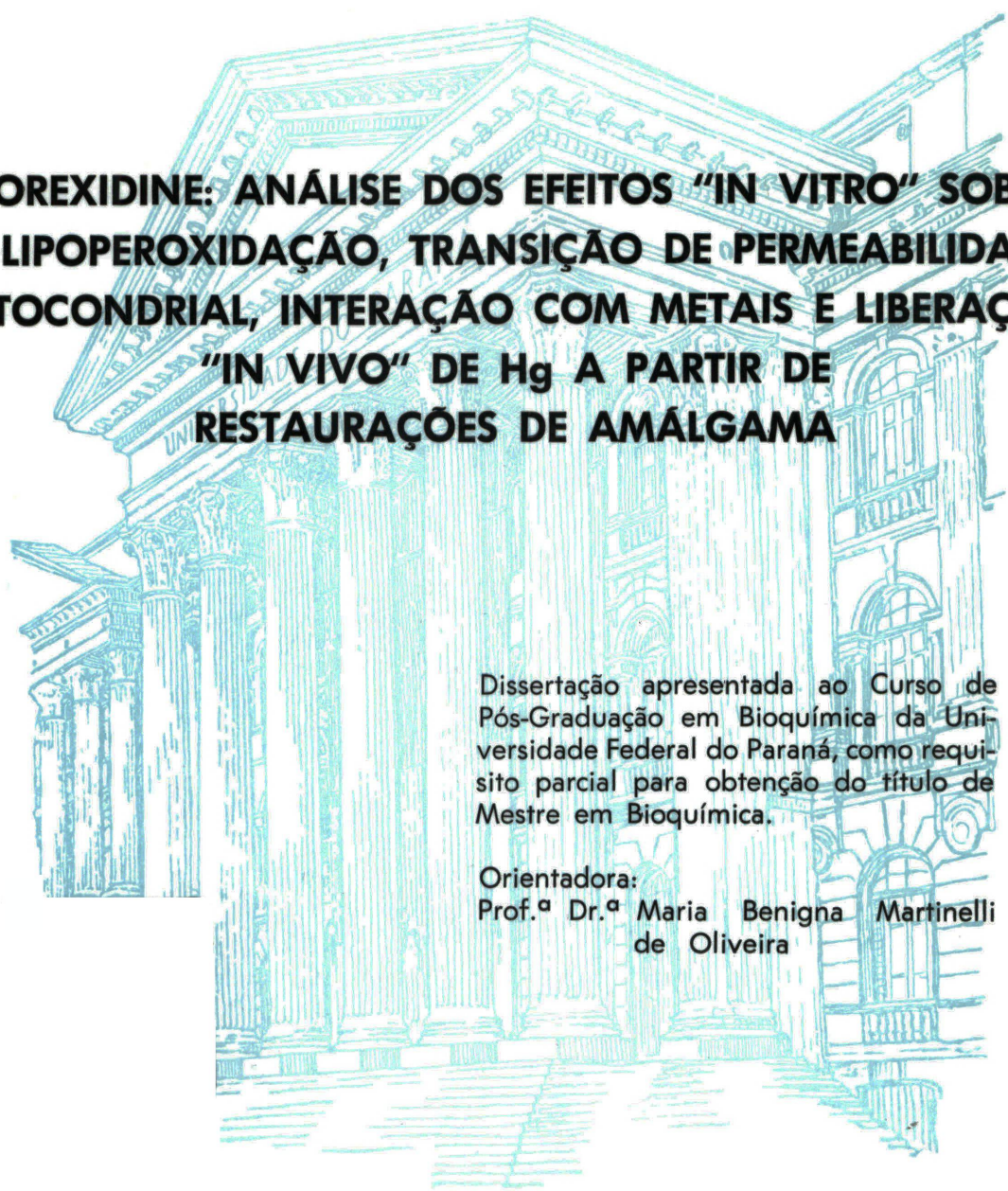


ANA PAULA NEGRELO NEWTON



**CLOREXIDINE: ANÁLISE DOS EFEITOS "IN VITRO" SOBRE
A LIPOPEROXIDAÇÃO, TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL, INTERAÇÃO COM METAIS E LIBERAÇÃO
"IN VIVO" DE Hg A PARTIR DE
RESTAURAÇÕES DE AMÁLGAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora:
Prof.^ª Dr.^ª Maria Benigna Martinelli
de Oliveira

CURITIBA

2002

ANA PAULA NEGRELO NEWTON

**CLOREXIDINE: ANÁLISE DOS EFEITOS "IN VITRO" SOBRE
A LIPOPEROXIDAÇÃO, TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE
MITOCONDRIAL, INTERAÇÃO COM METAIS E LIBERAÇÃO
"IN VIVO" DE Hg A PARTIR DE
RESTAURAÇÕES DE AMÁLGAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora:
Prof.^ª Dr.^ª Maria Benigna Martinelli
de Oliveira

CURITIBA
2002

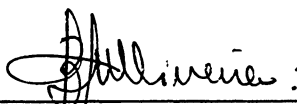
TERMO DE APROVAÇÃO

ANA PAULA NEGRELO NEWTON

CLOREXIDINE: ANÁLISE DOS EFEITOS “IN VITRO” SOBRE A LIPOPEROXIDAÇÃO, TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL, INTERAÇÃO COM METAIS E LIBERAÇÃO “IN VIVO” DE Hg A PARTIR DE RESTAURAÇÕES DE AMÁLGAMA

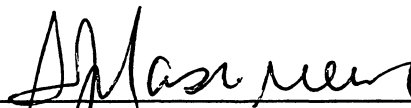
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:



Prof.ª Dr.ª Maria Benigna Martinelli de Oliveira
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica - UFPR

Membros:



Prof.º Dr. Aguinaldo José do Nascimento
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica - UFPR



Prof.º Dr. Gilson Blizkow Sydney
Setor de Ciências da Saúde – Departamento de Odontologia
Restauradora - UFPR



Prof.ª Dr.ª Maria Eliane Merlin Rocha
Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica – UFPR

Curitiba, 18 de fevereiro de 2002

**Dissertação orientada pela Prof^a. Dr^a.
Maria Benigna Martinelli de Oliveira e
co-orientada pela Prof^a. Dr^a. Eva
Gunilla Skare Carnieri**

Meus Adorados Pais

Aos meus pais, **Maria Marlene e Afonso**, dedico a conclusão deste meu trabalho.

Vocês, que sempre estiveram presentes em cada momento de minha vida, me apoiando, me dando carinho e compreensão.

Vocês, que souberam dizer as palavras certas que eu precisava ouvir, ou calar, quando não havia o que ser dito.

Vocês, que do jeito mais especial, me ensinaram as noções de certo e errado, que moldaram o meu caráter.

Vocês, que se preocuparam a cada dia de prova, a cada véspera de relatório.

Vocês, que vibraram comigo com o meu sucesso, mas que também souberam me apoiar nas minhas derrotas.

Vocês, que sempre estiveram prontos pra me oferecer um ombro amigo, um colo acolhedor, um sorriso especial....

Vocês, que souberam como ninguém compartilhar comigo as lágrimas tantas vezes derramadas.

Vocês, que me deram a lição que nenhuma formação acadêmica é capaz de ensinar: o AMOR INCONDICIONAL.

Essa, com certeza foi a tarefa mais difícil, mas definitivamente, foi a qual vocês alcançaram a perfeição!! Graças a vocês que sou o que sou.

OBRIGADA POR TUDO. AMO MUITO VOCÊS!!

AGRADECIMENTOS

O meu profundo agradecimento à minha querida orientadora, Prof. Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, que mesmo passando por momentos muito difíceis durante este período, em nenhum momento deixou de se preocupar comigo, de me ajudar e me orientar, sempre com muito carinho e atenção.

À minha grande amiga, Mariana Piemonte Moretão, que tantas vezes me ajudou, dentro e fora do curso. Ela, que torceu por mim nos momentos de alegria e também sofreu comigo nos momentos mais difíceis. Tenho certeza que esta amizade permanecerá por muito tempo em nossas vidas. Valeu amiga!

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Eva Gunilla Skare Carnieri, pelas contribuições científicas e pelo carinho.

Às minhas grandes amigas Vanessa Klas Ferreira e Michele Tomson Delazari, que desde a infância, estão ao meu lado, me ajudando com sua amizade e carinho.

Ao Dr. Sylvio P. Gevaerd, por sua ajuda, amizade e, principalmente, pelo empréstimo do molde para materiais dentários. Sem ele, grande parte do meu trabalho não poderia ter sido realizado.

À Farmácia de Manipulação O Formulário, por gentilmente ter me fornecido a clorexidine, droga de meu estudo.

À Dental Gaúcho, por gentilmente ter me fornecido o amálgama dental.

À minha amiga Silvia Prado, por sua valiosa ajuda e contribuição para a parte clínica deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por gentilmente ceder os meios de cultura.

Ao Sr. Osnildo e ao Fernando, do Lactec, por terem sido tão prestativos, realizando as dosagens de mercúrio.

Aos meus colegas Mariana S. Araújo, Fernanda F. Simas, Ricardo Wagner, André B. Mariano, Wellington L. Braguini, Renato Bochicchio, Patrícia S. Campelo e Adriano G. Viana, por terem participado da parte clínica do meu trabalho.

À Prof. Dra. Silvia Cadena, por sua amizade e ajuda dentro do laboratório.

Ao Prof. Dr. Aginaldo José do Nascimento, pelo precioso auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, pelo apoio durante a escrita deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Wellington, Guilhermina, André, Andréa e Priscilas.

Aos professores do Departamento de Bioquímica, Colegiado do Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, pela acolhida e pela possibilidade de tornar-me pesquisadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PRONEX, pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas que cruzaram meu caminho de pesquisa, marcando, de alguma forma, minha vida pessoal e profissional.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |

| | |
|---|----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Clorexidine | 1 |
| 1.1.1. Histórico | 1 |
| 1.1.2. Degradação e estabilidade da CHX | 3 |
| 1.1.3. Efeitos bioquímicos da CHX..... | 5 |
| 1.1.4. Estudos clínicos sobre a CHX..... | 7 |
| 1.1.5. Efeitos colaterais do uso da CHX..... | 9 |
| 1.2. Amálgama Dental..... | 12 |
| 1.2.1. Histórico | 12 |
| 1.2.2. Composição do amálgama dental | 13 |
| 1.2.2.1. Ligas convencionais para amálgama | 13 |
| 1.2.2.2. Ligas para amálgama com alto teor de cobre | 15 |
| 1.2.2.3. Composição após trituração (mistura com Hg) | 16 |
| 1.2.3. Mecanismo de reação de presa do amálgama dental..... | 16 |
| 1.2.3.1. Amálgamas convencionais..... | 16 |
| 1.2.3.2. Amálgamas com alto teor de cobre..... | 16 |
| 1.2.4. Relação Hg-Liga..... | 17 |
| 1.2.5. Evidências da liberação de Hg a partir do amálgama dental..... | 17 |
| 1.2.6. Sítios de concentração de Hg a partir de amálgama..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.7. Efeitos bioquímicos conhecidos do Hg..... | 25 |
| 1.3. Lipoperoxidação..... | 28 |
| 1.3.1. Importância do ferro na lipoperoxidação | 30 |
| 1.3.2. Efeitos deletérios da lipoperoxidação..... | 31 |
| 1.4. Transição de permeabilidade mitocondrial..... | 33 |
| 2. Objetivos..... | 36 |
| 2.1. Objetivos gerais..... | 36 |
| 2.2. Objetivos específicos | 37 |
| 3. Materiais, Pacientes e Métodos | 38 |
| 3.1. Reagentes..... | 38 |
| 3.2. Preparo da solução de CHX..... | 38 |
| 3.3. Animais..... | 38 |
| 3.4. Obtenção de frações mitocondriais | 38 |
| 3.5. Determinação de proteínas | 39 |
| 3.6. Lipoperoxidação..... | 39 |
| 3.7. Liberação de ferro de ferritina | 40 |
| 3.8. Transição de permeabilidade mitocondrial..... | 41 |
| 3.9. Corpos de prova de amálgama dental | 41 |
| 3.10. Triagem e coleta de dados dos sujeitos objetos de estudo..... | 42 |
| 3.11. Coleta de amostras de saliva | 44 |
| 3.11.1. Coleta de saliva para ensaio de detecção de Hg | 44 |
| 3.11.2. Coleta de saliva para testes microbianos..... | 44 |
| 3.12. Liberação de Hg de corpos de prova de amálgama dental..... | 44 |
| 3.13. Liberação de Hg de restaurações de amálgama dental..... | 45 |
| 3.14. Atividade antimicrobiana da CHX após um único bochecho..... | 45 |
| 3.15. Análises estatísticas..... | 45 |
| 4. Resultados e Discussão | 47 |
| 4.1. Liberação de ferro de ferritina por CHX..... | 47 |
| 4.2. Lipoperoxidação estimulada por CHX..... | 49 |
| 4.3. Transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) induzida por CHX .. | 51 |

| | |
|---|------------|
| 4.4. Liberação de Hg de corpos de prova de amálgama dental | 72 |
| 4.5. Caracterização dos sujeitos participantes deste estudo..... | 75 |
| 4.5.1. Sexo/Idade | 77 |
| 4.5.2. Nível Educacional..... | 79 |
| 4.5.3. Índice CPO..... | 79 |
| 4.5.4. Índice de amálgama | 80 |
| 4.5.5. Índice gengival | 82 |
| 4.5.6. Lesões de mucosa | 83 |
| 4.5.7. Uso de medicamentos..... | 83 |
| 4.5.8. Tratamento periodontal prévio/Uso de colutório contendo CHX..... | 84 |
| 4.5.9. Diferença na percepção do paladar | 84 |
| 4.6. Liberação de Hg de restaurações de amálgama dental | 85 |
| 4.7. Atividade antimicrobiana da CHX após um único bochecho | 89 |
| 5. Discussão Final | 95 |
| 6. Conclusões..... | 101 |
| 7. ANEXOS | 102 |
| 8. Referências Bibliográficas | 108 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 | Fórmula estrutural da Clorexidine..... | 2 |
| Figura 2 | Estrutura da bisguanida..... | 3 |
| Figura 3 | Hidrólise da CHX em soluções aquosas..... | 4 |
| Figura 4 | Principais interações entre as restaurações de amálgama e a cavidade oral..... | 22 |
| Figura 5 | Mecanismo proposto da liberação de Hg a partir do amálgama dental..... | 23 |
| Figura 6 | Corpos de prova de amálgama..... | 43 |
| Figura 7 | Liberação de ferro de ferritina..... | 48 |
| Figura 8A | Efeito da CHX (23 μ M) na lipoperoxidação ferro-induzida..... | 50 |
| Figura 8B | Efeito da CHX (23 μ M) na lipoperoxidação ferro-induzida na presença de <i>o</i> -fenantrolina..... | 51 |
| Figura 9A | Efeito das diferentes concentrações de CHX nas mitocôndrias..... | 53 |
| Figura 9B | Efeito das diferentes concentrações de CHX nas mitocôndrias, em presença de cálcio..... | 53 |
| Figura 10A | Efeito da CHX (0,5 μ M) ou da diamida (300 μ M) na MPT, em presença de cálcio..... | 55 |
| Figura 10B | Efeito da CHX (2,5 μ M) na MPT, em presença de cálcio..... | 56 |
| Figura 11A | Efeito do ditiotreitol (DTT) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 57 |
| Figura 11B | Efeito do ditiotreitol (DTT) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 58 |
| Figura 12A | Efeito do EGTA na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 59 |
| Figura 12B | Efeito do EGTA na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 60 |
| Figura 13A | Efeito da ciclosporina A (CsA) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 62 |
| Figura 13B | Efeito da ciclosporina A (CsA) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 63 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 14A | Efeito do brometo de <i>p</i> -bromofenacila na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 64 |
| Figura 14B | Efeito do brometo de <i>p</i> -bromofenacila na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 65 |
| Figura 15A | Efeito do butilhidroxitolueno (BHT) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 66 |
| Figura 15B | Efeito do butilhidroxitolueno (BHT) na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 67 |
| Figura 16A | Efeito da catalase na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 68 |
| Figura 16B | Efeito da catalase na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 69 |
| Figura 17A | Efeito da <i>o</i> -fenantrolina na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 70 |
| Figura 17B | Efeito da <i>o</i> -fenantrolina na MPT em presença de CHX e cálcio..... | 71 |
| Figura 18 | Efeito da CHX na liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama..... | 74 |
| Figura 19 | Fotos representativas da condição oral dos participantes deste estudo..... | 76 |
| Figura 20 | Índice de amálgama obtido de cada indivíduo..... | 81 |
| Figura 21 | Efeito da CHX (0,12%) na liberação de Hg de restaurações de amálgama..... | 87 |
| Figura 22 | Gráfico para a liberação de Hg de restaurações de amálgama e o índice de amálgama individual..... | 89 |
| Figura 23 | Atividade antimicrobiana da CHX após um único bochecho..... | 91 |
| Figura 24 | Crescimento bacteriano em meio líquido a partir das amostras salivares inoculadas em meio líquido (Müller Hinton), por 24 horas a 37°C..... | 92 |
| Figura 25 | Gráfico para o índice de amálgama e a contagem microbiana após o bochecho com CHX (0,12%)..... | 94 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental..... | 14 |
| Tabela 2 | Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental..... | 15 |
| Tabela 3 | Dados estatísticos (teste-t) referentes ao ensaio de liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama dental..... | 74 |
| Tabela 4 | Perfil detalhado dos sujeitos participantes deste estudo..... | 78 |
| Tabela 5 | Distribuição do índice CPO na população estudada..... | 80 |
| Tabela 6 | Comparação de índices de amálgama entre sexos..... | 82 |
| Tabela 7 | Crítérios diagnósticos e códigos para o índice gengival..... | 82 |
| Tabela 8 | Teste t pareado para comparação da liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama..... | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP: Adenosina 5' difosfato
ATP: Adenosina 5' trifosfato
BHT: Butilhidroxitolueno
BSA: Soroalbumina bovina
CHX: Clorexidine
CsA: Ciclosporina A
Da: Dalton
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etileno diamino tetracético
EGTA: Ácido etileno glicol-bis (β -amino éter) N, N, N', N' – tetracético
ERO: Espécies reativas de oxigênio
GPX: Glutaciona peroxidase
GSH: Glutaciona reduzida
GSSG: Glutaciona oxidada
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HEPES: [N-(2 hidroxietil) piperazina N' – (2 ácido etanosulfônico)]
MDA: Malondialdeído
m.m.i.: Membrana mitocondrial interna
MPT: Transição de permeabilidade mitocondrial
NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PMPT: Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
SOD: Superóxido dismutase
 $\Delta\psi$: Potencial elétrico de membrana

RESUMO

A clorexidine (CHX), um agente amplamente utilizado em odontologia, apresenta efetiva ação fungicida e bactericida. Os efeitos deste agente foram avaliados sobre a liberação de ferro de ferritina, a lipoperoxidação ferro-induzida e a transição de permeabilidade mitocondrial. Sua interação com outros metais, como o mercúrio (Hg), um dos principais componentes do amálgama, também foi avaliada. Este agente estimula a liberação de ferro de ferritina de forma dose-dependente, sendo este estímulo, significativo em todas as concentrações utilizadas (5-100 μM). A lipoperoxidação avaliada pela formação de malondialdeído foi significativamente estimulada na presença de CHX (23 μM) a partir de 20 minutos de incubação. A CHX induz a transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) em concentrações de 0,5 μM e 2,5 μM . O efeito foi dependente da concentração de cálcio bem como do tempo de exposição à droga. A indução da MPT por CHX foi inibida por DTT e CsA, sugerindo que o mecanismo envolve a oxidação de grupamentos -SH e a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, respectivamente. A interação da CHX com a liga de amálgama dental foi avaliada *in vitro* e *in vivo*. Os experimentos *in vitro* utilizaram duas marcas comerciais de liga de amálgama: Permite C e GS50. Foram confeccionados corpos de prova, os quais foram incubados em tampão fosfato (pH6,5) por 24 horas a 37°C, na ausência ou na presença de CHX (0,12%). Os resultados acusaram presença de Hg em todas as amostras, porém em presença de CHX ocorreu um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para ambas as marcas comerciais. Os experimentos *in vivo* foram realizados com a participação de 10 voluntários, que doaram saliva para análises de crescimento bacteriano e de presença de Hg, antes e após bochecho com CHX (0,12%). Tal população mostrou-se estatisticamente homogênea quanto à idade, nível educacional, índices CPO e gengival. Apenas o índice de amálgama mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os participantes. Os resultados mostraram uma correlação direta entre o índice de amálgama individual e o crescimento bacteriano após o bochecho com CHX a 0,12%. Nesta concentração, a CHX estimulou a liberação de Hg em 50% da população avaliada ($p < 0,05$), porém não houve correlação entre o índice de amálgama individual e a taxa de Hg liberada na saliva após o bochecho. Um único bochecho de CHX (0,12%) foi suficiente para induzir, em 40% da população estudada, efeito (reversível) sobre a sensibilidade do paladar (gosto salgado). O efeito da CHX em estimular a liberação de Hg das restaurações de amálgama pode expor os pacientes aos efeitos deletérios do Hg e este aspecto deve ser levado em consideração no momento da sua utilização.

