63	4,16	2,04	
	T1	6,27	6,27	1,90	1,04	
	GT T2	8,04	7,59	3,71	2,19	0,524
	T3	6,96	7,18	2,84	1,35	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

As tabelas 8 a 15 mostram os resultados referentes a quantificação bacteriana expressas por reação em cadeia da polimerase (PCR) quando das coletas subgengivais (cone), do dorso da língua (língua) e da saliva (saliva) entre os grupos nos tempos inicial (T1), 14 dias (T2) e 3 meses (T3) por meio do teste de Mann-Whitney.

Tabela 8: Distribuição comparativa dos valores médios de *Streptococcus oralis* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	624,4	647,1	72,8	31,2	0,923
		GT	628,3	612,8	66,6	27,8	
	T2	GC	660,1	672,3	51,0	22,9	0,866
		GT	659,4	659,0	75,6	33,1	
	T3	GC	618,5	606,3	56,2	26,0	0,164
		GT	645,6	636,6	65,4	30,2	
Língua	T1	GC	580,8	586,7	102,9	43,0	0,054
		GT	629,3	648,4	74,5	31,1	
	T2	GC	645,4	642,4	58,7	26,4	0,715
		GT	627,9	640,4	83,5	36,6	
	T3	GC	571,1	577,5	70,8	32,7	0,025
		GT	619,7	625,0	50,5	22,7	
Saliva	T1	GC	456,2	449,5	63,9	28,0	0,050
		GT	496,4	505,8	57,9	24,8	
	T2	GC	479,0	481,0	59,1	25,9	0,030
		GT	516,7	514,5	60,4	26,5	
	T3	GC	443,3	443,8	44,4	20,5	0,164
		GT	465,0	476,4	43,8	20,3	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 9: Distribuição comparativa dos valores médios de *Porphyromonas gingivalis* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	698,6	648,0	169,7	85,9	0,841
		GT	682,2	665,8	134,2	58,8	
	T2	GC	809,8	803,6	158,5	71,3	0,105
		GT	726,5	758,9	153,0	68,8	
	T3	GC	658,6	654,7	115,3	54,8	0,575
		GT	687,6	670,9	136,0	62,8	
Língua	T1	GC	754,6	760,9	82,8	34,6	0,110
		GT	800,7	806,8	96,1	40,2	
	T2	GC	819,6	827,3	57,6	25,9	0,216
		GT	832,6	870,0	105,0	46,0	
	T3	GC	772,5	765,0	74,4	34,4	0,236
		GT	801,0	798,5	72,4	32,5	
Saliva	T1	GC	558,8	551,8	219,1	110,9	0,129
		GT	632,7	658,1	116,7	53,9	
	T2	GC	617,7	564,0	148,4	75,1	0,049
		GT	708,6	689,9	148,3	65,0	
	T3	GC	556,4	569,3	134,5	63,9	0,817
		GT	518,1	579,9	168,4	77,8	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 10: Distribuição comparativa dos valores médios de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	608,9	602,4	96,5	41,3	0,846
		GT	603,8	615,1	73,5	30,7	
	T2	GC	658,7	653,7	94,1	42,3	0,286
		GT	622,7	637,3	104,1	45,6	
	T3	GC	597,8	594,8	93,7	44,6	0,766
		GT	609,0	615,9	67,5	31,2	
Língua	T1	GC	587,3	566,9	71,9	30,7	0,124
		GT	614,0	634,2	94,0	41,2	
	T2	GC	624,0	620,8	109,1	49,0	0,300
		GT	590,6	566,7	67,1	30,2	
	T3	GC	590,8	600,0	51,5	23,8	0,083
		GT	626,7	658,5	75,9	34,1	
Saliva	T1	GC	520,9	524,2	36,7	16,1	0,230
		GT	508,8	541,4	121,5	52,0	
	T2	GC	522,5	547,4	93,5	41,0	0,871
		GT	536,2	532,6	54,3	23,8	
	T3	GC	494,2	498,5	108,5	50,1	0,947
		GT	489,4	496,5	109,4	52,0	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 11: Distribuição comparativa dos valores médios de *Actinomyces naeslundii* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	769,2	758,3	72,3	30,9	0,981
		GT	763,8	776,3	68,7	28,7	
	T2	GC	781,2	773,8	61,2	27,5	0,354
		GT	797,7	803,3	68,3	29,9	
	T3	GC	736,4	729,4	47,7	22,1	0,704
		GT	742,5	743,0	57,3	26,5	
Língua	T1	GC	870,8	860,0	85,2	35,6	0,496
		GT	881,8	876,0	50,3	21,0	
	T2	GC	874,1	872,3	67,6	30,4	0,694
		GT	881,9	889,9	86,1	37,7	
	T3	GC	846,5	842,3	89,0	41,1	0,121
		GT	885,1	907,4	68,8	30,9	
Saliva	T1	GC	640,9	666,2	138,3	60,6	0,241
		GT	684,6	705,8	99,5	42,6	
	T2	GC	692,2	686,5	64,9	28,4	0,152
		GT	722,7	728,0	76,3	33,5	
	T3	GC	665,8	661,8	92,2	42,6	0,874
		GT	641,8	687,5	147,0	67,9	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 12: Distribuição comparativa dos valores médios de *Fusobacterium nucleatum* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	576,5	557,9	93,2	39,9	0,942
		GT	573,4	552,3	69,3	29,0	
	T2	GC	630,1	649,0	71,7	32,3	0,736
		GT	634,8	594,7	132,2	58,0	
	T3	GC	566,1	545,2	118,6	54,8	0,569
		GT	600,6	574,6	124,4	57,5	
Língua	T1	GC	634,4	645,5	117,2	49,0	0,116
		GT	687,6	684,7	122,7	51,3	
	T2	GC	700,3	719,9	65,3	29,4	0,822
		GT	683,3	713,9	120,2	52,7	
	T3	GC	674,2	666,9	87,2	40,3	0,429
		GT	689,1	680,8	72,1	32,4	
Saliva	T1	GC	440,3	444,4	101,4	44,4	0,072
		GT	485,8	514,8	129,2	55,3	
	T2	GC	445,2	485,6	131,9	57,8	0,040
		GT	523,0	557,9	138,1	60,5	
	T3	GC	438,2	431,7	116,2	53,7	0,535
		GT	440,5	516,7	169,9	83,2	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 13: Distribuição comparativa dos valores médios de *Veillonella atypica* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	679,2	699,2	87,1	37,3	0,481
		GT	693,6	712,2	80,8	33,8	
	T2	GC	687,3	732,3	91,5	41,1	0,888
		GT	683,8	730,4	95,2	41,7	
	T3	GC	723,5	733,3	78,4	36,2	0,076
		GT	771,8	762,5	76,7	35,4	
Língua	T1	GC	774,9	764,8	77,0	32,2	0,542
		GT	778,5	773,1	47,1	19,7	
	T2	GC	812,7	789,4	73,9	33,2	0,238
		GT	783,7	776,7	75,0	32,9	
	T3	GC	794,7	786,4	42,4	19,6	0,395
		GT	799,1	809,3	48,6	21,9	
Saliva	T1	GC	740,9	743,2	100,9	44,2	0,549
		GT	717,8	712,8	82,2	35,1	
	T2	GC	644,2	717,8	214,2	93,9	0,358
		GT	713,3	768,7	151,0	66,2	
	T3	GC	718,4	745,3	86,7	41,2	0,121
		GT	779,4	764,3	72,6	33,5	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 14: Distribuição comparativa dos valores médios de *Veillonella parvula* entre os grupos teste e controle.