ABSTRACT

Chlorhexidine (CHX) is an antiseptic largely used in dentistry. The present study evaluated its effects on iron release from ferritin, iron-induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition (MPT). Its interaction with other metals, such as mercury (Hg), which is one of the most important constituents of amalgam, was also evaluated. This agent stimulates the iron release from ferritin in a dose-dependent manner and, in all concentrations used (5-100 μM), there was a significant stimulus. Lipid peroxidation was evaluated by formation of malondialdehyde and was significantly stimulated in the presence of CHX (23 μM), starting at 20 min. of incubation. CHX also stimulates MPT, in low concentrations such as 0.5 and 2.5 μM . Its effect was dependent of the calcium concentration as well as the time of exposure of the drug. The inhibition of this phenomena by DTT and CsA, suggests that its mechanism involves oxidation of -SH groups and the pore of MPT, respectively. Its interaction with amalgam was evaluated by *in vitro* and *in vivo* experiments. Samples of commercially available dental amalgams, namely Permite C and GS50, were used for *in vitro* studies. Specimens were incubated for 24 h at 37°C with phosphate buffer (pH 6.5), in the presence or absence of CHX (0.12%). Hg was found in all samples, but in the presence of CHX, there was a statistically significant ($p < 0.05$) increase around 2 times of Hg release for both brands. Ten volunteers participated as donors of saliva samples. These were analyzed for bacterial growth and for the presence of Hg after only one mouthrinse with CHX solution (0.12%). The population studied was considered statistically homogeneous, in regard to age, educational level, CPO and gingival index. Only the amalgam index showed statistically significant differences between individuals. The results show a direct correlation between the amalgam index and salivary bacterial growth after mouthrinsing. CHX increased Hg release from dental amalgam restorations in 50% of the analyzed population. However, a correlation between the amalgam index and the rate of Hg release could not be established. Finally, only one mouthrinse with CHX solution (0.12%) was sufficient to induce reversible impairment of taste (salty) in 40% of the evaluated population. The knowledge that certain substances routinely used in dentistry are able to increase Hg release from amalgam fillings, overexposing the patients to deleterious effects of Hg, must be considered at the moment of their use.

1. Introdução

1.1. Clorexidine

1.1.1. Histórico

A concepção da prática odontológica tem se alterado gradativamente, de uma odontologia cirúrgico-restauradora ditada por BLACK (1936), na qual tecidos dentários sadios eram eliminados para prevenir a reinfecção por cáries, até a odontologia atual, que prega a promoção de saúde bucal pelo controle dos agentes etiológicos de doenças, antes que estas iniciem seu desenvolvimento (CHAVES, 1986). Aliado a este avanço, a crescente conscientização da população em preservar seus dentes, contribui para a preservação das estruturas bucais por mais tempo, visando também um ganho na qualidade de vida (CHAVES, 1986; MEZZOMO, 1997).

Apesar disso, a ocorrência da placa dentária ainda é um problema grave, sendo sua presença sobre a superfície dental um fator essencial para o desenvolvimento das duas principais doenças bucais: a cárie dentária e a doença periodontal (NEWBRUN, 1988). Assim, esforços para encontrar alguma maneira de evitar a formação da placa ou efetivamente removê-la da superfície dos dentes têm sido realizados. Dentre outras manobras, uma das mais comuns é o uso de substâncias antimicrobianas (NEWBRUN, 1988; THYLSTRUP & FEJERSKOV; 1994).

Além do flúor, um agente preventivo de cáries, nenhum outro agente recebeu tanta atenção em odontologia como a clorexidine (CHX). O uso tópico de CHX provavelmente possui o maior suporte de dados clínicos relatados em odontologia, entre os agentes anticáries que não contêm flúor (FORWARD, 1994). A CHX (Figura 1) é uma bisbisguanida, que apresenta ação fungicida e bactericida contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Seu extenso estudo se deve ao fato de ser o agente inibidor de placa bacteriana mais potente até hoje conhecido (CANCRO *et al.*, 1972; SCHIOTT *et al.*, 1976a; KNUUTTILA &

SÖDERLING, 1980; NEWBRUN, 1988; JENKINS *et al.*, 1988; PUCHER & DANIEL, 1993; WARNER *et al.*, 1993; LAMBERT *et al.*, 1997; SKÖLD *et al.*, 1998). Este agente consiste de dois anéis de 4-clorofenol e dois grupos bisguanidas, que estão simetricamente ligados a uma cadeia hexametileno (Figura 1); sua estrutura lhe fornece propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (THYLSTRUP & FEJERSKOV; 1994).

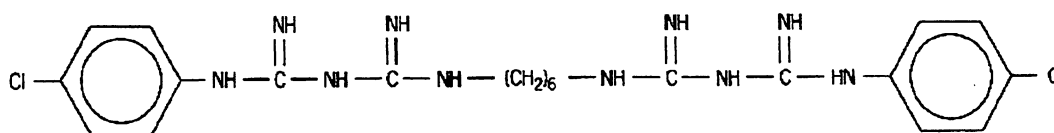


Figura 1: Fórmula estrutural da Clorexidine

A CHX tem sido amplamente usada na prática médica desde sua introdução no mercado, no início da década de 1950. Primeiramente, ela foi usada para situações como preparo pré-cirúrgico da pele, profilaxia de queimaduras, procedimentos de obstetrícia e ginecologia (WARNER *et al.*, 1988), bem como agente conservante de algumas marcas de colírios (JAMINET *et al.*, 1970).

Os relatos promissores do uso da CHX para controle de placa bacteriana estimularam, nos anos 70, a publicação de vários trabalhos a respeito de seus efeitos clínicos como inibição de formação de placa, diminuição da gengivite e da atividade de cáries (DAVIES *et al.*, 1970; LÖE & SCHIOTT; 1970; CANCRO *et al.*, 1972). A observação de diminuição da formação da placa dental e da severidade da inflamação gengival foi confirmada em estudos em macacos (JOHNSON & KENNEY, 1972; REED *et al.*, 1977). Também foi observado que a CHX é capaz de aumentar a velocidade de cicatrização após cirurgias periodontais, quando aplicada dentro da bolsa periodontal recém-operada (ASTOE-JÖRGENSEN *et al.*, 1974).

Atualmente, a CHX é usada tanto no combate às doenças periodontais, quanto no combate à cárie, em pré-operatórios orais, como extrações dentárias (BONINE, 1995) e implantes dentários (LAMBERT *et al.*, 1997). As formas de aplicação desta substância variam desde bochechos usados em diversas concentrações, géis aplicados em moldeiras individuais, vernizes dentários, até “chips” introduzidos diretamente no interior da bolsa periodontal (SKÖLD *et al.*, 1998; GREENSTEIN & POLSON, 1998).

1.1.2. Degradação e Estabilidade da CHX

Desde os trabalhos iniciais realizados com a CHX, havia uma preocupação em relação à formação de seus produtos de degradação. HEARD & ASHWORTH (1968) e JAMINET *et al.* (1970) relataram que um dos principais produtos de degradação da CHX é a *p*-cloroanilina, uma substância altamente tóxica que, quando absorvida leva à meta-hemoglobinemia a qual, em concentrações suficientes, causa cianose (JAMINET *et al.*, 1970; LENGHA, 1985; SAX & LEWIS, 1987). A exposição à *p*-cloroanilina pode também causar dano hepático e renal (BREITHERICK, 1986; LENGHA, 1985). Outros produtos são a *p*-clorofenil-bisguanida e a fenil-bisguanida, este último um produto de fotólise (HA & CHEUNG, 1996).

Mais recentemente, HA & CHEUNG (1996) mostraram a formação de 12 produtos de degradação da CHX. A figura 3 mostra as prováveis reações para formação de tais produtos.

Em 1968 foi proposta como via de degradação da CHX a via A mostrada na figura 3. Por esta via, a CHX em solução ácida era degradada a amina (VII) e a guanil-uréia (XIV). Em uma solução contendo amônia, duas unidades de guanidina podem ser formadas a partir de uma bisguanida. A estrutura de uma bisguanida tradicionalmente é representada como na Figura 2:

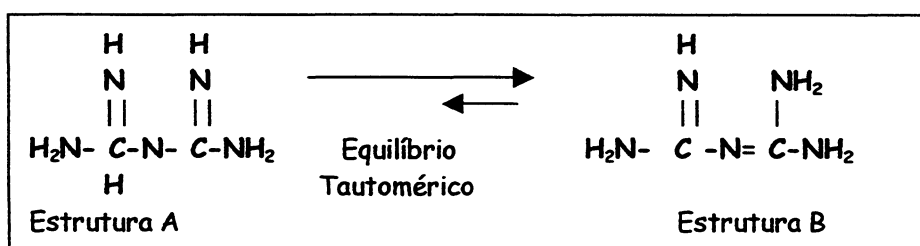


Figura 2: Estrutura da bisguanida

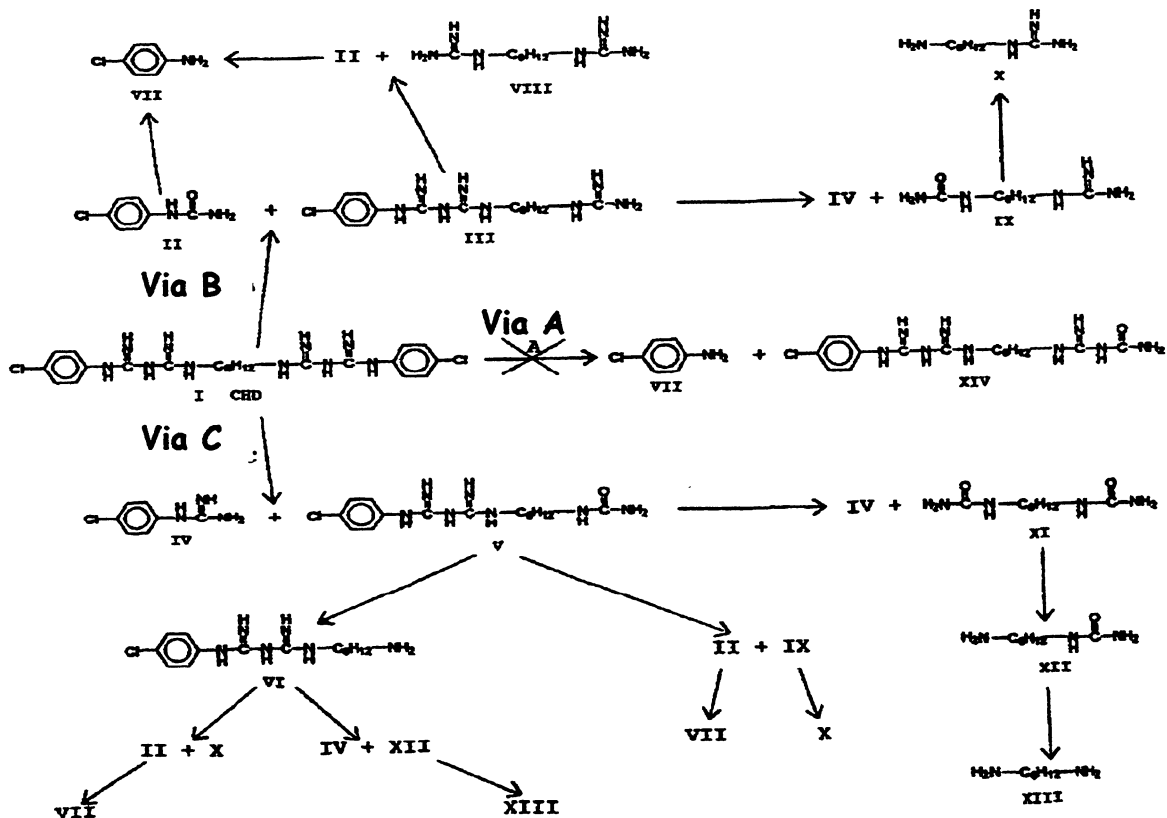


Figura 3: Hidrólise da CHX em soluções aquosas.
Fonte: J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996), 1327-1334

De fato, em soluções diluídas, a estrutura B (Figura 2) parece prevalecer. Portanto, a hidrólise da bisguanida provavelmente envolve a hidratação e subsequente clivagem da dupla ligação C(2)=N(3) na estrutura B para formar guanidina e uréia. A uréia é ainda hidrolisada a amina, enquanto a guanidina parece permanecer relativamente estável. HA & CHEUNG (1996) mostraram, então que a via A (Figura 3) não é a via mais provável para degradação da CHX em soluções aquosas. Ao contrário, em água, a hidrólise da CHX predominantemente segue a via B (Figura 3) para formar clorfenil-uréia (II) e

guanidina (III), embora a formação de pequenas quantidades de IV e V pela via C (Figura 3) também ocorra. Estes autores finalizam seu trabalho ressaltando que soluções aquosas de CHX, à temperatura ambiente, são bastante estáveis, sendo que o cromatograma de uma solução de um ano é idêntico ao de uma solução nova. Seus produtos de hidrólise são encontrados quando a CHX é submetida a condições mais severas, (80°C por 5 dias) e seu principal produto de hidrólise é a *p*-cloroanilina (VII na Figura 3).

1.1.3. Efeitos bioquímicos da CHX

HAROLD *et al.* (1969) estudando os efeitos da droga sobre células intactas e protoplastos de *S. faecalis* mostraram que a CHX ($1,2 \times 10^{-5}M$) inibe fortemente a Na^+K^+ ATPase de membranas de protoplastos isolados, mas não inibe a geração de ATP, visto que nestes microrganismos, a geração de ATP é feita exclusivamente via glicólise e a Na^+K^+ ATPase de membrana está envolvida em processos de transporte de íons. Considerando que a NADH desidrogenase ligada à membrana não foi inibida, os autores sugeriram que o efeito da CHX seria diretamente na proteína ATPase e que o mecanismo pelo qual ocorria a inibição do crescimento da bactéria fosse devido à inibição dos processos de transporte ligados à energia.

Posteriormente, CRISTENSEN & JENSEN (1974), utilizando microssomos de fígado de rato, verificaram a precipitação de proteínas microssomais quando expostos a 50nmol de CHX/mg proteína; como o mesmo não ocorreu quando foi utilizada albumina de soro humano, mitocôndrias ou proteínas mitocondriais, os autores sugeriram que teria ocorrido uma interação específica entre CHX e as membranas microssomais. Os mesmos autores também relataram que tal droga, em pH 7,4 é um cátion divalente e apresenta pequenos grupos lipofílicos. Portanto, pode agir como um detergente catiônico e, como tal, promover a conversão do citocromo P-450 em sua forma inativa, P-420, bem como estimular a ação da glucose 6 fosfatase, contudo não a liberando dos microssomos.

Segundo CRISTENSEN *et al.* (1975), a natureza catiônica anfipática da CHX também promove efeitos sobre o metabolismo mitocondrial. Estes autores verificaram um aumento no consumo de oxigênio de cerca de 2,5 vezes, quando da utilização de CHX entre 10-25 μ M, utilizando succinato como substrato oxidável. Este estímulo é semelhante ao observado com desacopladores clássicos como o 2,4-dinitrofenol, porém não foram realizados experimentos que comprovassem a hipótese de que a CHX poderia estar atuando como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, foi observado também que a CHX, em concentrações até 15 μ M, causa leve estímulo da F_0F_1 ATPase, sendo que em concentrações mais elevadas, até 250 μ M, ocorre inibição dessa enzima em até um terço do seu valor controle. Por outro lado, a 25 μ M de CHX, foi observada 87% da atividade da malato desidrogenase no sobrenadante, e, sendo esta uma enzima da matriz mitocondrial, isso mostra que a droga leva a danos de membrana. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a CHX promove mudanças na fluidez e estrutura da membrana mitocondrial. Entretanto, a CHX mostrou ter uma baixa capacidade de solubilização de proteínas mitocondriais em baixas concentrações, enquanto que em concentrações mais altas poderia precipitá-las.

Utilizando lisossomos e peroxissomos de fígado de rato, bem como as atividades relacionadas a estas organelas, JENSEN *et al.* (1975) observaram que os efeitos da CHX sobre as atividades das enzimas peroxissomais são diferentes daqueles observadas sobre as enzimas lisossomais. A CHX estimula, em efeito dose-dependente, a atividade da fosfatase alcalina lisossomal, chegando ao estímulo máximo em 300 μ M CHX. Este efeito foi comparável ao efeito obtido com a utilização de Triton X-100 a 1%, composto que libera toda a atividade da fosfatase alcalina lisossomal em solução. Por outro lado, a CHX (100 μ M) inibiu a atividade da catalase peroxissomal a 50% do valor controle. Concentrações superiores a 100 μ M levam a uma gradual precipitação de peroxissomos, efeito contrário ao causado pelo Triton X-100.

KNUUTTILA & SÖDERLING (1980) pesquisaram os efeitos de diferentes concentrações da CHX sobre a viabilidade celular e a liberação de enzimas lisossomais de macrófagos em repouso e em fagocitose. Os autores mostraram que em concentrações de CHX entre 0,005 – 0,01%, houve efeitos citotóxicos para estas células. Em concentrações até 0,01% de CHX, houve uma discreta liberação de lactato desidrogenase.

1.1.4. Estudos clínicos sobre a CHX

No final da década de 60 e início da década de 70 surgiram vários trabalhos clínicos com CHX, para mostrar sua eficácia no combate à formação de placa e/ou cálculo dentários (STALLARD *et al.*, 1969; STURZENBERGER & LEONARD, 1969; McNEAL, 1969; SCHIOTT *et al.*, 1970).

CANCRO *et al.*, (1972) realizaram um estudo com 35 indivíduos do sexo masculino, com idades entre 22-55 anos, para avaliar os efeitos do uso de uma solução de CHX 0,1%, durante 10-15 dias, sobre a formação de placa e acúmulo de cálculo dental. Concluíram que o uso desta solução foi efetivo na inibição de formação de placa e do acúmulo de cálculo dental.

SCHIOTT *et al.* (1976a), em um estudo com o uso prolongado da CHX, isto é, dois anos de uso ininterrupto em humanos voluntários, verificaram os efeitos desta condição sobre a flora bacteriana salivar. Notaram que o tratamento com CHX (0,2% por 1 minuto, uma vez ao dia) durante este período produziu um decréscimo de 30-50% na população de aeróbios e anaeróbios totais, bem como de estreptococos salivares. Com o término do tratamento, entretanto, a população microbiana voltou a crescer. Seguindo o mesmo protocolo, outros parâmetros foram analisados, como: a) diferenças de sensibilidade das várias espécies bacterianas ao seu tratamento, sendo, em geral, as Gram-positivas mais sensíveis que as Gram-negativas e os estreptococos mais sensíveis que os estafilococos. (SCHIOTT *et al.*, 1976b); b) realização de provas de função hepática, através da determinação da atividade da aspartato aminotransferase, ácido láctico desidrogenase e fosfatase alcalina no sangue, as quais mostraram-se dentro da

normalidade (SCHIÖTT, *et al.*, 1976c); c) aspectos do estrato córneo, o qual permaneceu inalterado (MACKENZIE *et al.*, 1976); d) atividade das enzimas lactato, malato e glucose 6-fosfato desidrogenase, que permaneceram, sem alteração (NUKI *et al.*, 1976).

JENKINS *et al.* (1988), estudando o efeito da CHX sobre a formação de placa *in vivo*, notaram que a inibição da formação da placa por CHX é igual tanto para aplicações tópicas da droga quanto para bochechos com ela, ambas as situações na concentração de 0,2%. Os autores sugeriram que seu efeito prolongado sobre o crescimento da placa deve-se à sua capacidade de se adsorver ao esmalte dentário e justificam, assim, a razão pela qual outros agentes antimicrobianos com efeitos semelhantes à CHX *in vitro* exibem pequena atividade antiplaca *in vivo*. Concluíram, por fim, que a CHX atua inicialmente de forma bactericida por curto intervalo de tempo, passando para uma atividade bacteriostática mais duradoura enquanto permanecer adsorvida ao esmalte dentário.

AUDUS *et al.* (1992), considerando que os lipídeos têm papel muito importante na interação levedura - célula epitelial, examinaram a relação entre a capacidade da CHX de impedir a ligação da *Candida albicans*, ou sua remoção, das células epiteliais bucais humanas. Estes autores verificaram que a ruptura de regiões hidrofóbicas superficiais das células epiteliais que contêm sítios de ligação para leveduras pode ser um importante mecanismo de ação para a CHX em impedir a ligação da *Candida albicans* às células epiteliais. Os autores enfatizam que a CHX não foi removida das células após lavagem (sete vezes), reforçando a proposição de que *in vivo* este agente não seria removido pela saliva, confirmando que a sua longa retenção na cavidade oral manteria sua prolongada atividade antimicrobiana.

PUCHER & DANIEL (1993), em seu estudo sobre os efeitos da CHX sobre fibroblastos humanos obtidos da pele e da mucosa oral, avaliaram parâmetros como viabilidade e crescimento celulares, contração de gel de colágeno (como modelo para fechamento de cicatrizes) e síntese de proteínas totais. Com

dosagens bastante baixas (0,002%), a viabilidade celular foi pouco alterada, mantendo-se em 90%. Porém, a divisão celular foi bastante comprometida. Nas baixas concentrações da droga (0,005%), houve pequena inibição da contração do gel de colágeno, enquanto que nas concentrações mais elevadas (0,12%), houve quase completa inibição. A síntese de proteínas totais também foi fortemente inibida com concentrações de CHX a partir de 0,005%. Os autores também enfatizaram a falta de uniformidade nos protocolos de estudos disponíveis envolvendo a CHX, principalmente no que se refere ao uso de diferentes concentrações da droga (PUCHER & DANIEL, 1993).

1.1.5. Efeitos Colaterais do Uso da CHX

Ao lado da extensa literatura existente sobre o uso seguro da CHX por humanos, estudos relacionados aos seus efeitos colaterais também são amplamente disponíveis.

Um dos primeiros trabalhos relatando efeitos tóxicos da CHX foi realizado por SONIS *et al.* (1978). Neste trabalho, os autores pesquisaram o efeito da ingestão de água contendo CHX (0,02% e 0,2%) sobre a mucosa oral (língua) de ratos. Observaram que houve a ocorrência de hiperqueratose e displasia significativas no epitélio lingual dos animais testados (observadas macro e microscopicamente), que foram dependentes das doses utilizadas. A observação de tais lesões é de grande importância, visto que este tipo de patologia é sugestivo de leucoplasia e a presença de displasias normalmente é interpretada como uma possível alteração pré-maligna. Contudo, a reversibilidade destas lesões foi observada 30 dias após o término do tratamento. Os autores sugerem, por fim, que esta reversibilidade das lesões poderia representar o desenvolvimento de uma aparente tolerância ao agente tóxico pelos animais.

Em humanos, sabe-se que a CHX pode causar efeitos sobre o paladar, (SCHAUPP & WHONAUT, 1978; LANG *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995), reduzindo temporariamente a intensidade de percepção ao NaCl e ao quinino-HCl, afetando pouco a percepção ao doce. HELMS *et al.* (1995) propuseram que a

CHX não tem um efeito deletério geral sobre as membranas celulares das papilas gustativas e que o efeito dual da CHX sobre o epitélio gustativo estaria relacionado com sua característica anfipática.

No entanto, a CHX tem efeitos tóxicos sobre células epiteliais (HELGELAND *et al.*, 1975), fibroblastos (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1977), e leucócitos (KENNEY *et al.*, 1972).

Um efeito indesejado e muito comum nos tratamentos com CHX é a formação de manchas escuras sobre dentes, restaurações (de compósitos) e próteses (acrílicas) de grande número de pacientes (FLOTRA *et al.*, 1971; ERIKSEN & NORDBÖ, 1978; NORDBÖ *et al.*, 1983; WARNER *et al.*, 1993; ADDY *et al.*, 1995). Alguns profissionais consideram que a ausência de tais manchas seria um indicador da falta de eficácia da droga ou da falta de colaboração no tratamento por parte do paciente (ADDY *et al.*, 1995). *In vivo*, estas manchas são mais prevalentes em áreas que favorecem a formação de placa mais espessa, como as superfícies interproximais ou em locais de difícil acesso à escovação (ERIKSEN *et al.*, 1978; SIEGRIST, *et al.*, 1991). De acordo com SHEEN *et al.* (2001), a formação de tais manchas progride de forma exponencial, conforme aumentam as exposições à CHX.

Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar o mecanismo de formação destas manchas. Entre as hipóteses mais aceitas estão:

- 1) A CHX pode precipitar diretamente os corantes orgânicos contidos nos alimentos (JENSEN, 1977; ADDY *et al.*, 1995; SHEEN *et al.*, 2001);
- 2) A CHX pode reagir com várias substâncias orgânicas, formando produtos fortemente corados (NORDBÖ, 1971; ADDY *et al.*, 1979);
- 3) A CHX pode desnaturar proteínas, expondo grupamentos sulfidrilas que reagem com metais, particularmente ferro, para formar sulfetos corados (ELLINGSEN *et al.*, 1982; NORDBÖ *et al.*, 1982);

Ainda existem grandes controvérsias a respeito destas hipóteses, visto a natureza indireta das evidências que as suportam. Por exemplo, as evidências para a “hipótese dos metais” advêm de estudos envolvendo a adição de soluções

contendo ferro ao invés da utilização de placa bacteriana de ocorrência natural. Por outro lado, estudos *in vivo* feitos por NORBÖ *et al.* (1982) revelaram a presença de grandes quantidades de ferro no material corado coletado a partir da película dental, sendo que em películas não coradas, a quantidade de metal era inferior.

Estudos de NORDBÖ *et al.* (1983) *in vivo* e *in vitro*, analisando o manchamento de resinas acrílicas usadas em próteses totais por ferro devido à exposição à CHX (soluções de 0,2 a 0,4%) apontaram a necessidade de desnaturação da placa dental pela ação da CHX, ou por condições de baixo pH, para haver a produção de manchas com ferro. A partir dos experimentos com oxidantes, os autores mostraram que o uso de peroxi-monossulfato (um agente oxidante potente) removeu completamente as manchas produzidas pela CHX. Visto que o ferro já existia no estado oxidado, NORBÖ *et al.* (1983) sugeriram que o processo de oxidação provavelmente envolve outros grupos ou elementos que não o ferro.

WARNER *et al.* (1993), avaliando a hipótese que os metais de transição e o enxofre seriam os causadores do manchamento dental induzido por CHX, realizaram um estudo com placa dental humana, adquiridas a partir de indivíduos tratados com CHX (0,12%) ou água (controles), usando microscopia eletrônica analítica. Observaram que os níveis aumentados de enxofre e de metais de transição (particularmente ferro) nas regiões manchadas eram diretamente correlacionados, enquanto que nas regiões livres de manchas, os níveis de enxofre e metais de transição eram semelhantes aos encontrados em indivíduos tratados com água. Por fim, os autores sugeriram que a formação de manchas é devida a um complexo formado entre metais e material orgânico que contém enxofre (por exemplo, a proteína salivar lactoferrina, a qual também possui ferro). Os autores propuseram que a CHX aumenta a incorporação de proteínas sulfatadas na placa, o que aumentaria o processo de manchamento natural.

A possibilidade de interação da CHX com metais sugere que este agente poderia interferir nos materiais utilizados em restaurações dentais, como o

amálgama dental. Esta é uma questão que não foi ainda explorada e permanece como uma lacuna na literatura. Esta questão constitui-se em um dos objetivos do presente trabalho. Devido à relevância do tema, uma breve revisão sobre este material restaurador será apresentada a seguir.

1.2. Amálgama Dental

1.2.1. Histórico

A liga de metais que constitui o amálgama é conhecida desde a idade média, porém, foi no início de 1800 que o uso da pasta de Hg/prata como restaurador dentário começou a se popularizar na Inglaterra e na França e foi introduzido nos Estados Unidos a partir de 1830 (LORSCHIEDER *et al.*, 1995).

Desde o início de seu uso já existiam dentistas preocupados com o envenenamento por mercúrio, pois já se sabia que a exposição a ele causava vários efeitos colaterais, incluindo demência e perda da coordenação motora. Por volta de 1845, como um reflexo destas preocupações, a American Society of Dental Surgeons e várias sociedades odontológicas afiliadas adotaram um termo de compromisso para seus membros assinarem, contra o uso do amálgama. Com a extinção da American Society of Dental Surgeons, em 1856, e o surgimento da American Dental Association, em 1859, o amálgama foi recomendado como um material restaurador seguro. Logo depois, o estanho foi adicionado à pasta Hg/prata para contrapor a expansão ocasionada pelos elementos da fórmula prévia (BREMNER, 1954; RING, 1985).

Havia razões econômicas para promover o amálgama dental como um substituinte para os outros materiais restauradores da época, como os cimentos ou o ouro. A introdução do amálgama representava que a saúde odontológica poderia, a partir de então, estar dentro dos padrões financeiros de um setor maior da população, e como ele era simples e fácil de usar, os dentistas poderiam prontamente ser treinados para tratar o grande número dos novos pacientes. Por

volta de 1895, a mistura de metais do amálgama dental foi modificada para controlar a expansão e contração, e a fórmula básica permaneceu praticamente inalterada desde então (BREMNER, 1954; RING, 1985), constituindo-se no material mais amplamente utilizado em odontologia (LEINFELDER & LEMONS, 1995). O amálgama é apontado como o material preferido por 92% dos dentistas americanos para restaurações posteriores (REINHARDT, 1988; BERRY *et al.*, 1994). Mais de 100 milhões de restaurações de amálgama são feitas por ano nos EUA. O uso a longo prazo e a popularidade do amálgama constituem as evidências da segurança do amálgama e, apesar dos esforços que estão sendo feitos continuamente para substituir este material restaurador, ele provavelmente ainda continuará em uso por muito anos no futuro (LEINFELDER & LEMONS, 1995).

1.2.2. Composição do Amálgama Dental

A Especificação nº1 da Associação Dentária Americana exige que as ligas de amálgama contenham predominantemente prata e estanho. Quantidades não especificadas de outros elementos (por exemplo, cobre, zinco, ouro e mercúrio) são permitidas em concentrações menores do que o conteúdo de prata e estanho. Ligas contendo zinco além de 0,01% são exigidas para que recebam a designação de “ligas contendo zinco”. Aquelas ligas que contêm 0,01% de zinco ou menos são designadas como “ligas sem zinco”. *Per se*, não há especificação para uma liga pobre ou rica em cobre (PHILLIPS, 1984). Entretanto, os fabricantes das ligas dividiram-nas em dois grupos principais (com base no seu teor de cobre): ligas com composição tradicional ou convencional e aquelas contendo alto teor de cobre.

1.2.2.1. Ligas convencionais para amálgama

A composição das ligas convencionais para amálgama contém essencialmente três partes de prata para uma de estanho e mais uma pequena porção de cobre e, provavelmente, o zinco. Esta relação básica de três partes de

prata para uma de estanho não difere muito da composição desenvolvida por G. V. Black, em 1895 (PHILLIPS, 1984). A percentagem típica de cada elemento da liga está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental

| Elemento | Percentagem Típica (%) | Varição de Percentagem |
|----------|------------------------|------------------------|
| Prata | 68 | 40-74 |
| Estanho | 28 | 25-30 |
| Cobre | 4 | 4-30 |
| Zinco | 0-2 | 0-3 |

Cada um dos metais desempenha um papel importante no sucesso clínico de uma restauração de amálgama. Assim:

- * A prata contribui principalmente para a dureza da restauração acabada, além de diminuir o escoamento (deformação sob a ação de uma carga). Até determinado limite, a prata influi sobre o tempo de presa (endurecimento) do amálgama.
- * O estanho é o segundo maior componente em peso e geralmente participa com um quarto na composição da liga. Ele rapidamente combina-se com o Hg, formando uma fase estanho-mercúrio, denominada gama 2 (γ_2). Esta fase provoca falhas nas restaurações de amálgama. O estanho tende a reduzir a resistência e diminuir a expansão do amálgama, além de aumentar o escoamento.
- * A concentração de cobre nas ligas convencionais para amálgama varia de 2 a 4%. Este elemento aumenta a dureza e a resistência. Por outro lado, enquanto tende a diminuir o escoamento, aumenta a expansão de presa.
- * A função básica do zinco nas ligas é servir como agente de limpeza de substâncias estranhas, como óxidos. O problema mais sério relacionado com a

presença do zinco é a expansão tardia. Se, por exemplo, o amálgama durante a condensação for contaminado pela saliva ou qualquer outro tipo de exudato, a restauração apresentará expansão tardia e uma corrosão excessiva.

1.2.2.2. Ligas para amálgama com alto teor de cobre

Esta modificação na formulação, que foi denominada “amálgama resistente com dispersão”, contém uma fase dispersa, constituída de pequenas esferas de uma liga eutética prata-cobre (76% prata-24% cobre). Estas partículas esféricas, supostamente mais duras e resistentes que as partículas da liga para amálgama, aumentam a resistência à compressão em aproximadamente 30%. Estas ligas, comparadas com as convencionais, têm um escoamento sob carregamento, cerca de 600% menor. A percentagem típica de cada elemento da liga está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição e percentagem típica dos componentes da liga de amálgama dental

| Elemento | Percentagem Típica (%) | Varição de Percentagem |
|----------|------------------------|------------------------|
| Prata | 60 | 40-70 |
| Estanho | 27 | 25-30 |
| Cobre | 13 | 12-30 |
| Zinco | 0 | 0-2 |

Pode ser notado que o conteúdo de cobre é substancialmente maior que o encontrado nas ligas convencionais. Em geral, nessas ligas o conteúdo de cobre varia entre 12 e 30%, comparado com aqueles 5% ou menos usados nas ligas convencionais. O papel de cada metal na liga é semelhante ao descrito para as ligas convencionais.

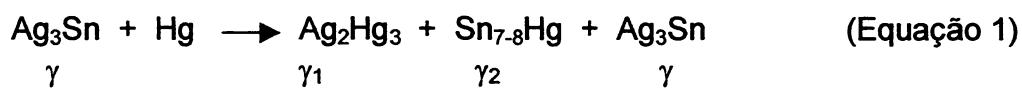
1.2.2.3. Composição após trituração (mistura com Hg)

O amálgama após a trituração contém aproximadamente 50% Hg metálico, 35% prata, 9% estanho, 6% cobre e um traço de zinco (HAHN *et al.*, 1989; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Estimativas do uso anual de Hg por dentistas americanos vão de 10.000 kg nos anos 70 a 70.000kg atualmente (LORSCHIEDER *et al.*, 1995).

1.2.3. Mecanismo de Reação de Presa do Amálgama Dental

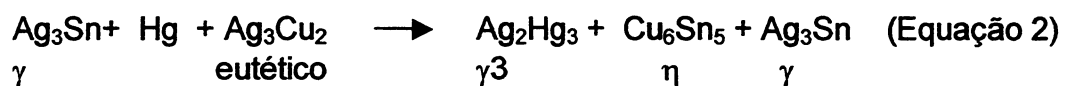
1.2.3.1. Amálgamas Convencionais

Quando o Hg é triturado com a liga para amálgama, várias fases ou produtos são formados. A Equação 1 mostra a reação de maneira bastante simplificada (LEINFELDER & LEMONS, 1995):



1.2.3.2. Amálgamas com Alto Teor de Cobre

Em função dos amálgamas com alto teor de cobre possuírem composição diferente, o mecanismo de reação proposto difere do anterior (LEINFELDER & LEMONS, 1995). A reação simplificada pode ser descrita como mostrado na Equação 2:



Comparando-se a reação (Equação 2) com àquela da liga convencional mostrada na Equação 1, verifica-se que a fase γ_2 , que tem baixa resistência à corrosão e que é frágil, não está presente ou é simplesmente reduzida. Isto ocorre

porque a afinidade do cobre pelo estanho é maior do que a do mercúrio pelo estanho, resultando na inibição ou diminuição da fase γ_2 (estanho-mercúrio).

1.2.4. Relação Hg-Liga:

Quanto maior for a quantidade de Hg livre na restauração, maior será a expansão final. Assim, a falha em não se remover o excesso de Hg, por exemplo, durante a condensação, resulta no aumento da formação das fases γ_1 e γ_2 . Este aumento da matriz é acompanhado por uma expansão em excesso, o que pode ser responsável pela extrusão da restauração da cavidade preparada. O excesso de Hg tende a formar mais fase γ_2 e como consequência, a resistência à corrosão será diminuída. O excesso de Hg não constitui um problema quando se usam cápsulas pré-dosadas, visto que nesta forma, não há distorções de medida; a quantidade de Hg presente dentro da cápsula é suficiente para formar a pasta de amálgama. Na atualidade, a maioria das ligas necessita de menos Hg para produzir uma massa plástica adequada, por isso, alguns amálgamas necessitam de pouca remoção de Hg durante a condensação (LEINFELDER & LEMONS, 1995).

1.2.5. Evidências da Liberação de Hg a partir do Amálgama Dental

Um dos primeiros trabalhos que pesquisaram a liberação de Hg a partir de amálgama dental foi feito por CHAN & SVARE (1972). Estes autores analisaram a emissão de vapores de Hg a partir de corpos de prova de amálgama de prata de diferentes marcas comerciais. Notaram que a taxa de liberação de Hg decresceu com o tempo (para todas as marcas) e o padrão de emissão de vapores foi o mesmo para as diferentes técnicas de acabamento (apenas condensação, brunimento ou polimento). Este padrão de emissão foi caracterizado por uma emissão menor na parte central dos corpos de prova e maior na parte lateral, efeito que foi atribuído a uma condensação dificultada nas partes laterais, resultando em uma concentração maior de Hg nestas regiões. Isto poderia explicar o fato de que são justamente as partes laterais das restaurações com

amálgama dental, as regiões que mais sofrem a ação da corrosão e posterior fratura (PHILLIPS, 1984).

No final da década de 70 e início da década de 80, esta preocupação em relação à liberação de Hg a partir das restaurações dentárias com amálgama aumentou, surgindo então vários trabalhos para esta análise. Muitos dos efeitos danosos causados pelo acúmulo de Hg no corpo humano já são conhecidos (LORSCHIEDER *et al.*, 1995), sabendo-se também que nenhuma função metabólica no corpo humano necessita da presença de mercúrio (KANTOLA, 1996).

Considerando que pequenas partículas de amálgama podem ser deglutidas pelos pacientes durante a condensação ou o polimento destas restaurações, bem como devido à sua degradação, BRUNE *et al.* (1983) simularam esta condição clínica, transferindo pequenas partículas de amálgama diretamente para o estômago de ratos. Logo após, mediram as várias quantidades dos elementos (Cd, Cu, Hg, In ou Zn) liberados destas partículas nos diferentes órgãos destes animais. Notaram que os níveis mais elevados de Hg foram encontrados no fígado ($\sim 0,1\mu\text{g Hg/g}$) e no sangue (concentração não citada pelo autor).

Em estudo realizado em dentistas da Pensilvânia, pôde-se relacionar os elevados níveis de Hg (valores não mostrados) encontrados em vários tecidos destes indivíduos com as alterações na condução nervosa, performance de testes neurofisiológicos e notados sintomas de dano à saúde (WANNAY & SIGAERASEN, 1975; SHIP *et al.*, 1983; HUGGINS, 1984).

Diferentes estudos realizados com a finalidade de avaliar a liberação de Hg de amálgama, *in vitro*, mostraram dados dispersos, sugerindo que os diferentes protocolos afetam fortemente os resultados obtidos. MAREK (1990) avaliando os fatores (saliva artificial x água destilada; câmara aberta x câmara fechada) que afetam a liberação de Hg *in vitro*, para, a partir disso, considerar os possíveis mecanismos de liberação *in vivo*, mostrou que a liberação de Hg de amálgama é maior na primeira hora, diminuindo com o tempo, até alcançar um nível basal de liberação após 25 horas. Não houve diferença significativa na taxa de liberação de

Hg durante a primeira hora com o uso de saliva artificial ou água destilada. Entretanto, quando o estado basal de liberação foi atingido, esta taxa foi maior nas condições de saliva artificial. O uso de câmaras abertas ou fechadas também não mostrou diferenças significativas. A partir dos resultados, o autor sugeriu que *in vivo*, o Hg seria liberado por mecanismo envolvendo processos de dissolução e evaporação. Assim, o Hg entra na fase líquida a partir da superfície do amálgama, principalmente sob a forma de Hg elementar (Hg^0). Parte dele é ionizado ou ligado em complexos e levado junto com os líquidos para o trato gastrointestinal; a outra parte, evapora na atmosfera oral.

MAREK (1992) salienta que os principais fatores envolvidos na interação entre meio oral e amálgama dental são: química e bioquímica do meio, composição e estrutura do amálgama e forças mecânicas. Segundo o autor, alguns dos fenômenos importantes nesta interação incluem: formação de biofilmes sobre as superfícies do amálgama, reações eletroquímicas, formação de células de corrosão localizadas, interações galvânicas com outras restaurações metálicas e efeitos sinérgicos de diferentes forças (Figura 4). Assim, de acordo com este autor, a absorção de uma fração da quantidade total das substâncias liberadas no trato digestivo aparentemente serve como a principal via de entrada dos componentes do amálgama no corpo humano. Outras vias citadas incluem a migração de íons metálicos da restauração para a polpa, estrutura do dente e tecidos moles, além de transporte de íons através do dente na circulação do corpo. O Hg dissolvido pode tanto evaporar quanto ser oxidado a uma forma iônica (Figura 5).