VP			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	637,4	648,4	47,7	20,4	0,627
		GT	634,1	630,0	51,2	21,4	
	T2	GC	649,5	648,9	35,2	15,8	0,736
		GT	644,7	662,1	61,1	26,8	
	T3	GC	653,5	654,3	33,7	15,6	0,613
		GT	657,2	675,0	46,2	21,3	
Língua	T1	GC	643,4	660,7	38,5	16,1	0,113
		GT	654,7	664,7	46,9	20,6	
	T2	GC	668,1	670,5	16,2	7,3	0,953
		GT	656,6	667,0	74,0	33,3	
	T3	GC	656,7	658,7	26,7	12,3	0,191
		GT	665,3	672,5	32,7	14,7	
Saliva	T1	GC	487,3	561,6	181,5	79,6	0,076
		GT	574,9	625,3	141,1	60,4	
	T2	GC	474,5	515,7	191,9	86,3	0,757
		GT	501,4	588,0	179,1	78,5	
	T3	GC	502,7	549,2	146,6	67,7	0,409
		GT	520,1	589,4	155,3	73,8	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 15: Distribuição comparativa dos valores médios de *Streptococcus mutans* entre os grupos teste e controle.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	GC	572,7	584,2	21,0	9,0	0,716

	GT	571,8	570,6	18,9	7,9		
	T2	GC	567,8	575,8	23,2	10,4	0,354
		GT	575,9	574,7	15,1	6,6	
	T3	GC	564,5	567,8	36,6	17,4	0,843
		GT	572,6	568,3	22,3	10,3	
Língua	T1	GC	552,2	549,0	18,8	7,9	0,944
		GT	552,8	548,5	18,3	7,6	
	T2	GC	553,2	549,5	16,8	7,5	0,574
		GT	555,0	551,5	14,9	6,5	
	T3	GC	562,0	553,0	25,5	11,8	0,447
		GT	565,8	568,1	18,7	8,4	
Saliva	T1	GC	514,2	556,9	129,1	56,6	0,220
		GT	572,8	562,8	58,2	24,9	
	T2	GC	563,1	573,1	92,4	40,5	0,808
		GT	552,9	576,2	89,8	39,3	
	T3	GC	534,4	563,0	102,3	47,2	1,000
		GT	541,6	554,2	115,0	53,1	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Por fim, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os tempos, por grupo em relação as bactérias incluídas no estudo.