A importância da distinção qualitativa entre a evaporação seca direta e a dissolução seguida por evaporação é que, no primeiro caso, a quantidade de Hg liberado é mínima, considerando que as superfícies dentais restauradas quase sempre estão úmidas, banhadas por saliva. Já no último caso, apenas uma fração do Hg atômico dissolvido escapa sob a forma de vapor; a maior parte é oxidada em uma forma não volátil. Como existe uma diferença substancial entre a eficiência da absorção do vapor de Hg pelos pulmões e a absorção do Hg iônico

pelo trato gastrointestinal, a dissolução seguida de oxidação desempenha um papel crucial na captação de Hg pelo organismo (MAREK, 1992).

Existe grande polêmica acerca da liberação de Hg a partir das restaurações de amálgama, e grande variação de valores citados pelos autores (1,2-27 $\mu\text{g}/\text{dia}$, chegando a valores tão altos como 100 $\mu\text{g}/\text{dia}$). Atualmente, aceita-se que o Hg é constantemente liberado pelas restaurações de amálgama, a uma taxa de 10 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (HAHN *et al.*, 1990; BOYD *et al.*, 1991; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Também é aceito por vários autores (VIMY & LORSCHIEDER, 1985; HAHN *et al.*, 1989; HAHN *et al.*, 1990; VIMY *et al.*, 1990; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 2001) que esta liberação aumenta durante e/ou após períodos de mastigação e escovação. Em contraste, estimativas da absorção diária de todas as formas de Hg, obtidas a partir da ingestão de frutos do mar, são de 2,3 μg de Hg e, a partir de outras fontes de alimentação, junto com o consumo de água, são de 0,3 μg de Hg (WHO, 1991). Portanto, é aceito atualmente que as restaurações de amálgama dental são as principais fontes de exposição ao Hg para a população em geral (WHO, 1991).

Vários outros trabalhos em humanos mostram evidências do acúmulo de Hg a partir de restaurações de amálgama dental (NYLANDER *et al.*, 1987; APOSHIAN *et al.*, 1992; APOSHIAN, 1998), o qual, segundo os autores estaria relacionado com alterações do sistema nervoso central (ECHEVERRIA *et al.*, 1998); de fertilidade (GERHARD *et al.*, 1998); cardíacas (FRUSTACI *et al.*, 1999) e malformações de fetos (WEISS & LANDRIGAN, 2000).

1.2.6. Sítios de concentração de Hg a partir de amálgama

HAHN *et al.* (1989), utilizando ovelhas como modelo experimental, investigaram os possíveis sítios de captação e os padrões de distribuição de Hg liberado a partir de amálgamas dentais *in situ*. Em termos da concentração de Hg, os autores indicaram pelo menos quatro sítios principais: primeiro, os rins (7.438,0 ng Hg/g), seguidos por fezes (4.489,3 ng Hg/g), estômago (929,0 ng Hg/g) e fígado (772,1 ng Hg/g). Outros sítios também importantes foram a mucosa

gengival (323,7 ng Hg/g) e o osso do alvéolo dental (318,2 ng Hg/g). Foram também medidas as concentrações no sangue (9,0 ng Hg/g) e na urina (4,7 ng Hg/g), sendo que na gordura mesentérica foi encontrada a concentração mais baixa (0,9 ng Hg/g). Algumas glândulas endócrinas (pituitária, tireóide, adrenal, pâncreas e ovários) também mostraram sinais de acúmulo de Hg. Os autores ressaltaram as implicações a longo prazo deste acúmulo nos rins e nas glândulas endócrinas, visto que estes tecidos são sítios conhecidos de doenças auto-imunes. De fato, outros trabalhos já foram realizados para mostrar a relação entre: defeitos imunológicos e auto-imunidade induzida por amálgama dental em ratos (HULTMAN *et al.*, 1994), bem como a ativação e a deposição de complexos do sistema imune em ratos com restaurações de amálgama dental (HULTMAN *et al.*, 1998).

Ainda não é conhecido se fatores como tipo ou freqüência de alimentação e padrão de mastigação podem influenciar o grau de liberação de Hg de amálgama. Utilizando primatas como modelo experimental, com base no fato de que nestes, a dentição, o tipo e a freqüência de alimentação, bem como o padrão de mastigação, são muito parecidos com os de humanos, HAHN *et al.* (1990) verificaram que o sítio de maior concentração de Hg foi o osso do alvéolo dental (7.756, 1 ng Hg/g), seguido por: mucosa gengival (4.190,4 ng Hg/g), fezes (3.490, 1 ng Hg/g), rins (3.053, 5 ng Hg/g) e intestino grosso (983,1 ng Hg/g). Cólon, língua e bile apresentaram concentrações de 482,7, 253,3 e 243,1 ng Hg/g, respectivamente. Fígado, urina e sangue mostraram concentrações de 133,1, 17,7 e 5,8 ng Hg/g, respectivamente. A gordura mesentérica não apresentou acúmulo de Hg.

Outra observação que pode ser feita a partir destes trabalhos experimentais em animais é que, após a colocação das restaurações de amálgama, os níveis sanguíneos de Hg permaneceram relativamente baixos, mesmo quando os níveis tissulares em volta eram muitas vezes mais altos que no sangue. Isso sugere que os tecidos rapidamente capturam o Hg do sangue, a uma taxa equivalente à sua liberação na circulação. Tal fenômeno pode explicar a razão pela qual o

monitoramento sanguíneo dos níveis de Hg em humanos não é muito adequado para a medição da exposição ao Hg a partir de restaurações de amálgama (LORSCHIEDER *et al.*, 1995).

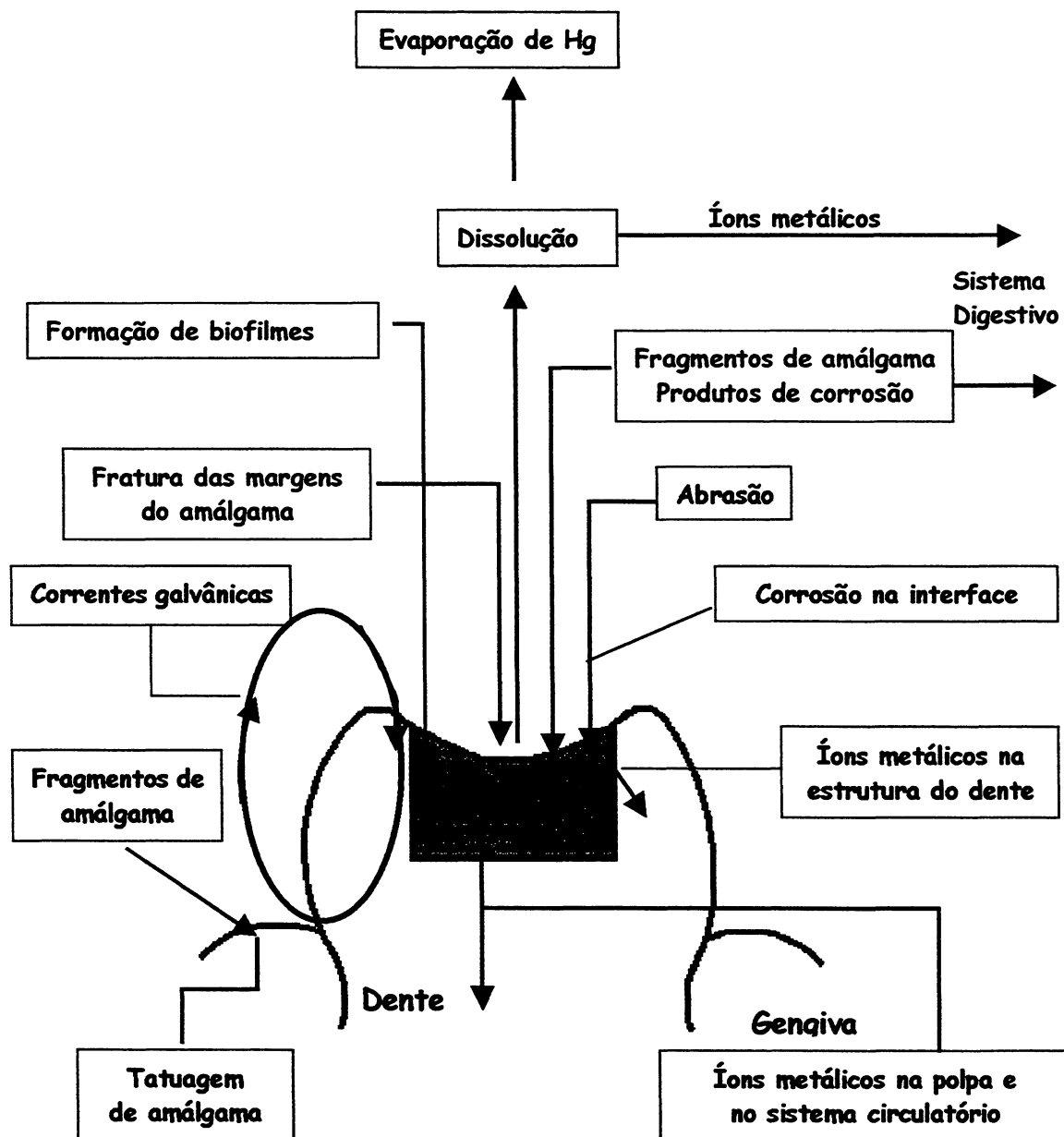
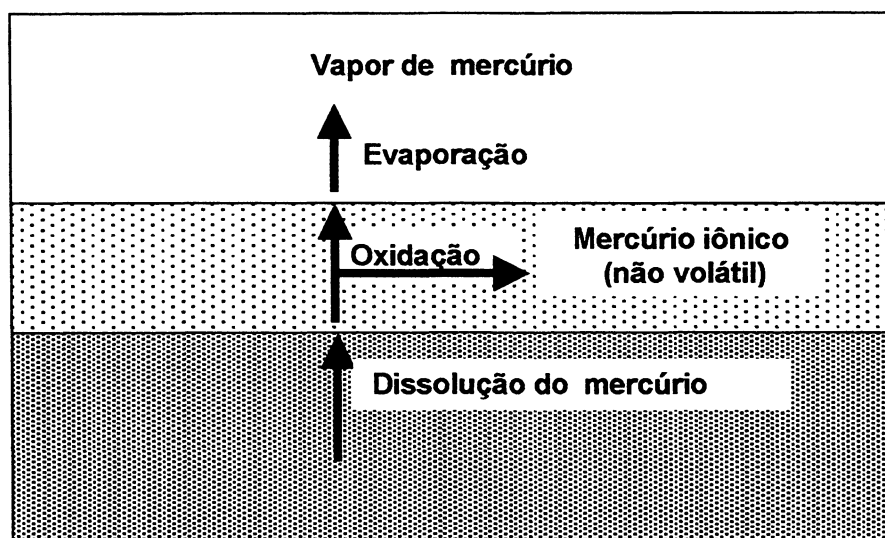


Figura 4: Principais interações entre as restaurações de amálgama e a cavidade oral. Fonte: Adv. Dent. Res., 6:100-109, 1992.



Atmosfera Oral
 Fluidos Oraís
 Amálgama

Figura 5: Mecanismo proposto da liberação de Hg a partir do amálgama dental. Fonte: Adv. Dent. Res., 6:100-109, 1992.

Existem vários trabalhos mostrando os efeitos danosos do Hg sobre os rins. BOYD *et al.* (1991), utilizando ovelhas adultas, pesquisaram o efeito do Hg liberado de amálgama e notaram que houve uma significativa redução na taxa de "clearance" de inulina plasmática, um mês após a colocação das restaurações. Dois meses após, houve significativa queda na concentração de albumina e concomitante aumento na concentração de sódio na urina, sem, no entanto, alterar marcadores enzimáticos indicativos de dano renal após a colocação das restaurações. Segundo os autores, estes resultados poderiam sugerir que as alterações da função renal observadas não são devidas a uma nefrotoxicidade aguda, mas resultantes de efeitos sub-agudos da exposição crônica a baixas doses de Hg.

Além do acúmulo de Hg em tecidos de animais que receberam restaurações de amálgama, dados da literatura comprovam que o Hg liberado destas restaurações pode atravessar a barreira placentária e se acumular em tecidos fetais, além dos tecidos maternos (VIMY *et al.*, 1990). As concentrações mais elevadas de Hg nos tecidos maternos foram encontradas nos rins e fígado, com níveis substanciais de Hg também encontrados em glândulas endócrinas, tecidos orais, estômago e trato respiratório (valores não mostrados). O acúmulo de Hg na placenta foi progressivo durante a gestação e, no leite materno, os níveis de Hg chegaram a 60 ng/g, 25 a 41 dias após colocação das restaurações. Nos tecidos fetais, o maior acúmulo de Hg ocorreu no fígado (100-130 ng Hg/g), seguido pela glândula pituitária (concentração > 100 ng Hg/g). Outras glândulas analisadas mostraram concentrações inferiores (tireóide e adrenal <10 ng Hg/g). Tecidos nervosos como cérebro, córtex occipital e tálamo apresentaram concentrações de aproximadamente 10 ng Hg/g, e tecidos do trato gastrointestinal (estômago, intestinos grosso e delgado e cólon), apresentaram 10 ng Hg/g ou menos. As concentrações dos rins variaram de 10-14 ng Hg/g e as o sangue, de 3-75 ng Hg/g (entre 16-41 dias após a colocação das restaurações), sendo que as de gordura foram as mais baixas (1-2 ng Hg/g).

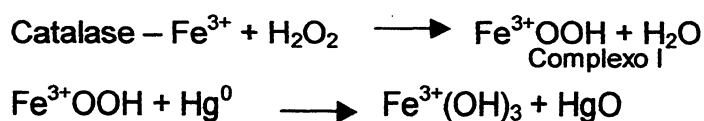
Estudos recentes analisando a distribuição de Hg de amálgama em tecidos maternos e fetais (TAKAHASHI *et al.*, 2001) mostraram que, após a colocação de apenas uma restauração de amálgama em ratas grávidas, houve acúmulo de Hg nos tecidos tanto maternos quanto fetais e que esta concentração tendia a aumentar conforme aumentava o tamanho (área oclusal) das restaurações. Assim, as concentrações de Hg em tecidos maternos foram altas nos rins, intermediárias nos pulmões, fígado e placenta e mais baixas no cérebro. Nos fetos, as concentrações mais elevadas de Hg foram encontradas no fígado, e – em ordem decrescente – nos rins e no cérebro. Portanto, o padrão de distribuição entre tecidos fetais e maternos é um pouco diferente e, embora as concentrações de Hg fetais encontradas sejam bem menores que as maternas, são significativamente maiores que as encontradas no grupo controle (sem restauração).

DRASCH *et al.* (1994) mediram as concentrações de Hg total em fígado (Hg-L), córtex renal (Hg-K) e cerebral (Hg-C) de 108 crianças de idades entre 1 dia e 5 anos, além da concentração de Hg total em rins (Hg-K) e fígado (Hg-L) de 46 fetos. Os autores observaram também qual era a condição oral quanto ao número de restaurações de amálgama das respectivas mães. Notaram que os níveis de Hg-K e Hg-L de fetos e Hg-K e Hg-C das crianças com idade variando entre 11 e 50 semanas podiam ser fortemente correlacionados com o número de restaurações de amálgama das mães.

Portanto, as restaurações de amálgama representam uma fonte constante de exposição ao Hg tanto para mães quanto para fetos e, sendo assim, o emprego contínuo de amálgama dental como material restaurador em mulheres grávidas e crianças deve ser reconsiderado (VIMY *et al.*, 1990; DRASCH *et al.*, 1994).

1.2.7. Efeitos Bioquímicos Conhecidos do Hg

Desde o final da década de 70, já havia uma grande preocupação em relação aos efeitos bioquímicos causados pelo Hg. MAGOS *et al.* (1977) pesquisaram a relação entre a deposição tissular de Hg e a atividade da catalase. Já se sabia, de trabalhos prévios que a catalase e o peróxido de hidrogênio (complexo I) desempenham um papel importante na oxidação de vapores de Hg ($\text{Hg}^0 \longrightarrow \text{Hg}^{2+}$) por suspensões de eritrócitos. Entretanto, o padrão de deposição de Hg no organismo não corresponde aos locais de maior atividade desta enzima, ou seja, os principais sítios de deposição de Hg são os rins, enquanto que é o fígado que apresenta a maior atividade de catalase. MAGOS *et al.* (1977) concluíram que a produção de peróxido de hidrogênio é realmente o passo limitante na oxidação dos vapores de Hg pelos eritrócitos. Os autores propuseram o mecanismo pelo qual os vapores de Hg seriam oxidados pelo complexo I da catalase. Assim:



MOLIN *et al.* (1990) a fim de avaliar se algumas variáveis biológicas poderiam ser influenciadas pela liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama, estudaram os efeitos da remoção de restaurações de amálgama sobre Hg, selênio e a enzima glutathione peroxidase (dependente de selênio). Notaram que, vinte meses após a remoção das restaurações de amálgama, os níveis de Hg no plasma e na urina eram significativamente mais baixos, enquanto os níveis de Hg nos eritrócitos, que representam o conteúdo de Hg na alimentação, não apresentavam diferença significativa. Os níveis de selênio no plasma, no grupo teste, diminuíram significativamente no 5º e 10º dias após a remoção das restaurações, voltando ao normal após isso. Os valores 3 meses antes e 6 e 12 meses após a remoção das restaurações não foram diferentes dos do grupo controle. Os valores de glutathione peroxidase plasmática não diferiram entre os dois grupos em nenhum momento do estudo.

Vários trabalhos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as mitocôndrias de células do túbulo renal proximal são o alvo principal dos efeitos do Hg (II). Isto foi observado a partir de estudos de “swelling” mitocondrial (GOYER & RHYNE, 1975; FOWLER & WOODS, 1977), dano da fosforilação oxidativa (SOUTHARD & NITISEWOJO, 1973; WEINBERG *et al.*, 1982a; WEINBERG *et al.*, 1982b) e depleção de ATP (NIEMINEN *et al.*, 1990). Além disso, estudos mostrando a lipoperoxidação (LUND *et al.*, 1991), dano do DNA (CANTONI *et al.*, 1982) e depleção da glutathione reduzida (GSH) (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983; CHUNG *et al.*, 1982) por Hg(II) sugerem que o mecanismo de toxicidade do Hg(II) é semelhante ao do “stress” oxidativo (LUND *et al.*, 1993).

LUND *et al.* (1991) mostraram, com um estudo *in vitro*, que Hg (II) aumenta a produção de H₂O₂ em dois sítios da cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias de rim de rato: no Complexo I ou NADH desidrogenase (inibido por rotenona) e no Complexo II ou Ubiquinona-Citocromo *b* (inibido por antimicina). O H₂O₂ é metabolizado pela GSH peroxidase mitocondrial, levando à formação de glutathione oxidada (GSSG). Calcula-se que a taxa normal de formação do H₂O₂ e o metabolismo leva a um turnover de 10% do conteúdo da GSH mitocondrial por

minuto. A GSSG é reciclada a GSH às expensas de NADPH, pela GSSG redutase mitocondrial. Portanto, um aumento na formação de H_2O_2 pode alterar as relações GSH/GSSG e NADPH/NADP⁺ normais, uma condição que, na presença de metais de transição, tais como ferro, pode causar a oxidação de macromoléculas mitocondriais, tais como lipídeos ou DNA.

Em outro estudo, LUND *et al.* (1993) mostraram a formação de H_2O_2 aumentada em mitocôndrias renais de rato, além da depleção de GSH e lipoperoxidação *in vivo*, após o tratamento de ratos com $HgCl_2$. Assim, os principais efeitos tóxicos do Hg(II) são devidos a alterações na integridade estrutural da membrana mitocondrial interna (m.m.i.), resultando em perda da seletividade natural a cátions, a qual lhe permite participar efetivamente no metabolismo oxidativo. Em relação a isso, o Hg (II) aumenta bastante a permeabilidade da m.m.i. a K^+ e a Mg^{2+} , resultando na aceleração do efluxo destes cátions, depende de energia. A ação do Hg (II) sobre a m.m.i. é acompanhada pela depleção do conteúdo de GSH e aumento da produção de H_2O_2 também *in vivo*, após o tratamento com $HgCl_2$. Além disso, o aumento na produção de H_2O_2 pode ser acompanhado ainda pelo aumento da peroxidação de lipídeos mitocondriais, situação consistente com a condição de “stress” oxidativo.