Tabela 16: Distribuição comparativa dos valores médios de *Streptococcus oralis* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone		T1	624,4	647,1	72,8	31,2	
	GC	T2	660,1	672,3	51,0	22,9	0,052
		T3	618,5	606,3	56,2	26,0	
		T1	628,3	612,8	66,6	27,8	
	GT	T2	659,4	659,0	75,6	33,1	0,316
		T3	645,6	636,6	65,4	30,2	
Língua		T1	580,8	586,7	102,9	43,0	
	GC	T2	645,4	642,4	58,7	26,4	0,011
		T3	571,1	577,5	70,8	32,7	
		T1	629,3	648,4	74,5	31,1	
	GT	T2	627,9	640,4	83,5	36,6	0,657
		T3	619,7	625,0	50,5	22,7	
Saliva		T1	456,2	449,5	63,9	28,0	
	GC	T2	479,0	481,0	59,1	25,9	0,213
		T3	443,3	443,8	44,4	20,5	
		T1	496,4	505,8	57,9	24,8	
	GT	T2	516,7	514,5	60,4	26,5	0,020
		T3	465,0	476,4	43,8	20,3	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 17: P-valores da tabela 16 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,072	
		T3	0,652	0,019
		<hr/>		
	GT	T2	0,174	
		T3	0,265	0,579
		<hr/>		
Língua	GC	T2	0,023	
		T3	0,724	0,004
		<hr/>		
	GT	T2	0,669	
		T3	0,433	0,465
		<hr/>		
Saliva	GC	T2	0,291	
		T3	0,559	0,075
		<hr/>		
	GT	T2	0,322	
		T3	0,059	0,007
		<hr/>		

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 18: Distribuição comparativa dos valores médios de *Porphyromonas gingivalis* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	GC	T1	698,6	648,0	169,7	85,9	
		T2	809,8	803,6	158,5	71,3	0,010
		T3	658,6	654,7	115,3	54,8	
	<hr/>						
	GT	T1	682,2	665,8	134,2	58,8	
		T2	726,5	758,9	153,0	68,8	0,607
T3		687,6	670,9	136,0	62,8		
<hr/>							
Língua	GC	T1	754,6	760,9	82,8	34,6	0,010

	T2	819,6	827,3	57,6	25,9		
	T3	772,5	765,0	74,4	34,4		
	T1	800,7	806,8	96,1	40,2		
GT	T2	832,6	870,0	105,0	46,0	0,265	
	T3	801,0	798,5	72,4	32,5		
Saliva	T1	558,8	551,8	219,1	110,9		
	GC	T2	617,7	564,0	148,4	75,1	0,705
		T3	556,4	569,3	134,5	63,9	
	T1	632,7	658,1	116,7	53,9		
GT	T2	708,6	689,9	148,3	65,0	0,007	
	T3	518,1	579,9	168,4	77,8		

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 19: P-valores da tabela 18 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,031	
		T3	0,719	0,003
	GT	T2	0,369	
		T3	0,815	0,429
Língua	GC	T2	0,005	
		T3	0,644	0,018
	GT	T2	0,190	
		T3	0,958	0,129
Saliva	GC	T2	0,406	
		T3	0,746	0,610

	T2	0,161	
GT	T3	0,043	0,003

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 20: Distribuição comparativa dos valores médios de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	608,9	602,4	96,5	41,3	
	GC T2	658,7	653,7	94,1	42,3	0,150
	T3	597,8	594,8	93,7	44,6	
	T1	603,8	615,1	73,5	30,7	
	GT T2	622,7	637,3	104,1	45,6	0,862
	T3	609,0	615,9	67,5	31,2	
Língua	T1	587,3	566,9	71,9	30,7	
	GC T2	624,0	620,8	109,1	49,0	0,418
	T3	590,8	600,0	51,5	23,8	
	T1	614,0	634,2	94,0	41,2	
	GT T2	590,6	566,7	67,1	30,2	0,292
	T3	626,7	658,5	75,9	34,1	
Saliva	T1	520,9	524,2	36,7	16,1	
	GC T2	522,5	547,4	93,5	41,0	0,123
	T3	494,2	498,5	108,5	50,1	
	GT T1	508,8	541,4	121,5	52,0	0,229

	T2	536,2	532,6	54,3	23,8
	T3	489,4	496,5	109,4	52,0

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 21: P-valores da tabela 20 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,091	
		T3	0,918	0,096
	GT	T2	0,597	
		T3	0,913	0,704
Língua	GC	T2	0,273	
		T3	0,693	0,248
	GT	T2	0,273	
		T3	0,574	0,140
Saliva	GC	T2	0,194	
		T3	0,188	0,079
	GT	T2	1,000	
		T3	0,131	0,135

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 22: Distribuição comparativa dos valores médios de *Actinomyces naeslundii* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

			Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	GC	T1	769,2	758,3	72,3	30,9	0,086

	T2	781,2	773,8	61,2	27,5		
	T3	736,4	729,4	47,7	22,1		
	T1	763,8	776,3	68,7	28,7		
GT	T2	797,7	803,3	68,3	29,9	0,041	
	T3	742,5	743,0	57,3	26,5		
Língua	T1	870,8	860,0	85,2	35,6		
	GC	T2	874,1	872,3	67,6	30,4	0,476
		T3	846,5	842,3	89,0	41,1	
	T1	881,8	876,0	50,3	21,0		
	GT	T2	881,9	889,9	86,1	37,7	0,981
		T3	885,1	907,4	68,8	30,9	
Saliva	T1	640,9	666,2	138,3	60,6		
	GC	T2	692,2	686,5	64,9	28,4	0,576
		T3	665,8	661,8	92,2	42,6	
	T1	684,6	705,8	99,5	42,6		
	GT	T2	722,7	728,0	76,3	33,5	0,134
		T3	641,8	687,5	147,0	67,9	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 23: P-valores da tabela 22 - Comparações entre os tempos dois a dois.

		T1	T2	
Cone	GC	T2	0,524	
		T3	0,143	0,027
	GT	T2	0,151	
		T3	0,277	0,011
Língua	GC	T2	0,875	

		T3	0,355	0,236
	GT	T2	0,801	
		T3	0,937	0,955
Saliva	GC	T2	0,372	
		T3	0,884	0,365
	GT	T2	0,262	
		T3	0,297	0,054

GC = Grupo controle
GT = Grupo teste

Tabela 24: Distribuição comparativa dos valores médios de *Fusobacterium nucleatum* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor	
Cone	T1	576,5	557,9	93,2	39,9		
	GC	T2	630,1	649,0	71,7	32,3	0,042
		T3	566,1	545,2	118,6	54,8	
	GT	T1	573,4	552,3	69,3	29,0	
		T2	634,8	594,7	132,2	58,0	0,387
	T3	600,6	574,6	124,4	57,5		
Língua	T1	634,4	645,5	117,2	49,0		
	GC	T2	700,3	719,9	65,3	29,4	0,120
		T3	674,2	666,9	87,2	40,3	
	GT	T1	687,6	684,7	122,7	51,3	0,880
		T2	683,3	713,9	120,2	52,7	

	T3	689,1	680,8	72,1	32,4		
	T1	440,3	444,4	101,4	44,4		
Saliva	GC	T2	445,2	485,6	131,9	57,8	0,870
		T3	438,2	431,7	116,2	53,7	
		T1	485,8	514,8	129,2	55,3	
	GT	T2	523,0	557,9	138,1	60,5	0,162
		T3	440,5	516,7	169,9	83,2	

GC = Grupo controle
GT = Grupo teste
IC = Intervalo de confiança

Tabela 25: P-valores da tabela 24 - Comparações entre os tempos dois a dois.

		T1	T2	
Cone	GC	T2	0,053	
		T3	0,592	0,019
	GT	T2	0,174	
		T3	0,744	0,365
	Língua	GC	T2	0,044
			T3	0,328
GT		T2	0,880	
		T3	0,917	0,518
Saliva	GC	T2	0,705	
		T3	0,726	0,640
	GT	T2	0,137	
		T3	0,624	0,086

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 26: Distribuição comparativa dos valores médios de *Veillonella atypica* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	679,2	699,2	87,1	37,3	
	GC T2	687,3	732,3	91,5	41,1	0,570
	T3	723,5	733,3	78,4	36,2	
	T1	693,6	712,2	80,8	33,8	
	GT T2	683,8	730,4	95,2	41,7	0,023
	T3	771,8	762,5	76,7	35,4	
Língua	T1	774,9	764,8	77,0	32,2	
	GC T2	812,7	789,4	73,9	33,2	0,064
	T3	794,7	786,4	42,4	19,6	
	T1	778,5	773,1	47,1	19,7	
	GT T2	783,7	776,7	75,0	32,9	0,312
	T3	799,1	809,3	48,6	21,9	
Saliva	T1	740,9	743,2	100,9	44,2	
	GC T2	644,2	717,8	214,2	93,9	0,454
	T3	718,4	745,3	86,7	41,2	
	T1	717,8	712,8	82,2	35,1	
	GT T2	713,3	768,7	151,0	66,2	0,157
	T3	779,4	764,3	72,6	33,5	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 27: P-valores da tabela 26 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,924	
		T3	0,272	0,466
	GT	T2	0,650	
		T3	0,016	0,019
Língua	GC	T2	0,047	
		T3	0,047	0,738
	GT	T2	0,860	
		T3	0,143	0,249
Saliva	GC	T2	0,245	
		T3	0,670	0,377
	GT	T2	0,676	
		T3	0,037	0,279

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 28: Distribuição comparativa dos valores médios de *Veillonella parvula* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

VP	Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor	
Cone	T1	637,4	648,4	47,7	20,4	
	GC	T2	649,5	648,9	35,2	15,8
		T3	653,5	654,3	33,7	15,6
	GT	T1	634,1	630,0	51,2	21,4
						0,351

		T2	644,7	662,1	61,1	26,8	
		T3	657,2	675,0	46,2	21,3	
		T1	643,4	660,7	38,5	16,1	
Língua	GC	T2	668,1	670,5	16,2	7,3	0,056
		T3	656,7	658,7	26,7	12,3	
		T1	654,7	664,7	46,9	20,6	
Língua	GT	T2	656,6	667,0	74,0	33,3	0,794
		T3	665,3	672,5	32,7	14,7	
		T1	487,3	561,6	181,5	79,6	
Saliva	GC	T2	474,5	515,7	191,9	86,3	0,986
		T3	502,7	549,2	146,6	67,7	
		T1	574,9	625,3	141,1	60,4	
Saliva	GT	T2	501,4	588,0	179,1	78,5	0,154
		T3	520,1	589,4	155,3	73,8	

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 29: P-valores da tabela 28 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,636	
		T3	0,517	0,715
	GT	T2	0,351	
		T3	0,157	0,640
Língua	GC	T2	0,015	
		T3	0,505	0,145
	GT	T2	0,800	
		T3	0,465	0,759
Saliva	GC	T2	0,978	
		T3	0,792	0,903

GT	T2	0,112	
	T3	0,086	0,831

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Tabela 30: Distribuição comparativa dos valores médios de *Streptococcus mutans* entre os tempos 1 (inicial), tempo 2 (14 dias) e tempo 3 (90 dias).