BULAT *et al.* (1998) pesquisaram a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao Hg. Ambas atividades enzimáticas foram significativamente mais baixas no grupo exposto ao Hg, em relação ao grupo controle. Além disso, os níveis sanguíneos de Hg e de malondialdeído, um produto resultante de lipoperoxidação, bem como os níveis urinários de Hg no grupo teste foram significativamente mais elevados que os no grupo controle.

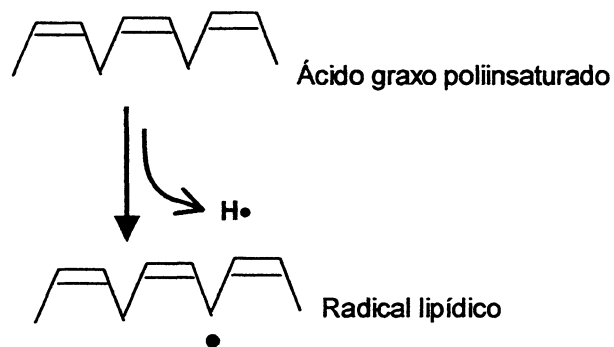
Considerando os dados da literatura que mostram o Hg como agente indutor de lipoperoxidação, bem como a possibilidade de uma interação da CHX com metais, particularmente o ferro, enxofre e/ou grupos -SH, uma importante questão envolvendo processos de lipoperoxidação e CHX deve ser levada em conta. Outra questão refere-se aos processos de transição de permeabilidade

mitocondrial. Vale destacar que nenhum trabalho foi encontrado na literatura quanto às abordagens da CHX como agente de lipoperoxidação e de transição de permeabilidade mitocondrial. Devido à importância deste assunto, uma breve revisão sobre os mecanismos de lipoperoxidação e da transição de permeabilidade mitocondrial será apresentada a seguir.

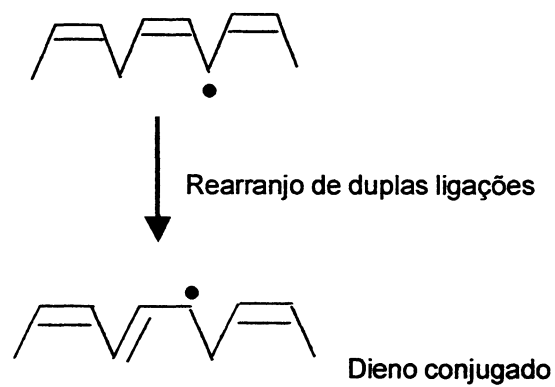
1.3. Lipoperoxidação

A lipoperoxidação é um processo complexo, que ocorre tanto em animais como em vegetais. Envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos, a captação de oxigênio, um rearranjo de duplas ligações em lipídios insaturados e a eventual destruição de membranas lipídicas. Proteínas de membrana também podem ser danificadas pela lipoperoxidação. Este processo pode produzir uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres. A peroxidação do ácido linoléico sozinho resulta na formação de pelo menos vinte produtos de degradação. Como as membranas biológicas são muitas vezes ricas em ácidos graxos insaturados e banhadas em um fluido rico em oxigênio, contendo metais, não é surpreendente que estas sejam susceptíveis ao ataque peroxidativo (BUEGE & AUST, 1978).

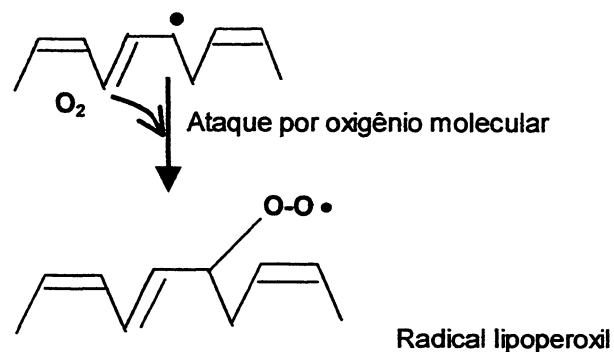
Usualmente, o início da lipoperoxidação se dá com a abstração de um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno de um ácido graxo insaturado, resultando na formação de um radical lipídico (BUEGE & AUST, 1978). A presença de uma dupla ligação nos ácidos graxos enfraquece a ligação C-H no átomo de carbono adjacente à dupla ligação, tomando a remoção do átomo de hidrogênio mais fácil, como pode ser observado a seguir (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

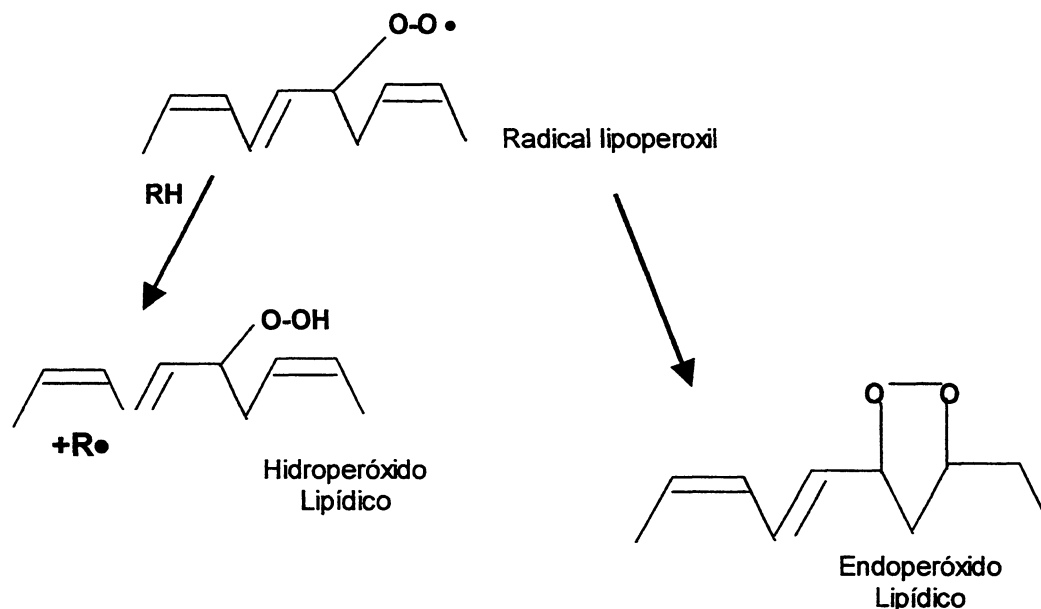


O radical lipídico tende a sofrer um rearranjo das duplas ligações, resultando na formação de dienos conjugados.

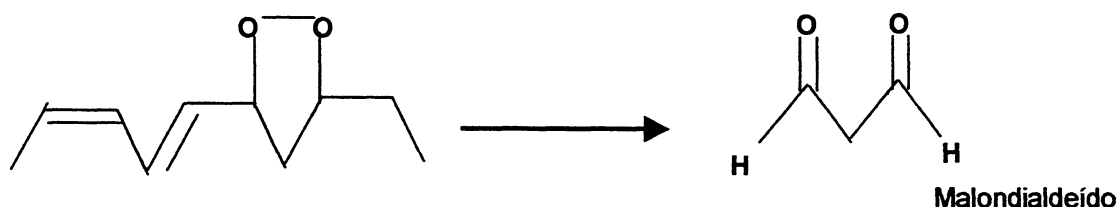


O ataque por oxigênio molecular produz um radical lipoperoxil, o qual pode tanto abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um lipídio adjacente para formar um hidroperóxido lipídico quanto formar um endoperóxido lipídico.





A formação de endoperoxídeos lipídicos em ácidos graxos insaturados contendo pelo menos três duplas ligações interrompidas por metileno pode levar à formação de malondialdeído (MDA) como um dos produtos de degradação (BUEGE & AUST, 1978).



O malondialdeído, por sua vez, serve como um índice conveniente para determinar a extensão da reação de lipoperoxidação de membranas *in vitro*, através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, a qual resulta em um produto de cor vermelha que absorve em 535nm.

1.3.1. Importância do Ferro na Lipoperoxidação

O exato papel dos íons ferro na aceleração da lipoperoxidação ainda é um assunto em debate (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A adição de um sal de Fe^{2+} a um sistema de lipídeos

insaturados livres de peróxidos pode permitir a iniciação da primeira cadeia da lipoperoxidação, caso exista H_2O_2 no meio, por abstração de H por OH^\bullet (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os lipídeos disponíveis comercialmente são usualmente contaminados com lipoperóxidos, portanto, micelas ou lipossomos feitos a partir destes lipídeos já apresentarão traços de lipoperóxidos. Quando as células sofrem algum tipo de injúria, a lipoperoxidação é favorecida e lipoperóxidos são formados enzimaticamente nos tecidos, pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase. Assim, frações de membranas isoladas a partir de células rompidas também contêm lipoperóxidos. Quando os sais de ferro são adicionados às frações de membranas isoladas (que já contêm lipoperóxidos), os lipoperóxidos presentes serão decompostos para formar radicais peroxil e alcoxil. Ambos podem abstrair H^\bullet e estimular a lipoperoxidação. Portanto, a presença de ferro pode não só iniciar o processo de lipoperoxidação (em sistemas livres de peróxidos), mas também estimular a sua propagação (em sistemas que já possuem peróxidos) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Quando hemoglobina ou mioglobina são expostas *in vitro* a um excesso de H_2O_2 (relação molar igual ou maior que 10:1), elas são degradadas, liberando tanto grupamento heme quanto íons de ferro (da degradação do heme). Estes podem estimular a lipoperoxidação e os íons de ferro podem levar à formação de OH^\bullet a partir de H_2O_2 . Em condições onde a relação H_2O_2 :proteína é baixa (1:1), hemoglobina e mioglobina são convertidas em espécies heme feril. Por outro lado, na ausência de H_2O_2 adicionado, as proteínas heme adicionadas a lipídeos (incluindo lipoproteínas) podem estimular a peroxidação por um mecanismo que provavelmente envolve a decomposição de traços pré-existentes de lipoperóxidos a radicais alcoxil e peroxil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3.2. Efeitos Deletérios da Lipoperoxidação

A reação de complexos de ferro ou cobre com lipoperóxidos gera uma vasta gama de produtos, incluindo epóxidos, compostos contendo grupamento carbonil

(C=O), gases de hidrocarbonetos (como os gases pentano e etano), cetonas (como butanona, pentanona e octanona), além de aldeídos saturados (propanal, butanal e hexanal), insaturados (hexenal e nonenal), e dialdeídos, como o malondialdeído (MDA). Tem-se observado que o tratamento de membranas com MDA *in vitro* leva à formação de ligações cruzadas e à agregação de proteínas de membrana.

Enzimas que requerem grupamentos $-NH_2$ ou $-SH$ para sua atividade, normalmente são inibidas durante a lipoperoxidação (por exemplo: a enzima glucose 6-fosfatase, que é encontrada na fração microssomal, é inibida assim que seus grupamentos $-SH$ são oxidados). Outras enzimas, como a $Na^+K^+ATPase$, bem como receptores de superfície, responsáveis pelas respostas celulares aos hormônios, também podem ter sua atividade alterada como consequência da lipoperoxidação. Sabe-se que a peroxidação de lipídeos de membranas de fígado ou de eritrócitos leva à formação de agregados protéicos de alto peso molecular dentro da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os principais efeitos da lipoperoxidação são: diminuição da fluidez de membranas, aumento do trânsito de substâncias e íons que normalmente não atravessam a membrana (como íons Ca^{2+} , por exemplo) e inativação de enzimas ligadas à membrana (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

A contínua fragmentação das cadeias laterais de ácidos graxos leva, eventualmente à completa perda de integridade da membrana. Em membranas de lisossomos, por exemplo, esta ruptura pode levar à liberação de enzimas hidrolíticas no interior da célula, o que leva à amplificação do dano. Em membranas de eritrócitos, a lipoperoxidação pode levar à perda da sua capacidade de mudança de forma ("deformability"), necessária para sua passagem por capilares menores, levando até à hemólise (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial resulta em perda irreversível das funções mitocondriais, como respiração mitocondrial, fosforilação oxidativa e transporte de íons (VLADIMIROV *et al.*, 1980; MASINI *et al.*, 1985;

KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Pode também ser observada uma extensa fragmentação do DNA mitocondrial (mtDNA) quando a lipoperoxidação é promovida por complexos de Fe^{2+} (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Como o mtDNA codifica proteínas essenciais envolvidas no processo de fosforilação oxidativa, esta fragmentação leva à disfunção da cadeia respiratória mitocondrial, futura estimulação de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e dano oxidativo do mtDNA, numa sequência de eventos que termina na indução da apoptose celular (OZAWA, 1997).

1.4. Transição de Permeabilidade Mitocondrial:

Quando as mitocôndrias são expostas a concentrações supra-fisiológicas de cálcio na matriz, perdem a sua permeabilidade seletiva a pequenas moléculas (< 1500 Da), levando à perda de componentes de baixo peso molecular da matriz, ao desacoplamento (colapso do $\Delta\psi$) e ao inchamento mitocondrial ("swelling"). Este fenômeno é freqüentemente chamado de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998; BERNARDI, 1999).

A existência desta condição foi observada desde o início do trabalho com mitocôndrias (POTTER, 1947; LENHINGER, 1949), contudo o termo transição de permeabilidade mitocondrial induzida pelo Ca^{2+} foi primeiramente definido por HUNTER & HAWORTH (1979), após um estudo aprofundado do fenômeno. Estes autores mostraram que, juntamente com este fenômeno, ocorre uma mudança configuracional e funcional das mitocôndrias. Assim, a partir de uma forma agregada e de um estado acoplado, a mitocôndria passaria a apresentar matriz expandida e estado desacoplado.

Inúmeros compostos químicos não relacionados estruturalmente são conhecidos como agentes indutores da MPT. Entre eles, podem ser citados: agentes oxidantes de nucleotídeos de piridina (acetoacetato), geradores de espécies reativas de oxigênio (ascorbato), hidroperóxidos (*t*-butilhidroperóxido), oxidantes (diamida) ou ligantes (metais pesados e de transição e/ou seus

complexos) de grupamentos tiólicos (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Ainda podem ser citados outros compostos, como a tiroxina, a triiodotironina (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995) e citrinina (DA LOZZO *et al.*, 1998), os quais, embora seus efeitos tenham sido evidenciados, seus mecanismos de ação ainda não foram esclarecidos.

Agentes protetores da MPT também são conhecidos e são utilizados para auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação dos agentes indutores. Neste grupo, podem ser citados: nucleotídeos de adenina (ADP, ATP), ligantes do translocador de nucleotídeos de adenina, cátions divalentes (Mg^{2+} , Mn^{2+}), seqüestradores de radicais livres (como o butilhidroxitolueno - BHT), agentes redutores de grupamentos tiólicos (ditiotreitól - DTT), inibidores de fosfolipase A_2 (brometo de *p*-bromofenacila), além da ciclosporina A, a qual é também conhecida como um fármaco imunossupressor (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

A característica da MPT como um processo de “tudo-ou-nada” foi provavelmente a principal razão que convenceu HUNTER & HAWORTH a concluírem que este fenômeno não resulta de um processo degenerativo da bicamada lipídica, mas da formação/abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (m.m.i.). Esta hipótese ganhou suporte a partir dos trabalhos de CROMPTON *et al.* (1987) e CROMPTON & COSTI (1988). Os autores mostraram que a permeabilização da membrana era prontamente interrompido pela adição de EGTA e, nesta condição, a sacarose(^{14}C), a qual entrou prontamente nas mitocôndrias na condição permeável, ficou retida no seu interior. Da mesma forma, o processo de entrada de moléculas para o interior das mitocôndrias também ficou bloqueado, indicando que a organela retomou o estado impermeável característico. Desta forma, excluiu-se a possibilidade que a sacarose estaria atravessando a membrana via “defeitos de permeabilidade” devidos ao acúmulo de lisofosfolipídeos (ZORATI & SZABÒ, 1995).

Atualmente, o estudo das propriedades e regulação do poro de transição de permeabilidade (PMPT), que é especificamente inibido por doses sub-micromolares de ciclosporina A (CsA), tem merecido atenção devido ao seu papel

proposto na apoptose celular e defesa intracelular contra radicais livres derivados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MALKEVITCH *et al.*, 1997). Estudos recentes também sugerem que o PMPT pode se abrir sob condições fisiológicas, servindo como um canal de liberação de cálcio mitocondrial (WALTER *et al.*, 2000).

A impermeabilidade seletiva da m.m.i. é essencial para a manutenção do potencial de membrana e gradiente de pH que levam à síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa. Quando esta barreira de permeabilidade é rompida pela abertura do PMPT, as mitocôndrias tomam-se desacopladas e a ATPase translocadora de prótons hidrolisa ativamente ATP, ao invés de sintetizá-lo. Se este evento ocorre em uma célula, as concentrações de ATP não poderão ser mantidas, mesmo pela glicólise e, a menos que o poro se feche novamente, a célula estará destinada a morrer, pois o dano a componentes celulares causado por hipóxia e *stress* oxidativo apenas podem ser reparados se ATP estiver disponível. Assim, a MPT representa um mecanismo pelo qual a morte celular por necrose pode ser iniciada (HALESTRAP *et al.*, 1998). A injúria celular causada por isquemia e reperfusão também está relacionada ao processo de MPT (ZORATI & SZABÒ, 1995; HALESTRAP *et al.*, 1998). CASSARINO *et al.* (1999) sugeriram que os processos de MPT podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças como o mal de Parkinson. Considerando que a MPT pode ser desencadeada por alguns agentes químicos, e o amplo uso da CHX em diferentes situações clínicas em Odontologia e em outras especialidades médicas, onde se verificam possíveis alterações na membrana celular, é relevante conhecer se o mecanismo de ação deste agente envolve a transição de permeabilidade mitocondrial. Este aspecto ainda não foi explorado e permanece como uma lacuna na literatura.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Considerando o grande uso da CHX na prática odontológica, como abordado anteriormente, vários estudos sobre a bisbisguanida já foram realizados, abordando diversos aspectos e características importantes deste agente, como seu efeito antiplaca (CHRISTENSEN *et al.*, 1975; CHRISTENSEN & JENSEN, 1974; DAVIES *et al.*, 1970; JENSEN, *et al.*, 1975; LOE & SCHIOTT, 1970; MACKENZIE *et al.*, 1976; NUKI *et al.*, 1976; SCHIOTT *et al.*, 1976a; SCHIOTT *et al.*, 1976b; SCHIOTT *et al.*, 1976c; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995), suas vias e produtos de degradação (HEARD & ASHWORTH, 1968; JAMINET *et al.*, 1970; HA & CHEUNG, 1996) e alguns de seus efeitos colaterais, como displasia e hiperqueratose da mucosa oral (STEPHEN *et al.*; 1978); perda do paladar (SCHAUPP & WHONAUT, 1978; LANG *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995) e manchamento dos dentes (FLOTRA *et al.*, 1971; ERIKSEN & NORDBO, 1978; NORDBÖ *et al.*, 1983; WARNER *et al.*, 1993; ADDY *et al.*, 1995). Como a CHX é muito utilizada na prática odontológica, o objetivo geral deste trabalho é avaliar seu efeito sobre a lipoperoxidação, visto ser este um fenômeno bastante importante às membranas biológicas e que este aspecto ainda não foi estudado com relação a esta droga.

Por outro lado, as restaurações de amálgama dental (contendo Hg) são bastante comuns na prática odontológica (PHILLIPS, 1984; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Considerando os inúmeros trabalhos mostrando as consequências induzidas pela exposição ao Hg liberado de tais restaurações (BOYD *et al.*, 1991; LUND *et al.*, 1993; HULTMAN *et al.*, 1994; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; BULAT *et al.*, 1998; HULTMAN *et al.*, 1998), outro objetivo a ser alcançado é verificar a possibilidade da interação do amálgama dental com CHX, pois drogas potencialmente capazes de aumentar esta liberação de Hg de amálgama contribuiriam para exacerbar os efeitos deletérios relacionados com este metal.

2.2. Objetivos Específicos

Portanto, os objetivos específicos deste trabalho são:

- * Avaliar a interação da CHX com o ferro, a partir da análise de liberação de ferro de ferritina;

- * Verificar se a droga clorexidine apresenta ação indutora de lipoperoxidação sobre frações mitocondriais de células de fígado de rato;

- * Avaliar se a CHX pode ser considerada um agente indutor de transição de permeabilidade mitocondrial;

- * Avaliar se a CHX pode interagir com outros metais, particularmente o mercúrio, visto ser este um importante componente do amálgama de prata, material utilizado em restaurações dentais;

- * A partir de uma amostragem de 10 indivíduos, avaliar se o uso de bochechos com CHX pode estimular a liberação de Hg de restaurações de amálgama, *in vivo*, a partir de análises de saliva coletada de doadores voluntários, alunos do curso de Pós Graduação em Bioquímica da UFPR;

- * Avaliar a real diminuição bacteriana na saliva após um único bochecho com CHX (0,12%);

3. Materiais, Pacientes e Métodos

3.1. Reagentes

Digluconato de clorexidine (solução a 20%) foi gentilmente doado pela farmácia de manipulação O Formulário. As especificações de importação e certificado de análises constam do anexo I.