		Média	Mediana	Desvio Padrão	IC	P-valor
Cone	T1	572,7	584,2	21,0	9,0	
	GC T2	567,8	575,8	23,2	10,4	0,864
	T3	564,5	567,8	36,6	17,4	
	T1	571,8	570,6	18,9	7,9	
	GT T2	575,9	574,7	15,1	6,6	0,776
	T3	572,6	568,3	22,3	10,3	
Língua	T1	552,2	549,0	18,8	7,9	
	GC T2	553,2	549,5	16,8	7,5	0,433
	T3	562,0	553,0	25,5	11,8	
	T1	552,8	548,5	18,3	7,6	
	GT T2	555,0	551,5	14,9	6,5	0,043
	T3	565,8	568,1	18,7	8,4	
Saliva	T1	514,2	556,9	129,1	56,6	
	GC T2	563,1	573,1	92,4	40,5	0,466
	T3	534,4	563,0	102,3	47,2	
	GT T1	572,8	562,8	58,2	24,9	0,851

	T2	552,9	576,2	89,8	39,3
	T3	541,6	554,2	115,0	53,1

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

IC = Intervalo de confiança

Tabela 31: P-valores da tabela 30 - Comparações entre os tempos dois a dois.

			T1	T2
Cone	GC	T2	0,524	
		T3	0,826	0,962
	GT	T2	0,497	
		T3	0,935	0,599
Língua	GC	T2	0,754	
		T3	0,201	0,378
	GT	T2	0,420	
		T3	0,021	0,060
Saliva	GC	T2	0,224	
		T3	0,770	0,413
	GT	T2	0,876	
		T3	0,573	0,704

GC = Grupo controle

GT = Grupo teste

Assim, nas tabelas pares temos as estatísticas descritivas e a comparação dos tempos (teste de Kruskal-Wallis). Já nas tabelas ímpares estão expressos os p-valores das comparações entre os tempos dois a dois (teste de Mann-Whitney). Nestas tabelas pares basta cruzar a linha com a coluna para encontrar o p-valor necessário.

5. DISCUSSÃO

O biofilme dental é a principal causa de várias doenças bucais, como cárie e periodontite. Logo, há uma grande demanda por estratégias preventivas e terapêuticas, como o uso de agentes químicos para o controle do biofilme dental.

Dentre os enxaguatórios bucais disponíveis destaca-se a clorexidina, um antisséptico bucal eficaz por suas propriedades antimicrobianas e quando utilizada de forma racional pode ser uma ferramenta importante no controle da doença periodontal.

Por outro lado, há na literatura uma frequente discussão sobre o uso de enxaguatórios bucais e aos possíveis impactos sistêmicos que seu uso frequente poderia acarretar, principalmente em relação as alterações na pressão arterial. Essa relação se baseia no fato de que enxaguatórios bucais podem afetar a concentração oral de bactérias redutoras e, assim, influenciar o metabolismo do NO₃. Os dados disponíveis sobre esta relação parecem ser ainda discordantes, ou seja, os estudos conduzidos por Bondonno et al (2015); Mc Donagh et al (2015) e Woessner et al (2016) descreveram uma ação negativa significativa de bochechos na concentração plasmática de nitrito ($p < 0,05$), enquanto o estudo de Sundqvist et al (2016) concluíram que em mulheres jovens e saudáveis, o uso de clorexidina foi eficaz em interromper a conversão bucal de nitrato bacteriano em nitrito, mas isso não foi associado a alterações no nitrito plasmático ou no níveis de PA. Estudos em modelo animal (Petersson et al. 2009) ou em humanos (Kapil et al. 2013) mostraram que a diminuição das enzimas bacterianas redutoras de nitrato acarretada pelo uso de clorexidina se correlacionou com a diminuição dos níveis de nitrito bucal na ordem de 90% em humanos, além de diminuição plasmática de 25% e aumento da PA entre 2 e 3.5mmHg. Ou seja, o uso de clorexidina reduziu os níveis de nitrito oral e plasmático e resultou em um aumento sustentado da PA em humanos. Já para enxaguante bucais a base de óleos essenciais e iodo povidona estes não provocaram efeito na atividade redutora de nitrato (Mitsui et al. 2017).

Desta forma, neste estudo nos propusemos investigar se a terapia periodontal associada ao uso de clorexidina poderia impactar na frequência

bacteriana bucal e assim interferir na redução de nitrito e conseqüentemente na alteração da PA em indivíduos sistemicamente saudáveis com diagnóstico de doença periodontal, gengivite ou periodontite.

Foram incluídos 40 indivíduos no estudo, diagnosticados com doença periodontal, divididos em 2 grupos baseados na história pregressa do uso regular de bochechos a base de clorexidina. Os participantes do grupo RAR (controle) eram não usuários de enxaguatórios bucais de qualquer tipo enquanto o grupo RAR (clorexidina) já faziam uso rotineiro de enxaguatórios bucais. Esta decisão foi tomada com o intuito de facilitar a aderência dos participantes ao grupo clorexidina uma vez que a partir dos exames basais e procedimentos de raspagem dental estes utilizaram, sob rígido controle dos investigadores, bochechos de clorexidina duas vezes ao dia por 14 dias ininterruptos controlando quantidade e tempo de uso do produto.

Os principais resultados observados neste estudo mostraram que dentre os parâmetros clínicos investigados, IPV, ISG, PS e NCI não houve diferença estatística entre os grupos controle e teste analisados entre os tempos basal e 3 meses pós terapia. Todavia, quando da análise na evolução temporal existiu diferença estatística entre os tempos basal e 3 meses para ambos os grupos em apenas dois índices IPV e ISG. Já para os parâmetros PS e NCI não houve diferença estatística. Os parâmetros IPV e ISG reduziram em ambos os grupos mostrando que os métodos de instrução de higiene bucal recebidos pelos pacientes no início do estudo foram eficazes ao longo dos 3 meses, todavia a inclusão da clorexidina não interferiu no nosso achado.

Há uma vasta literatura relacionando a condição periodontal com PA (Hansen et al. 2022; Pignatelli et al. 2020; Desvarieux et al. 2010; Tsakos et al. 2010). De acordo com Del Pinto et al. (2021) existe uma justificativa para a avaliação do estado de saúde bucal e do perfil da PA na presença de hipertensão ou periodontite. Além de seus benefícios comprovados no perfil da PA, uma dieta com baixo teor de sal pode ser benéfica também para o estado de saúde periodontal e, a manutenção de uma boa condição periodontal pode se estender a benefícios do perfil da PA.

Como já mencionado a clorexidina apresenta propriedades antimicrobianas eficazes no combate ao biofilme e representa uma ferramenta

importante no controle da doença periodontal, todavia, de acordo com Govoni et al. (2008) o uso duas vezes ao dia de clorexidina a 0,2% por 7 dias reduziu a liberação salivar de NO em quase 50%, aumentando a pressão arterial sistólica e diastólica em 2 a 3,5 mmHg. Já o estudo de Mitsui et al. (2017) o uso diário de clorexidina, mesmo em baixa concentração de 0,0025%, pode reduzir a contagem de *Veillonella dispar* e inibir a atividade redutora de nitrato, mas não afetou a produção salivar de nitrito. Os óleos essenciais e o enxaguatório bucal com iodopovidona demonstraram ter pouco efeito na atividade redutora de nitrato. Em função destes achados nos propusemos a avaliar além da frequência das espécies *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* também o perfil de PA e disponibilidade de nitrito salivar.

A tabela 4 mostra os resultados referentes a PA entre os grupos nos tempos inicial, 7, 14 dias e 3 meses. A tabela 5 mostra os resultados referentes a nitrito (ml e mg) entre os grupos nos tempos inicial (T1), 14 dias (T2) e 3 meses (T3) e concluímos que não houve diferença estatística. Observamos ainda nas tabelas 6 e 7 se havia diferença entre os tempos, em ambos os grupos. Destes dados concluímos então que o grupo teste e controle foram similares não havendo diferença estatisticamente significativa nos valores de PA e nitrito no período de avaliação.

De acordo com a revisão sistemática conduzida por Zhurakivska et al. (2019) as espécies redutoras de nitratos mais abundantes na superfície da língua são: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *P. melaninogenica*, *V. dispar*, *H. parainfluenzae*, *N. subflava*, *V. parvula*, *F. nucleatum subsp. nucleatum*, *C. concisus*, *L. buccalis*, *P. intermedia*. A porção posterior da língua pode acumular uma quantidade maior de biofilme do que outras áreas da mucosa bucal e as bactérias presentes no dorso posterior da língua são diferentes daqueles que proliferam nos dentes e na gengiva. Estas bactérias se assemelham mais ao microbioma da saliva (Human Microbiome Project Consortium Structure, 2012). Esta razão nos levou a investigar as bactérias presentes na língua e na saliva e por uma maior investigação da presença

bacteriana na cavidade bucal, investigamos ainda bactérias provenientes do sulco/bolsa periodontal.

Hyde et al. (2014) caracterizando o microbioma oral de ratos e os efeitos do nitrato na dieta destacaram que o nitrato presente na cavidade bucal é convertido em nitrito e NO também por *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Veillonella*. Então, NO é absorvido pela vasta vascularização sub epitelial ou através do trato gastrointestinal. Os autores observaram ainda que o microbioma da língua de rato é menos diverso do que o microbioma da língua humana, mas que a atividade fisiológica é comparável, pois a suplementação de nitrato de sódio reduziu significativamente a PA diastólica em ratos Wistar.