Caldo Müller Hinton e meio ágar-sangue foram provenientes da Merck, e sangue de carneiro, da Newprov. Demais reagentes utilizados foram do melhor grau analítico comercialmente disponível.

3.2. Preparo da Solução de CHX

A solução de CHX (0,12%) utilizada nos ensaios do presente trabalho foi preparada a partir de uma solução estoque concentrada (20%), a qual foi diluída utilizando-se água destilada estéril. Tal procedimento eliminou possíveis interferências devido à presença de outros compostos comumente presentes nas formulações de CHX disponíveis comercialmente, tais como etanol, aromatizantes ou corantes.

3.3. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, de aproximadamente 120-150g, obtidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Previamente a cada experimento, os animais foram mantidos em jejum de aproximadamente 15 horas, com água "ad libidum".

3.4. Obtenção de frações mitocondriais

As preparações mitocondriais foram obtidas de acordo com o método descrito por VOSS *et al.* (1961), com algumas modificações. Os animais foram mortos por decapitação; o fígado foi removido imediatamente e colocado no meio de isolamento gelado assim constituído: D-manitol 250mM, tampão HEPES 10mM, pH7,2, BSA 0,1%, EGTA 0,1M. O fígado foi finamente picado e homogeneizado

em homogeneizador de Van Potter Elvehjen por três vezes com pistilo frouxo e por duas vezes com o pistilo apertado. Este homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Beckman mod. J-21B) a $320 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante desta centrifugação que contém as mitocôndrias, foi novamente centrifugado a $12.600 \times g$ por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão com meio de extração e centrifugado a $8.100 \times g$ por 10 minutos. Este procedimento foi executado por duas vezes. Finalmente, o sedimento foi ressuspensão em meio idêntico ao de isolamento, ajustando-se a concentração de proteína para 75 a 90 mg.ml^{-1} . Para os experimentos de MPT, o sedimento de mitocôndrias foi ressuspensão em meio idêntico ao de isolamento, porém sem EGTA. Durante todo o processo de isolamento, o material foi mantido a uma temperatura de, no máximo, 4°C .

3.5. Determinação de Proteínas

O conteúdo protéico das suspensões de mitocôndrias foi determinado pelo método de Lowry *et al.*(1951), utilizando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

3.6. Lipoperoxidação

A reação de lipoperoxidação foi avaliada através do ensaio do ácido tiobarbitúrico, o qual mede a formação de malondialdeído, segundo o método descrito por BUEGE e AUST (1978).

Mitocôndrias ($1,0 \text{ mg prote\u00edna.ml}^{-1}$), obtidas de acordo com o procedimento já descrito, foram incubadas sob agitação a 37°C , em meio de reação, sugerido por TAKAYANAGI *et al.* (1980) com algumas modificações. O sistema apresentava volume final de 2,3 ml e era constituído de D-manitol 250mM, HEPES 10mM, pH 7,25, FeCl_3 0,2mM, na ausência e na presença de CHX. A incubação foi iniciada pela adição de 2-oxoglutarato 5mM. Alíquotas de 0,5ml da mistura foram retiradas nos tempos zero, 10, 20, 30 e 45 minutos de incubação na presença de substrato. Às alíquotas de cada tempo, foram adicionados 2ml de

reagente TBA-TCA-HCl, assim constituído: TCA 15% p/v, ácido tiobarbitúrico 0,375% e HCl 0,25N, e BHT 0,01%. A mistura foi submetida à fervura por 15 minutos em banho-maria, resfriada e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. A absorbância foi lida em 535nm, em espectrofotômetro (HITACHI mod. 2001), contra um branco, onde a fração protéica foi excluída.

A concentração de malondialdeído na amostra foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e a concentração foi expressa em $\mu\text{moles.mg proteína}^{-1}$.

3.7. Liberação de Ferro de Ferritina

Nos experimentos de liberação de ferro de ferritina, foi usada ferritina de baço de cavalo, seguindo o método de OTEIZA *et al.* (1995). Para a remoção do ferro fracamente ligado à ferritina, 200 μL de ferritina foram incubados por 1 hora a 4°C com 200 μl de tampão 20mM TRIS-HCl (pH 7,4), contendo 140mM NaCl e 10mM EDTA. A preparação foi então cromatografada em coluna de gel permeação Sephadex G-25, utilizando como eluente, tampão 20mM TRIS-HCl (pH 7,4) contendo 140mM NaCl. A concentração de proteína do eluato foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

O efeito da CHX na liberação de ferro de ferritina foi monitorado em um sistema de reação (volume final de 1 ml) contendo: tampão TRIS-HCl (20 mM), pH 7,3, NaCl (140 mM), sulfonato de batofenantrolina (1 mM), ferritina 0,3 mg.ml^{-1} , na ausência (controle) e presença de CHX em diferentes concentrações (5-100 μM), sendo a reação iniciada pela adição desta última. O tempo de incubação antes da leitura em 530nm foi de 20 minutos. Os resultados foram expressos em μmoles de Fe (II) quelado. A liberação de ferro de ferritina foi acompanhada pelo aumento na absorbância em 530nm, devido à quelação do Fe (II) liberado por sulfato de batofenantrolina.

3.8. Transição de Permeabilidade Mitocondrial

A transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) foi acompanhada como recomendado por GUNTER & PFEIFFER (1990), pelo decréscimo na absorbância a 540nm, devido ao inchamento mitocondrial estimulado por cálcio.

O meio de reação a 28°C e volume final de 1 ml era constituído de: D-manitol 250mM, tampão HEPES 10 mM (pH7,2), fosfato de potássio 0,3mM, succinato de potássio 3mM, rotenona 5µM, proteína mitocondrial (mitocôndrias acopladas) 0,5 mg.ml⁻¹, CaCl₂ 20 µM, CHX 2,5 µM. Experimentos utilizando as mesmas condições, porém na presença de CaCl₂ 50 µM e CHX 0,5 µM foram também desenvolvidos.

As seguintes adições foram feitas individualmente aos sistemas: ditioneitol (DTT) 1 mM; butilhidroxitolueno (BHT) 10 µM; EGTA 1 mM; catalase 1 µM; ciclosporina A (CsA) 0,5 µM e brometo de *p*-bromofenacila 50 µM. Após incubação destes agentes por um minuto, adicionou-se a CHX nas concentrações indicadas.

3.9. Corpos de prova de amálgama dental

Os corpos de prova de amálgama foram confeccionados a partir de duas marcas comerciais de amálgama de prata em cápsulas: GS-50 e Permite C, designadas de Marca 01 e Marca 02, respectivamente. De acordo com as especificações do fabricante, a liga da Marca 01 era constituída de: prata 40%; estanho 31,1% e cobre 28,7% e a da Marca 02, de prata 56%; estanho 27,9%; cobre 15,4%; índio 0,5% e zinco 0,2%.

Foram confeccionados 12 corpos de prova para cada marca deste material restaurador, totalizando 24 corpos de prova. Cada cápsula foi misturada, automaticamente, em amalgamador dental Dabi Atlante. O tempo de trituração do material e sua manipulação seguiram as especificações do fabricante. A liga recém-misturada foi condensada em moldes cilíndricos de teflon com cavidades idênticas de 4x8mm, de acordo com as normas especificadas pela American Dental Association, utilizando-se, para isso, condensadores manuais

convencionais. O excesso de Hg que eventualmente surgiu nos corpos de prova ao final da condensação foi criteriosamente removido com papel absorvente.

Os espécimes foram mantidos nos moldes para presa inicial por 60 minutos e então removidos e mantidos em recipiente fechado para evitar excessiva oxidação do material. Segundo o método descrito por ROTSTEIN *et al.* (2000), estes corpos de prova foram mantidos sem nenhum tipo de polimento. A Figura 6 mostra o molde utilizado e os corpos de prova obtidos das suas respectivas marcas comerciais.

3.10. Triagem e coleta de dados dos sujeitos objetos de estudo

Foram selecionados 10 indivíduos para os ensaios deste estudo, todos apresentando bom estado geral de saúde. Deste grupo, 05 eram do sexo feminino com idades entre 22-29 anos, e 05, do masculino com idades entre 23-30 anos. Todos eram alunos do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Um critério importante para a seleção de tais indivíduos foi a presença de, pelo menos, 04 restaurações de amálgama de 01 face em dentes posteriores. Nenhum deles relatou fazer uso de medicamentos sistêmicos e/ou colutórios bucais rotineiramente.

Todos os participantes receberam informação detalhada a respeito do estudo a ser desenvolvido bem como seus benefícios e possíveis danos associados ao uso da CHX. Em seguida, assinaram o Termo de Consentimento (anexo II), o qual foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (anexo III). A condição oral dos participantes foi avaliada com auxílio de espátula de madeira e iluminação portátil. O registro dos indivíduos foi realizado utilizando-se o formulário sugerido pela OMS, como mostrado no anexo IV. Tal formulário incluía itens como: nível educacional, índice CPO, índice de amálgama, índice gengival e presença de lesões na mucosa. Os participantes foram então orientados a não consumir nenhum tipo de bebida e/ou alimento por, pelo menos, duas horas antes da coleta.

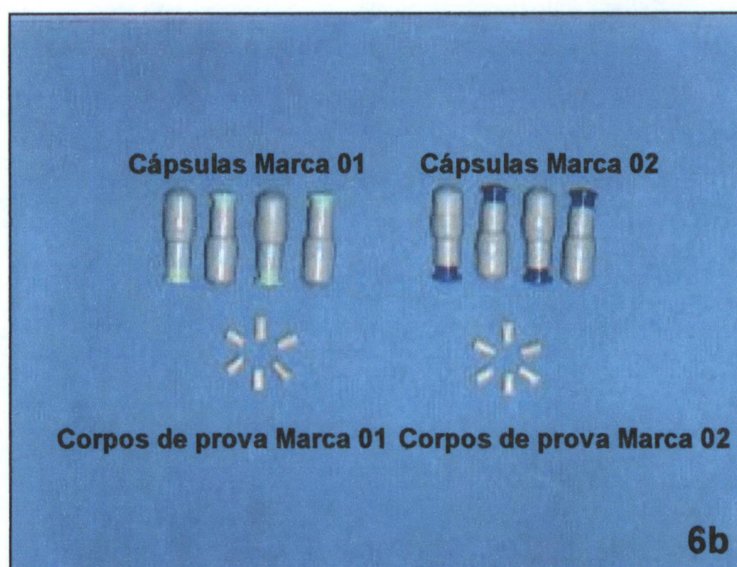


Figura 6: Corpos de prova de amálgama

Figura 6a: Molde de teflon usado para confecção dos corpos de prova.
Figura 6b: Cápsulas de amálgama das marcas 01 e 02 utilizadas e seus respectivos corpos de prova.

3.11. Coleta de amostras de saliva

3.11.1. Coleta de saliva para ensaio de detecção de Hg

A saliva que posteriormente seria utilizada nos ensaios de detecção de Hg foi coletada em copos de becker de plástico previamente tratados por 12 horas com solução de ácido nítrico a 5%. Este procedimento foi feito a fim de se evitar que o possível Hg presente nas amostras pudesse se aderir às paredes do recipiente, interferindo, desta forma, nos resultados.

Os indivíduos doaram, aproximadamente, 2,5ml de saliva antes (controle) do bochecho com CHX e bochecharam então, 10ml de uma solução de CHX a 0,12%, durante 1 minuto. A saliva produzida durante o primeiro minuto subsequente ao bochecho foi desprezada e a partir de então, foram coletados novamente 2,5ml de saliva em um outro becker.

3.11.2. Coleta de saliva para testes microbianos

A saliva que posteriormente seria usada para os testes microbiológicos foi coletada em procedimento paralelo ao descrito no item anterior, porém coletando-se as amostras em tubos cônicos previamente esterilizados.

3.12. Liberação de Hg de Corpos de Prova de Amálgama Dental

O ensaio de liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama foi realizado conforme o método descrito por ROTSTEIN *et al.* (2000). Os 24 corpos de prova previamente preparados foram divididos randomicamente em dois grupos – controle (06) e teste (06), para cada marca comercial. Cada corpo de prova foi colocado individualmente em um tubo de ensaio contendo 5ml de solução de fosfato (0,1M) tamponada a pH 6,5 (controles) ou 5ml da mesma solução contendo CHX a 0,12% (testes). Estes sistemas foram incubados por 24 horas a 37°C, após o que a solução de incubação foi utilizada para a dosagem de mercúrio. A dosagem de Hg liberado foi feita conforme o método descrito por HATCH & OTT (1968), por espectrometria de absorção atômica (Atomic

Absorption Spectrometer, PERKIN ELMER 4100). Estas dosagens foram realizadas no Lactec-UFPR/Copel.

3.13. Liberação de Hg de restaurações de amálgama dental

As amostras salivares (1ml) coletadas antes e após o bochecho com CHX (0,12%) em beakers previamente preparados como já descrito, foram analisadas para a presença de Hg da mesma forma que para os corpos de prova de amálgama, segundo o método descrito por HATCH & OTT (1968), por espectrometria de absorção atômica. Estas dosagens também foram realizadas no Lactec-UFPR/Copel.

3.14. Atividade Antimicrobiana da CHX Após um Único Bochecho

As amostras de saliva coletadas nos tubos cônicos estéreis foram semeadas em meio líquido enriquecido (Caldo Müller Hinton) e em meio sólido constituído de ágar-sangue, este, um meio de cultura específico para estreptococos (BIER, 1994). O inóculo utilizado foi de 500 μ l e 1 μ l de saliva para os meios líquido e sólido, respectivamente. O desenvolvimento das culturas ocorreu a 37°C por 24 horas, após o que o crescimento bacteriano foi avaliado.

As culturas desenvolvidas em meio líquido foram avaliadas por turbidimetria (espectrofotômetro HITACHI mod. 2001) a 405nm, utilizando-se como padrão, o tubo número 05 da escala de McFarland, que é equivalente a 1500×10^6 células/ml. As culturas desenvolvidas no ágar-sangue foram avaliadas apenas por comparação qualitativa quanto ao crescimento bacteriano ocorrido a partir das amostras coletadas antes (controle) ou após o bochecho com CHX.

3.15. Análises Estatísticas

Os resultados dos experimentos de liberação de ferro de ferritina e lipoperoxidação foram expressos como média \pm desvio padrão (md \pm dp) e submetidos à análise de variâncias (ANOVA) e teste de Tukey.

Os resultados dos experimentos de dosagem de Hg a partir dos corpos de prova de amálgama foram expressos como $md \pm dp$ e submetidos à análise pelo teste-t, presumindo variâncias equivalentes.

Os resultados dos experimentos de dosagem de Hg a partir de restaurações de amálgama foram expressos como $md \pm dp$ e submetidos a análise pelo teste-t pareado. Os resultados das avaliações do crescimento bacteriano em meio líquido foram analisados pelo teste-t presumindo variâncias equivalentes.

Para a análise do índice CPO foi realizado o teste de proporções, pelo método não paramétrico de correlação de Spearman ("Spearman Rank R"), com o uso do pacote estatístico "statistics" (Statsoft).

O valor do índice gengival (IG) para sexo, bem como o índice de amálgama para sexo, foram testados pelo método não paramétrico U de Mann-Witney, com $Z_c = \pm 1,96$ (teste bilateral).

Para as análises entre índice de amálgama e liberação de Hg de restaurações de amálgama e entre índice de amálgama e crescimento bacteriano após bochecho com CHX (0,12%), foram utilizadas análises de correlação de Pearson.

Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Liberação de ferro de ferritina por CHX

A ferritina, como uma proteína de armazenamento de ferro, é uma molécula-chave no metabolismo deste metal. Ela mantém o ferro sob a forma na qual ele pode ser facilmente mobilizado, quando e onde é requerido (FUNK *et al.*, 1985). A mobilização inadequada do ferro induz o *stress* oxidativo, levando à lipoperoxidação, ao dano oxidativo de proteínas e de DNA e, possivelmente, desempenha um papel importante na carcinogênese ferro-induzida (TOYOKUNI, 1996). Portanto, a ferritina contribui para a proteção da célula contra a toxicidade envolvendo ERO, formadas por ação de íons de ferro e de peróxidos; o Fe^{3+} de ferritina pode ser reduzido por vários radicais como ânion superóxido e semiquinona, ser liberado como Fe^{2+} e, desta forma, promover injúria oxidativa (ROCHA *et al.*, 2000).

Considerando os dados da literatura, que sugerem a interação da CHX com metais, constituintes da placa bacteriana como ferro e enxofre (ELLINGSEN *et al.*, 1982; NORDBÖ *et al.*, 1982; WARNER *et al.*, 1993), a possibilidade de liberação de ferro de ferritina por ação da CHX foi avaliada. Os resultados estão apresentados na figura 6. Verifica-se que a liberação de ferro de ferritina é estimulada por CHX de maneira dose-dependente e para todas as concentrações utilizadas o aumento da liberação de ferro, em relação ao controle, foi significativo ($p < 0,05$), sendo que na dose de 100 μM , este aumento foi de cerca de 13 vezes. Essa liberação de ferro pode ter ocorrido por ação redutora da CHX sobre o núcleo mineral da proteína, uma ação direta deste agente sobre a proteína, por uma ação quelante da CHX sobre a ferritina ou uma combinação destas alternativas. Portanto, a possibilidade de que este ferro liberado seja utilizado para gerar radicais livres capazes de promover injúria oxidativa em componentes celulares não pode ser descartada (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Estes dados são importantes, visto a grande utilização da CHX na prática odontológica,

cujo uso em soluções de bochecho para uso oral situa-se na faixa milimolar de concentração.

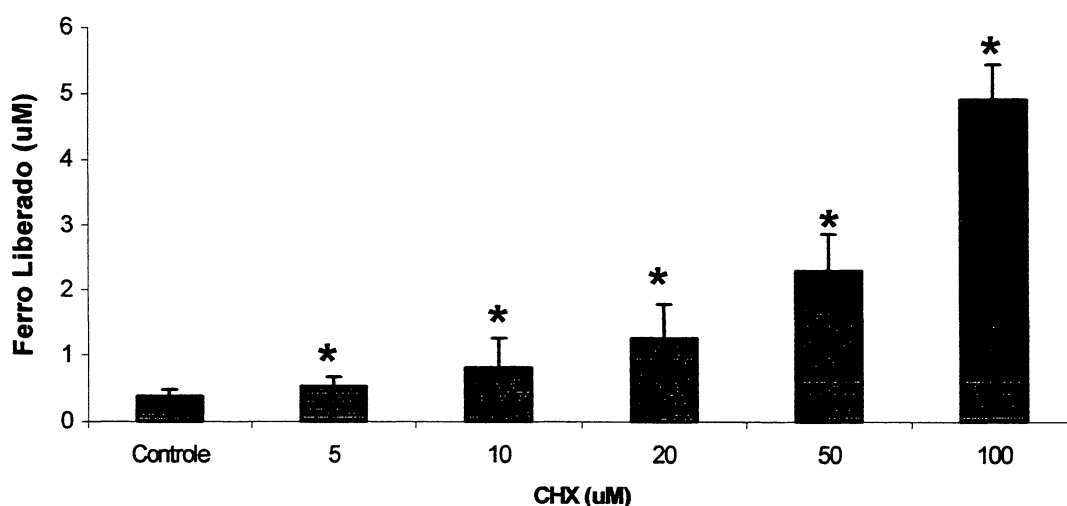


Figura 7: Liberação de ferro de ferritina

Sistema de reação: tampão TRIS-HCl (20mM), NaCl (140mM), sulfonato de batofenantrolina (1mM), 0,3 mg ferritina/mL e CHX nas concentrações indicadas, para dar início à reação. Os resultados foram obtidos acompanhando-se a formação do complexo Fe^{2+} /batofenantrolina ($\epsilon_{530}=22,14 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$) a 530 nm, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Volume final: 1mL. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n=6). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,05).

Aspecto interessante de ser mencionado é a existência de proteína ligante de ferro na cavidade oral, constituinte da saliva: a lactoferrina. Esta proteína exerce função antibacteriana por meio de sua habilidade de ligar ferro tão avidamente que esgota o meio deste mineral (LINDHE, 1992; JORGE, 1995). Neste trabalho, não foram desenvolvidos experimentos visando avaliar a possibilidade de efeitos da CHX sobre esta proteína. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que a CHX possa também liberar ferro de lactoferrina. Neste caso, a utilização de agentes que induzem a liberação de ferro, como a

CHX, permite não apenas a disponibilidade deste metal para o meio, onde ele poderá exercer todos os efeitos já descritos, mas também inibe ou reverte a função protetora exercida pelas proteínas ligantes de ferro, como a ferritina (neste estudo) e, possivelmente a lactoferrina (na cavidade oral), por ação da CHX.

A partir destes resultados, outras duas questões importantes foram verificadas: se a CHX poderia agir como agente indutor de lipoperoxidação e de MPT; o primeiro processo, por ser dependente de ferro e o segundo, por ser geralmente induzido por ERO. Finalmente, uma importante questão, de conseqüências mais diretamente relacionadas à clínica odontológica foi também avaliada: se a CHX poderia interagir com outros metais, como por exemplo, a liga de amálgama dental, um importante material restaurador.

4.2. Lipoperoxidação estimulada por CHX

Considerando que a CHX é capaz de liberar ferro de ferritina, a avaliação de seu efeito sobre a lipoperoxidação ferro-induzida é relevante, tendo visto a importância deste processo nos sistemas biológicos (VLADIMIROV *et al.*, 1980; MASINI *et al.*, 1985; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Para estes estudos, utilizaram-se concentrações inferiores àquelas de uso clínico. Os resultados mostrados na figura 8A foram obtidos na presença de 23 μ M da droga, que é equivalente a uma concentração 60 vezes menor que a utilizada corriqueiramente na prática odontológica.

Verifica-se que a CHX estimula a lipoperoxidação mitocondrial ferro-induzida (Figura 8A), visto o aumento na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este estímulo foi de 100% aos 45 minutos do experimento e foi significativo ($p < 0,05$) a partir de 20 minutos. O papel do ferro na lipoperoxidação estimulada por CHX pôde ser confirmado quando da adição de o-fenantrolina, um agente quelante deste metal, o qual inibiu completamente o efeito da CHX no processo (Figura 8B). Este quelante também levou à diminuição da lipoperoxidação, mesmo na ausência do agente indutor (CHX), visto ser este um

processo dependente de ferro. Nestas condições, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratamento com CHX (23 μ M).

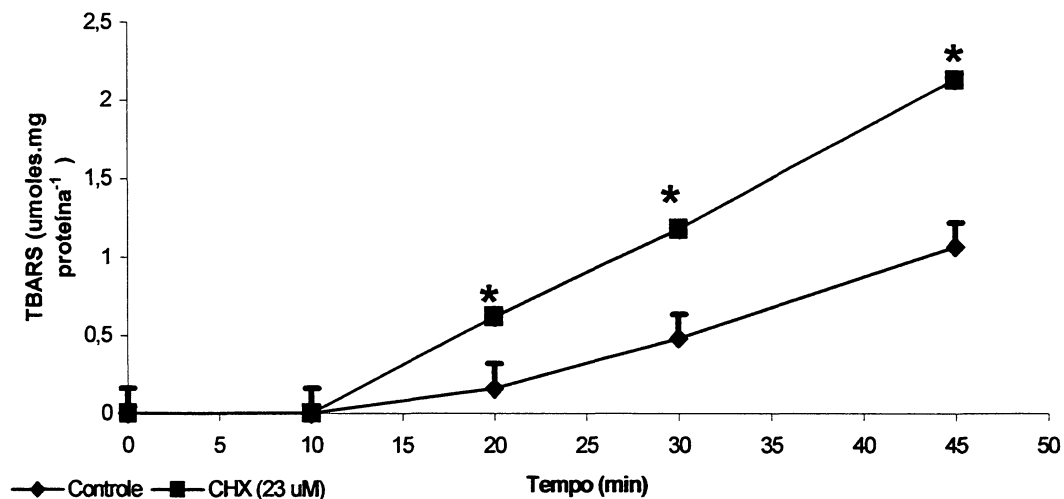


Figura 8A: Efeito da CHX (23 μ M) na lipoperoxidação ferro-induzida.

Sistema: D-manitol (250mM), tampão HEPES (10mM), pH 7,2, FeCl₃ (0,2mM), e 2-oxoglutarato (5mM), para iniciar a reação, na presença ou ausência da droga. O estímulo da lipoperoxidação é seguido pelo aumento na absorvância ($\epsilon_{535}=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), num volume final de 2,3ml à temperatura de incubação de 37°C. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n= 4) * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

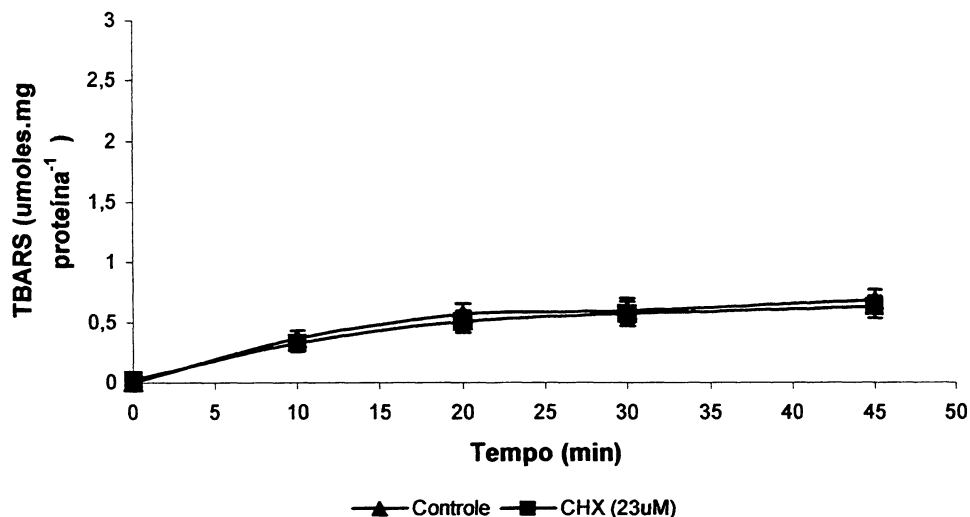


Figura 8B: Efeito da CHX (23 μM) na lipoperoxidação ferro-induzida na presença de o-fenantrolina.

Sistema: D-manitol (250mM), HEPES (10mM), pH 7,25, FeCl_3 (0,2mM), o-fenantrolina (600 μM) e 2-oxoglutarato (5mM), para iniciar a reação, na presença ou ausência da droga. O estímulo da lipoperoxidação é seguido pelo aumento na absorvância ($\epsilon_{535}=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), num volume final de 2,3ml, à temperatura de incubação de 37°C. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n= 3).

4.3. Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPT) induzida por CHX

Suspensões mitocondriais são turvas e dispersam a luz incidente. A luz dispersa é função da diferença no índice de refração entre a matriz e o meio, e qualquer processo que cause decréscimo desta diferença resultará em decréscimo na dispersão de luz. O aumento do volume da matriz mitocondrial pelo influxo de solutos permeáveis, resultará em decréscimo na dispersão de luz, com o índice de refração da matriz aproximando-se ao do meio (NICHOLLS & AKERMAN, 1982). Esta propriedade das mitocôndrias fornece um método qualitativo eficiente para estudar o fluxo de solutos através da m.m.i. O inchamento mitocondrial pode ser usado para monitorar a MPT (GUNTER & PFEIFFER, 1990).

Nos ensaios do presente estudo, a MPT foi avaliada em duas situações experimentais: uma, utilizando a concentração de 20 μM de cálcio e outra utilizando 50 μM de cálcio. Em ambos os casos, a concentração não atinge as das condições encontradas na cavidade bucal, onde a concentração de cálcio pode atingir 3 mM (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995) e onde a droga é utilizada. Os experimentos cujos resultados estão mostrados nas figuras 9A e 9B foram planejados com a finalidade de determinar o efeito da CHX em preparações mitocondriais energizadas, porém na ausência de cálcio (figura 9A) ou na presença deste íon (figura 9B).

Verifica-se na figura 9A que concentrações de CHX até 5 μM não levam ao inchamento mitocondrial, na ausência de cálcio adicionado ao sistema. Entretanto, 10 μM de CHX é suficiente para causar o inchamento mitocondrial, também na ausência de cálcio adicionado, o que sugere uma permeabilização da membrana por dano causado pela droga. Porém não se pode excluir a possibilidade de que este inchamento possa ser decorrente da existência de algum cálcio endógeno ou contaminante da preparação. Na figura 9B, verifica-se que concentrações superiores de cálcio no meio (50 μM), e baixas concentrações de CHX (0,5 μM) já são suficientes para ocasionar inchamento mitocondrial de grande amplitude; efeito que não se verifica quando a concentração de cálcio é de 20 μM . Assim, as condições experimentais subseqüentes utilizaram a concentração máxima de CHX igual a 0,5 μM e 2,5 μM , quando as concentrações de cálcio eram de 50 μM e 20 μM , respectivamente.

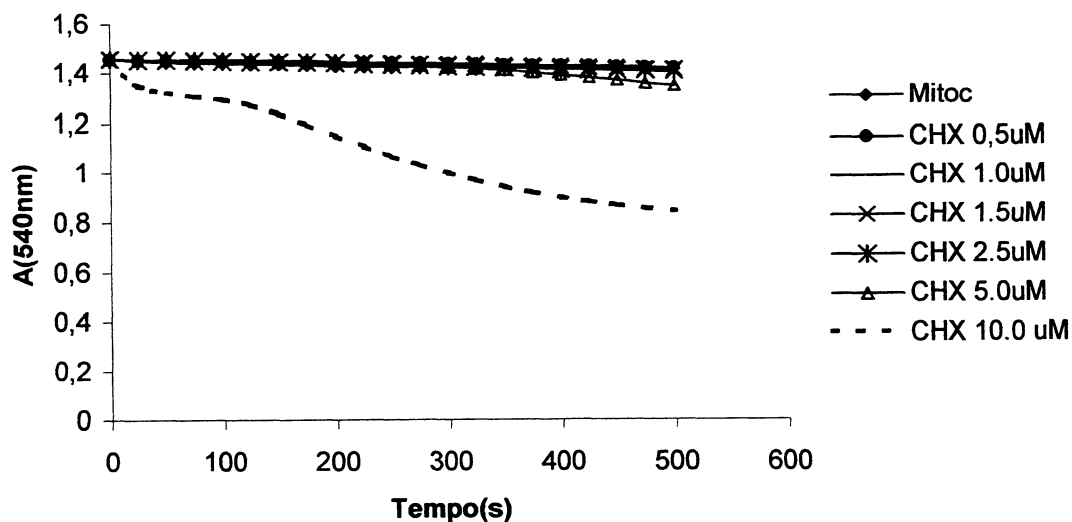


Figura 9A: Efeito das diferentes concentrações de CHX nas mitocôndrias. Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μ M; proteína mitocondrial 0,5 mg.mL⁻¹ e CHX nas concentrações indicadas. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8).

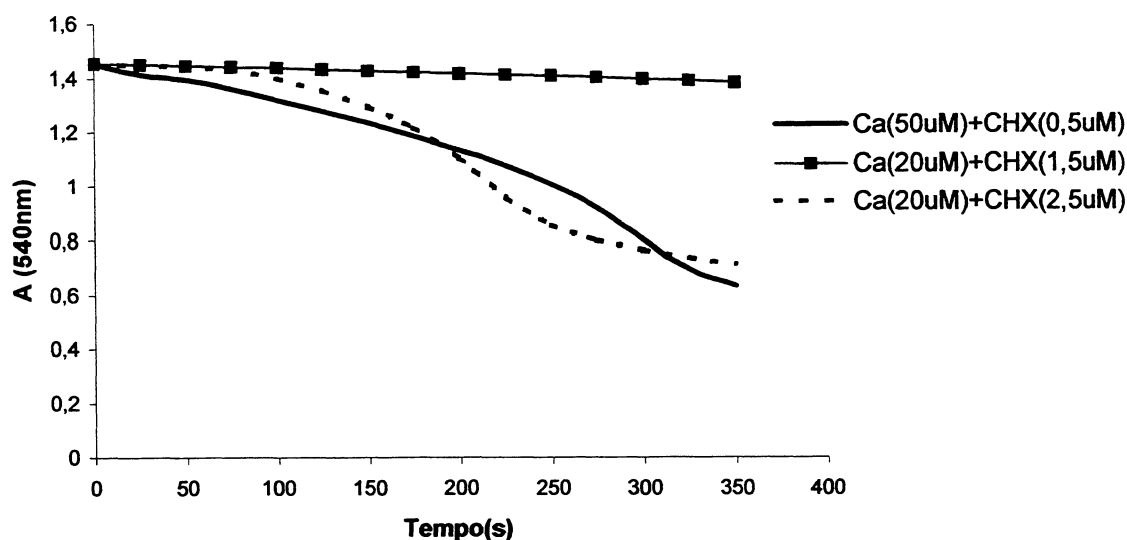


Figura 9B: Efeito das diferentes concentrações de CHX nas mitocôndrias, em presença de cálcio.

Sistema idêntico ao descrito para a figura 9A, mas na presença de cálcio, nas concentrações indicadas. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8)

Alguns agentes químicos têm reconhecido efeito indutor da MPT; entre estes, destaca-se a diamida, que foi utilizada no presente trabalho como parâmetro de controle de efeito positivo da ocorrência da MPT. A diamida é um reagente que atua sobre grupamentos tiólicos, que apresenta caráter hidrofílico. Este composto tem sido útil no estudo do mecanismo de MPT dependente da oxidação de grupos tióis (KOWALTOWSKI *et al.*, 1997).

A figura 10A mostra o efeito da CHX (0,5 μM) na MPT, utilizando 50 μM de cálcio. O traçado b da figura 10A mostra o inchamento mitocondrial de grande amplitude causado pela CHX, comparável àquele causado pela diamida (300 μM) (traçado c da mesma figura). Vale enfatizar que a concentração utilizada de CHX foi muito inferior àquela utilizada clinicamente (1,34 mM), sugerindo ser a CHX um agente potente e eficaz na indução da MPT. A figura 10B mostra o efeito da CHX (2,5 μM) na MPT, na concentração de 20 μM de cálcio. Chama a atenção que, nesta condição, o inchamento mitocondrial iniciou-se aos 350 segundos, isto é, em um intervalo de tempo mais longo que na concentração de 50 μM de cálcio (125 segundos; figura 10A). O resultado sugere que a MPT desencadeada por CHX é dependente da concentração de cálcio e, em baixas concentrações deste íon, o processo é também dependente do tempo.

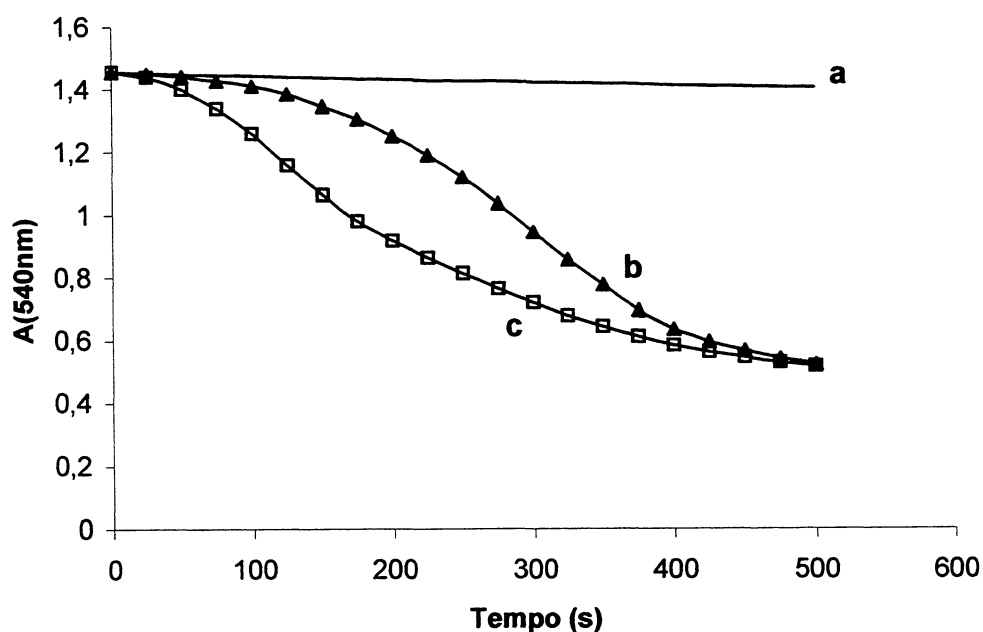


Figura 10A: Efeito da CHX (0,5 μM) ou da diamida (300 μM) na MPT, em presença de cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM e CHX ou diamida, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes

a: Mit. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: Diamida (300 μM) + CaCl_2 (50 μM)

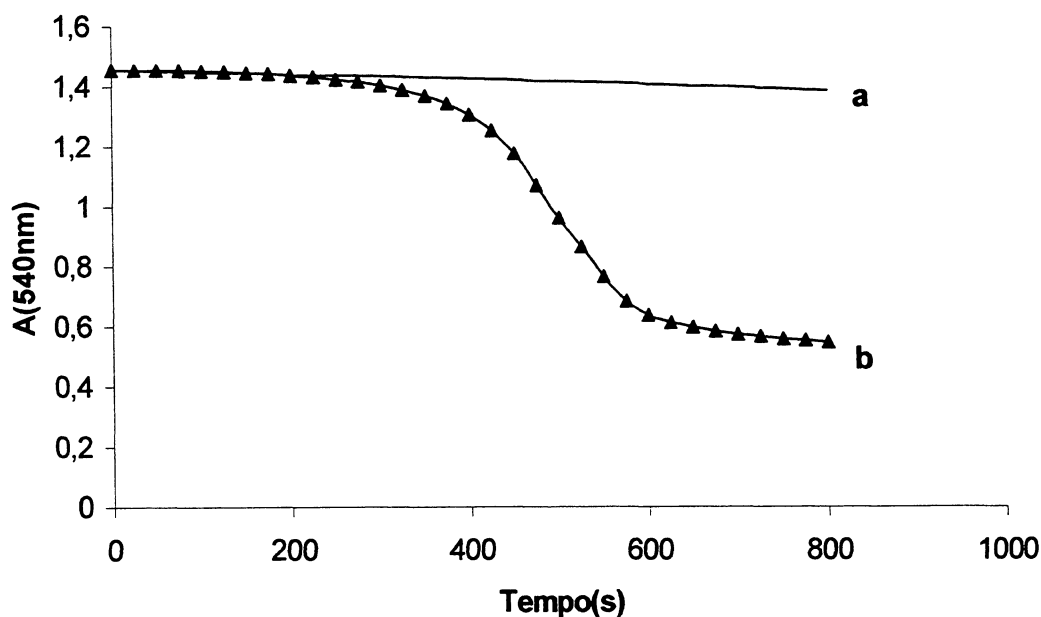


Figura 10B: Efeito da CHX (2,5 µM) na MPT, em presença de cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 µM; proteína mitocondrial 0,5 mg.ml⁻¹; CaCl₂ 20 µM e CHX 2,5 µM, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (2,5 µM) + CaCl₂ (20 µM)

FAGIAN *et al.* (1990) apresentaram evidências de que a MPT induzida por Ca²⁺ e diamida está associada com a formação de agregados protéicos devido a ligações cruzadas de grupamentos tiólicos (-SH). Demonstraram também que tanto o processo de permeabilização quanto o de polimerização podiam ser revertidos pela adição de ditioneitol (DTT), um conhecido agente redutor de grupos dissulfeto. Assim, no presente estudo o DTT (1mM) foi utilizado para avaliar se o efeito da CHX na MPT envolveria grupos -SH. Observando-se o traçado c das figuras 11A e 11B, verifica-se que, tanto na condição de 50 µM de cálcio (figura 11A) quanto na presença de 20 µM deste íon (figura 11B), o DTT inibiu o inchamento mitocondrial ocasionado por CHX, sugerindo, portanto, que o mecanismo pelo qual a CHX causa aumento da permeabilidade da m.m.i. na

presença de Ca^{2+} é dependente de grupos $-\text{SH}$ nas condições experimentais utilizadas. Evidências de interação da CHX com grupos químicos contendo enxofre foi previamente relatada por WARNER *et al.* (1993), que associaram a CHX com a maior incorporação de proteínas contendo enxofre na placa bacteriana, correlacionando este aumento ao processo de manchamento dental associado ao uso de CHX.