Bryan et al. (2017) numa revisão literária mostrando evidências da associação da microbiota bucal com a produção de óxido nítrico e a regulação da PA sistêmica identificou que as bactérias mais abundantes foram *Veillonella*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus* e *Actinomyces spp.*

Diante da diversidade microbiana presente na cavidade bucal nosso estudo selecionou espécies mais comumente encontradas na superfície da língua como *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* e *Fusobacterium* para relacionar com os desfechos PA e disponibilidade de nitrito além de espécies comumente presentes nos casos de doença periodontal como *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Nossos resultados mostraram que nas avaliações subgengivais, do dorso da língua e da saliva, nos tempos analisados, raras foram as situações em que se observou diferenças estatísticas significantes. Ou seja, o perfil microbiano se comportou de forma bastante similar entre os dois grupos.

Em um recente estudo publicado por Janket et al. (2023) os autores abordam que vários estudos associam o uso de enxaguatório bucal com a diminuição de bactérias produtoras de NO e com o aumento da PA, enquanto outros não encontraram qualquer alteração. O aumento da PA induzido pelo uso de enxaguatório bucal foi pequeno (2,3 mm Hg) mas estatisticamente significativo. Essa mudança no nível mínimo de PA sistólica pode ser devido à variação diurna, ingestão de sódio, estresse psicológico, consumo de café ou níveis de estrogênio. Os autores enfatizam que a maior falha entre os estudos ligando o uso de enxaguatório bucal e PA sistólica elevada é a de que nenhum

deles considerou a influência da produção endógena de NO, que contribui com mais de 80% da produção total de NO em humanos.

Em nosso estudo buscamos avaliar o padrão nutricional da população estudada por meio de questionários validados, todavia, a inconsistência de dados não nos permitiu inferir se o padrão de ingestão alimentar interferiu nos achados de PA.

Em suma, em relação ao desfecho clínico podemos considerar que os procedimentos de raspagem e alisamento radicular foram suficientes para a resolução dos problemas periodontais e a adição do controle químico no grupo teste não representou um ganho adicional.

Nossos achados mostraram ainda que o uso da clorexidina não interferiu na conversão de nitrato em nitrito nem tão pouco influenciou as alterações na PA.

6. CONCLUSÃO

A terapia periodontal não cirúrgica associada ao uso da clorexidina não influenciou a frequência bacteriana das espécies investigadas;

Os níveis de nitrito e PA não sofreram alterações ao longo do estudo;

A terapia periodontal foi eficaz independentemente do uso da clorexidina em ambos os grupos investigados.

Referências

1. Bretz WA, Weyant RJ, Corby PM, Ren D, Weissfeld L, Kritchevsky SB, et al. Systemic inflammatory markers, periodontal diseases, and periodontal infections in an elderly population. *J Am Geriatr Soc.* 2005; 53: 1532–1537.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics - update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127: e6-245.
3. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011]. Disponível em: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/.
4. Center for Disease Control and Prevention. Heart Disease and Stroke | At A Glance Reports | Publications | Chronic Disease Prevention and Health Promotion | CDC. <https://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/heart-diseasestroke.htm>. Accessed April 25, 2018.
5. Ministério da Saúde. Relatório aponta que número de adultos com hipertensão aumentou 3,7% em 15 anos no Brasil — Ministério da Saúde (2022) (www.gov.br). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/maio/relatorio-aponta-que-numero-de-adultos-com-hipertensao-aumentou-3-7-em-15-anos-no-brasil>
6. Desvarieux M, Demmer RT, Jacobs Jr DR, Rundek T, Boden-Albala B, Sacco RL, et al. Periodontal bacteria and hypertension: the oral infections and vascular disease epidemiology study (INVEST). *J Hypertens* 2010; 28: 1413-21.
7. Tsakos G, Sabbah W, Hingorani AD, Netuveli G, Donos N, Richard G, et al. Is periodontal inflammation associated with raised blood pressure? Evidence from a National US survey. *J Hypertens* 2010; 28: 2386-93.
8. World Health Organization. Raised Blood Pressure. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/. Accessed April 25, 2018.
9. Blot S. Antiseptic mouthwash, the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway, and hospital mortality: a hypothesis generating review. *Intensive Care Med.* 2021 Jan;47(1):28-38. doi: 10.1007/s00134-020-06276-z. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33067640; PMCID: PMC7567004.

10. Sobko T, Marcus C, Govoni M, Kamiya S. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2010 15; 22 (2): 136-40.
11. Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension*. 2011; 65 (2): 320-7.
12. Lundberg JO, Carlstrom M, Weitzberg E. Metabolic effects of dietary nitrate in health and disease. *Cell metabolism* 2018; 28 (1): 9-22.
13. Palmerini CA, Palombari R, Perito S, Arienti G (2003). NO synthesis in human saliva. *Free Radical Res*. 2003; 37: 29–31.
14. Mashima I, Kamaguchi A, Nakazawa F. The distribution and frequency of oral veillonella spp. in the tongue biofilm of healthy young adults. *Curr Microbiol*. 2011; 63 (5): 403-7.
15. Heasman PA, Seymour RA. Pharmacological control off periodontal disease. I. Antiplaque agents. *J Dent* 1994; 22: 323-335.
16. Rölla G and Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975; 54 Spec No B:B57-62.
17. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, Bescos R. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent*. 2021 Oct;113:103768. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103768. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418463.
18. Petersson J, Carlström M, Schreiber O, Phillipson M, Christoffersson G, Jägare A, et al. Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. *Free Radic. Biol. Med*. 2009; 46: 1068–1075
19. Kapil V, Haydar SMA, Pearl V, Lundberg JO, Weitzberg E, Ahluwalia A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free Radic. Biol. Med*. 2013; 55: 93–100.
20. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* 2018; 89 (1): S159-S172.

21. Green LC, Wagner DA., Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem* 1982; 126: 131-138.
22. Bondonno C.P., Liu A.H., Croft K.D., Considine M.J., Puddey I.B., Woodman R.J., Hodgson J.M. Antibacterial mouthwash blunts oral nitrate reduction and increases blood pressure in treated hypertensive men and women. *Am. J. Hypertens.* 2015;28:572–575. doi: 10.1093/ajh/hpu192.
23. McDonagh S.T.J., Wylie L.J., Winyard P.G., Vanhatalo A., Jones A.M. The Effects of Chronic Nitrate Supplementation and the Use of Strong and Weak Antibacterial Agents on Plasma Nitrite Concentration and Exercise Blood Pressure. *Int. J. Sports Med.* 2015;36:1177–1185. doi: 10.1055/s-0035-1554700.
24. Woessner M., Smoliga J.M., Tarzia B., Stabler T., Van Bruggen M., Allen J.D. A stepwise reduction in plasma and salivary nitrite with increasing strengths of mouthwash following a dietary nitrate load. *Nitric Oxide.* 2016;54:1–7. doi: 10.1016/j.niox.2016.01.002.
25. Sundqvist M.L., Lundberg J.O., Weitzberg E. Effects of antiseptic mouthwash on resting metabolic rate: A randomized, double-blind, crossover study. *Nitric Oxide.* 2016;61:38–44. doi: 10.1016/j.niox.2016.10.003.
26. Mitsui, T.; Harasawa, R. The effects of essential oil, povidone-iodine, and chlorhexidine mouthwash on salivary nitrate/nitrite and nitrate-reducing bacteria. *J. Oral Sci.* 2017, 59, 597–601.
27. Hansen PR, Holmstrup P. Cardiovascular Diseases and Periodontitis. 1. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1373:261-280. doi: 10.1007/978-3-030-96881-6_14.
28. Pignatelli P, Fabietti G, Ricci A, Piattelli A, Curia MC. How Periodontal Disease and Presence of Nitric Oxide Reducing Oral Bacteria Can Affect Blood Pressure. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 13;21(20):7538. doi: 10.3390/ijms21207538.

- 29.** Del Pinto R, Landi L, Grassi G, Sforza NM, Cairo F, Citterio F, Paolantoni G, D'Aiuto F, Ferri C, Monaco A, Pietropaoli D; Italian working group on Hypertension, Periodontitis (Hy-Per Group). Hypertension and Periodontitis: A Joint Report by the Italian Society of Hypertension (SIIA) and the Italian Society of Periodontology and Implantology (SIdP). *High Blood Press Cardiovasc Prev.* 2021 Sep;28(5):427-438. doi: 10.1007/s40292-021-00466-6.
- 30.** Govoni M., Jansson E.A., Weitzberg E., Lundberg J.O. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide.* 2008; 19:333–337. doi: 10.1016/j.niox.2008.08.003.
- 31.** Zhurakivska, K.; Troiano, G.; Caponio, V.C.A.; Dioguardi, M.; Laino, L.; Ma
one, A.B.; Lo Muzio, L. Do Changes in Oral Microbiota Correlate With
Plasma Nitrite Response? A Systematic Review. *Front. Physiol.* 2019, 10, 1029.
- 32.** Human Microbiome Project Consortium Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012, 486, 207–214.
- 33.** Hyde, E.R.; Luk, B.; Cron, S.; Kusic, L.; McCue, T.; Bauch, T.; Kaplan, H.; Tribble, G.; Petrosino, J.F.; Bryan, N.S. Characterization of the rat oral microbiome and the effects of dietary nitrate. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 77,
3. 249–257.
- 34.** Bryan, N.S.; Tribble, G.; Angelov, N. Oral Microbiome and Nitric Oxide: The Missing Link in the Management of Blood Pressure. *Curr. Hypertens. Rep.* 2017, 19, 33.
- 35.** Janket SJ, Lee C, Surakka M, Jangam TG, Van Dyke TE, Baird AE, Meurman JH. Oral hygiene, mouthwash usage and cardiovascular mortality

during 18.8 years of follow-up. Br Dent J. 2023 Feb 3:1-6. doi: 10.1038/s41415-023-5507-4.

CUSTOS E BOLSA DE ESTUDO

A aluna possui Bolsa de Mestrado na CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

EXECUTORES DO PROJETO

Fabiana Martins de Oliveira Campos – Aluna Pesquisadora

José Roberto Cortelli – Orientador

Sheila Cavalca Cortelli – Coorientadora

Davi Romeiro Aquino – Professor Colaborador

Rodrigo Augusto da Silva – Professor Colaborador

Isabelle Schalch de Oliveira Campos – Professora Colaboradora

Bárbara Alexsandra de Souza Silva - Aluna Colaboradora

Flávio Henrique Alves – Processamentos laboratoriais

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

Fabiana Martins de Oliveira Campos

Taubaté, agosto de 2023.