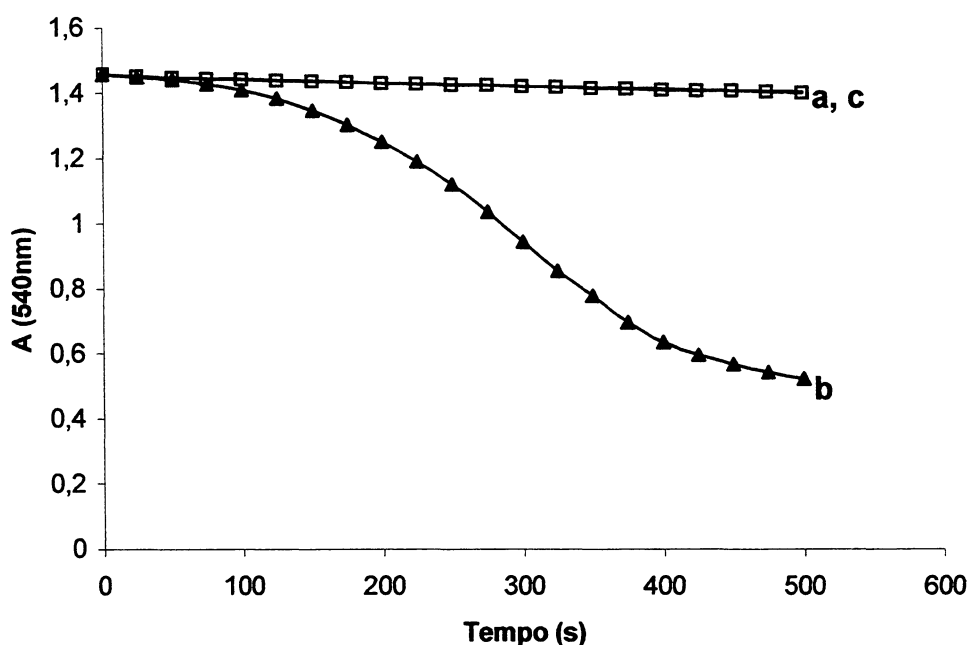


Figura 11A: Efeito do ditioneitol (DTT) na MPT em presença de CHX e cálcio. Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM , CHX 0,5 μM e DTT 1 mM, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: DTT (1 mM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

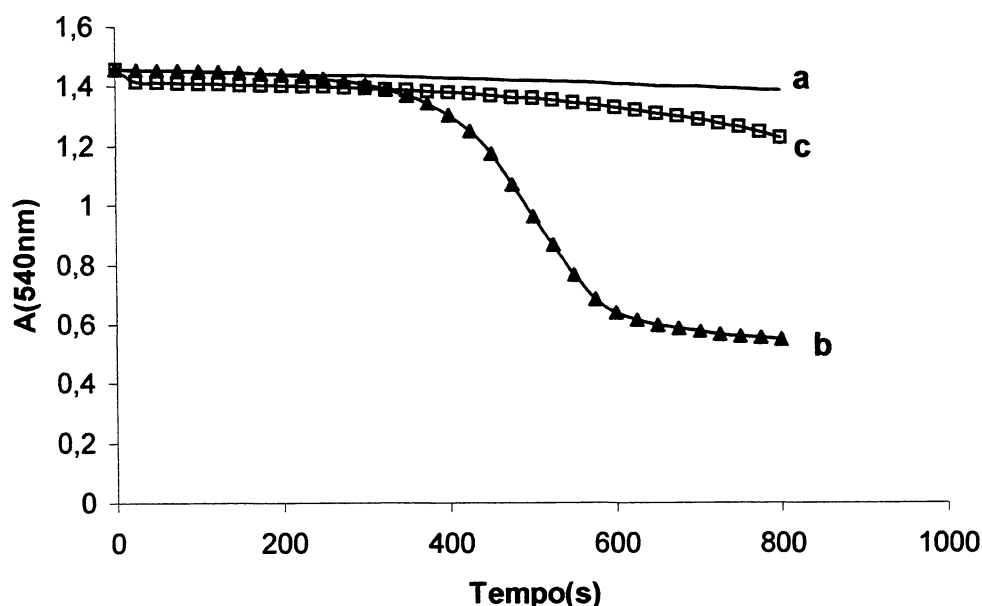


Figura 11B: Efeito do ditioneitol (DTT) na MPT em presença de CHX e cálcio. Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM , CHX 2,5 μM e DTT 1 mM, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)
c: DTT (1 mM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

Um outro procedimento freqüentemente utilizado nos estudos de MPT é a adição de EGTA, agente capaz de impedir ou reverter a transição de permeabilidade, respectivamente se é adicionado antes ou após a MPT ter ocorrido. O EGTA impede a captação de Ca^{2+} pela matriz de mitocôndrias intactas ou fecha os poros daquelas recentemente permeabilizadas (GUNTER *et al.*, 1994). Nas figuras 12A e 12B, observa-se que a MPT estimulada por CHX foi totalmente inibida por EGTA (1 mM), o qual foi incubado com as mitocôndrias e o Ca^{2+} antes da adição de CHX, confirmando a observação de GUNTER *et al.* (1994) e ressaltando a importância do cálcio na indução da MPT por CHX.

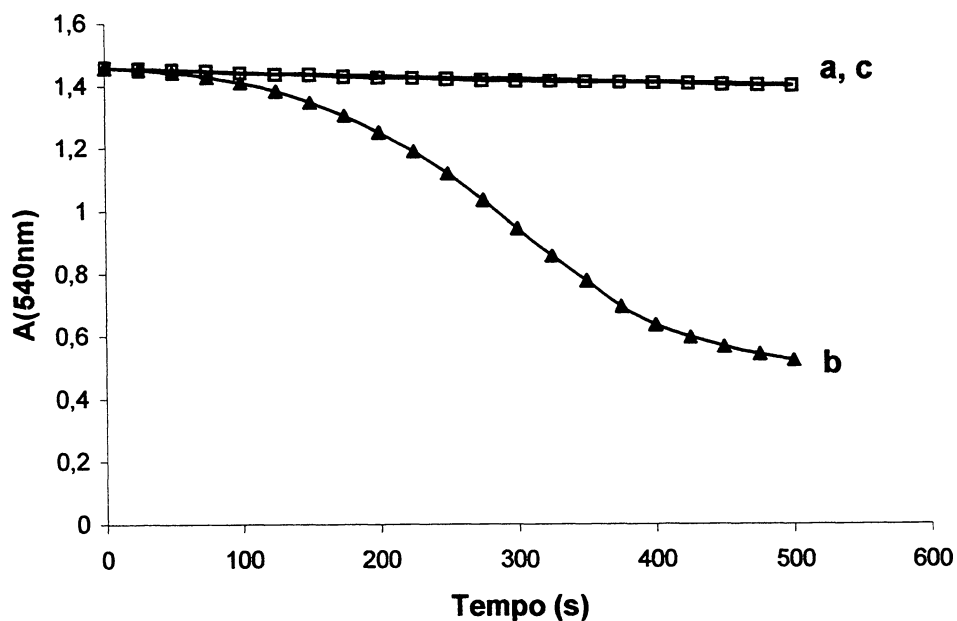


Figura 12A: Efeito do EGTA na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM , CHX 0,5 μM e EGTA 1 mM, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mít. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: EGTA (1 mM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

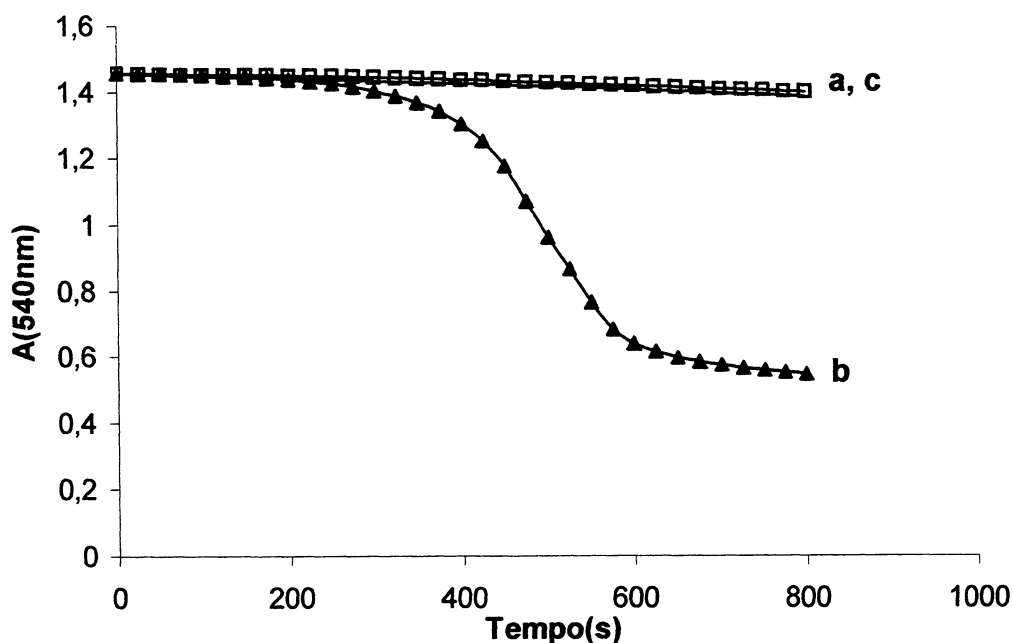


Figura 12B: Efeito do EGTA na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM , CHX 2,5 μM e EGTA 1 mM, como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)
 c: EGTA (1 mM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

A ciclosporina A (CsA), um peptídeo cíclico usado como agente imunossupressor, é um inibidor altamente específico da MPT. Este composto é igualmente eficiente, independentemente de qual agente indutor tenha sido empregado, embora o mecanismo exato de sua ação não seja conhecido. A CsA parece atuar através de sua ligação a sítios mitocondriais com uma constante de afinidade de 10^9 M. A CsA tem sido usada em investigação do mecanismo e do significado fisiológico da transição (GUNTER & PFEIFFER, 1990). Experimentalmente a inibição do inchamento mitocondrial pela CsA representa uma maneira de se sugerir que o aumento da permeabilidade da membrana é

mediado pelo poro de transição de permeabilidade (PMPT) (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

A concentração recomendada e na qual a CsA exerce seus efeitos é bastante baixa, em níveis submicromolares. Como pode ser observado nas figuras 13A e 13B, a CsA (0,5 μM) inibiu completamente o efeito da CHX nas condições utilizando 50 μM e 20 μM de cálcio, respectivamente. BERNARDI *et al.* (1992) relataram que a inibição da abertura do poro conferida pela CsA é afetada por altas concentrações de Ca^{2+} . Assim, altas concentrações de CsA seriam necessárias quando a concentração de Ca^{2+} estivesse aumentada, sugerindo que o Ca^{2+} ligado poderia influenciar na afinidade de ligação da CsA ao seu ligante. No presente estudo, 50 μM de cálcio não foi suficiente para interferir no efeito inibidor da CsA sobre a MPT induzida por CHX. Os resultados obtidos com ambas as concentrações de cálcio foram, portanto, bastante semelhantes, em baixa concentração de CsA.

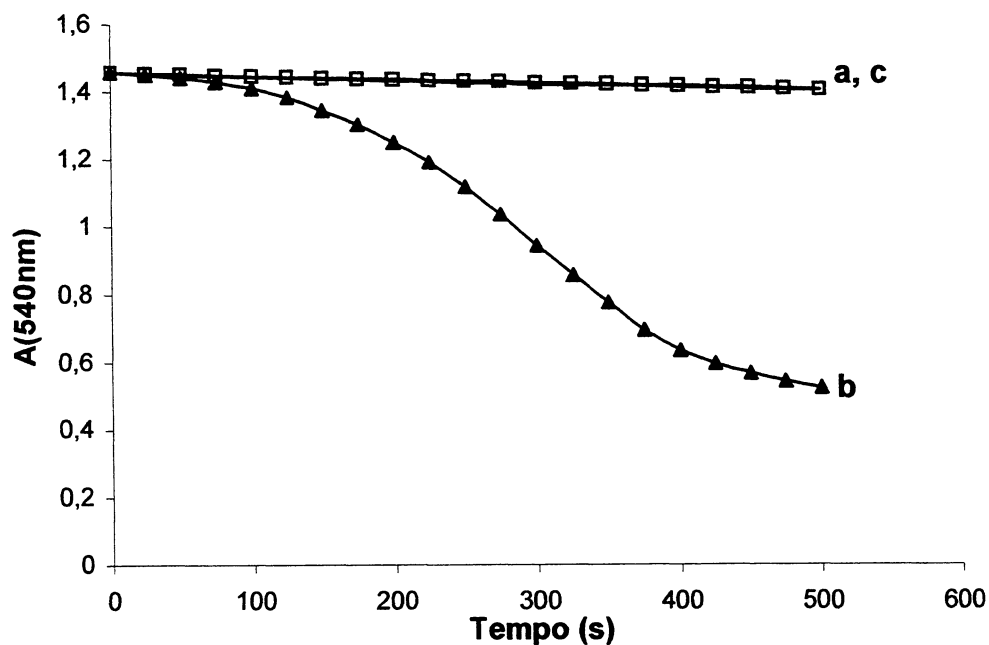


Figura 13A: Efeito da ciclosporina A (CsA) na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM ; CHX 0,5 μM e CsA 0,5 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: CsA (0,5 μM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

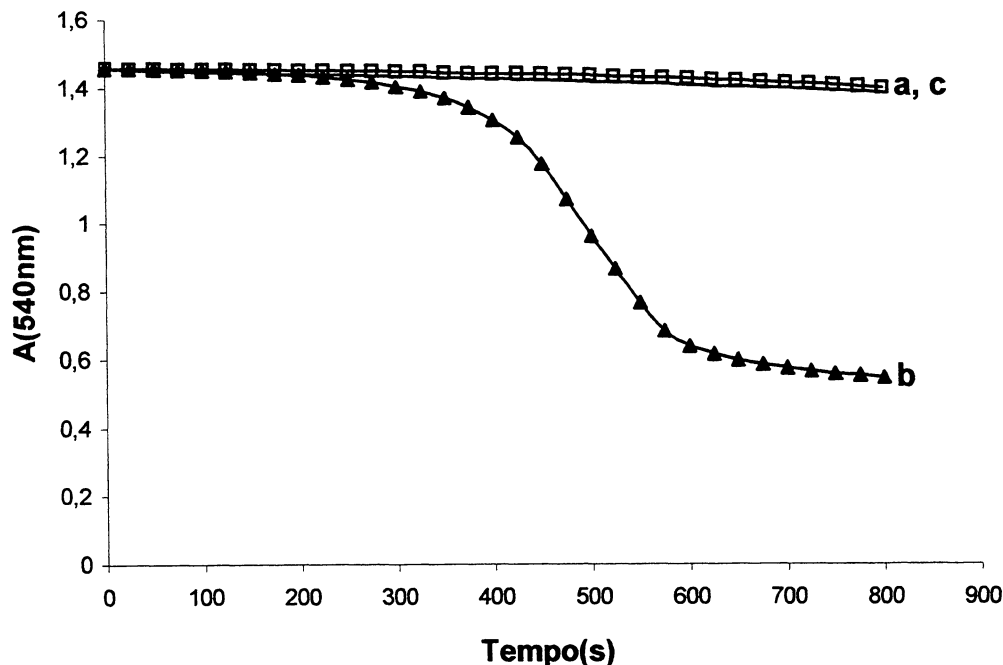


Figura 13B: Efeito da ciclosporina A (CsA) na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM ; CHX 2,5 μM e CsA 0,5 μM . Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)

c: CsA (0,5 μM) + CaCl_2 (20 μM) + CHX (2,5 μM)

A participação de lipoperóxidos e lisofosfolídeos na MPT é controversa (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Lisofosfolídeos são produtos da ação da fosfolipase A_2 , enzima inibida por brometo de *p*-bromofenacila. Com a finalidade de correlacionar a ação da fosfolipase A_2 no processo de MPT induzida por CHX, este agente foi utilizado neste trabalho na concentração de 50 μM , considerada relativamente alta. Os resultados das figuras 14A e 14B mostram que este agente não inibiu a ação da CHX sobre as mitocôndrias, tanto na concentração de 50 μM

de cálcio quanto na concentração de 20 μM do íon. Portanto, o efeito da CHX não parece ser dependente da formação de lisofosfolídeos.

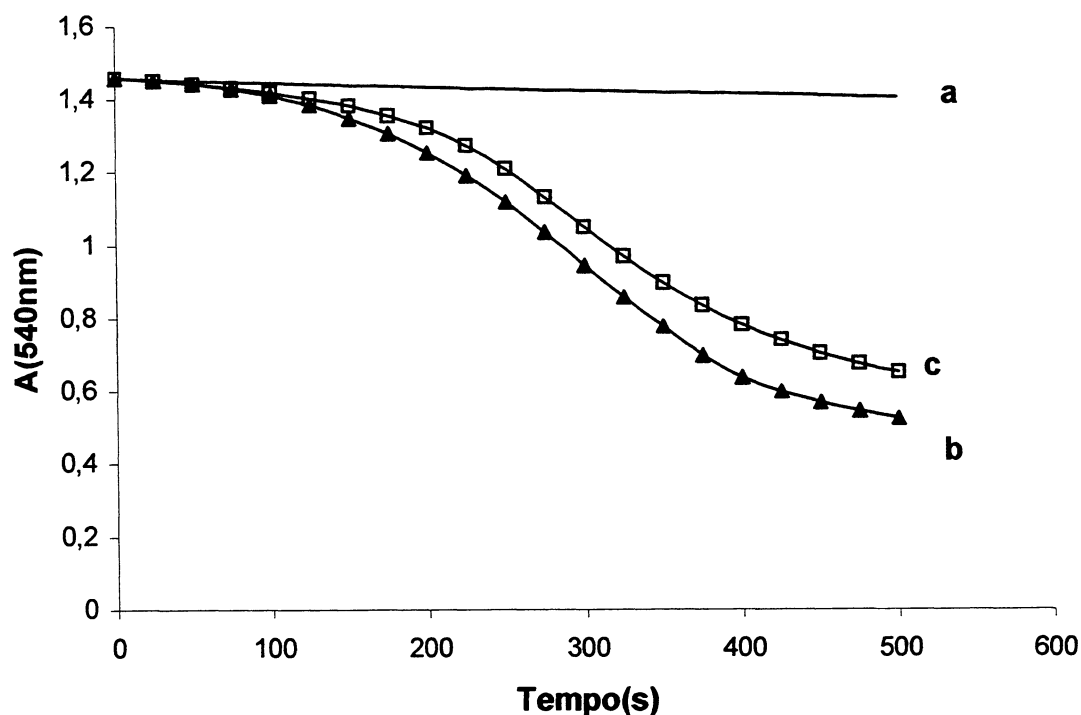


Figura 14A: Efeito do brometo de *p*-bromofenacila na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM ; CHX 0,5 μM e brometo de *p*-bromofenacila 50 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: brometo de *p*-bromofenacila (50 μM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

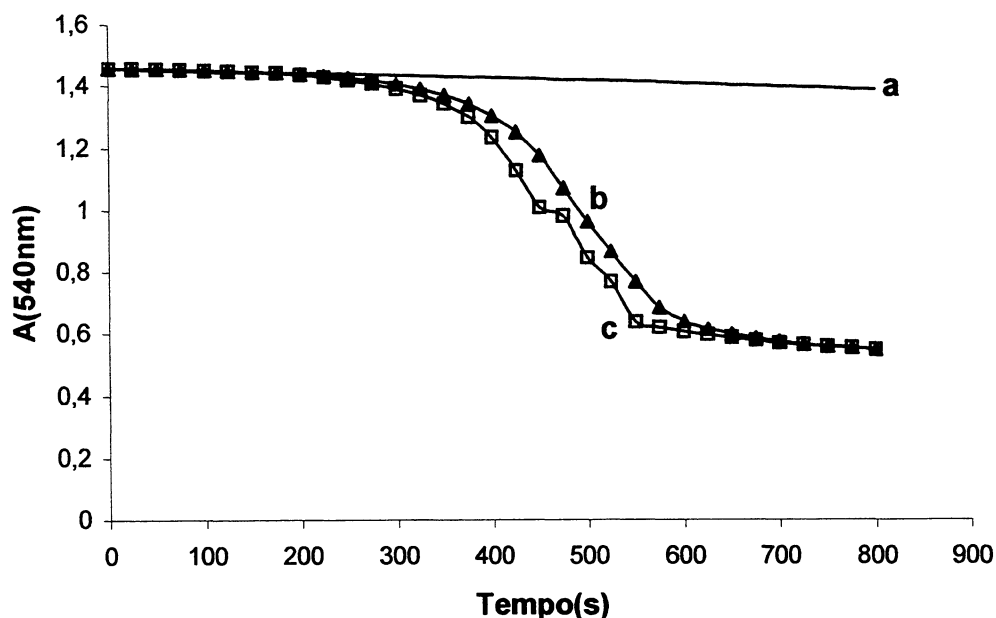


Figura 14B: Efeito do brometo de *p*-bromofenacila na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM ; CHX 2,5 μM e brometo de *p*-bromofenacila 50 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)

c: brometo de *p*-bromofenacila (50 μM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

Os agentes seqüestradores de radicais livres também são utilizados no estudo do mecanismo da MPT (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Entre os agentes seqüestradores de radicais livres, o BHT é o mais freqüentemente utilizado. Seu efeito protetor indica que a permeabilização induzida na presença de Ca^{2+} envolve processos com formação de radicais (ZORATTI & SZABÒ, 1995). De acordo com CARBONERA & AZZONE (1988), o BHT tem um efeito protetor no dano induzido por Ca^{2+} mais hidroperóxidos, diamida ou fosfato, sugerindo uma sobreposição, ao menos parcial, no mecanismo de ação destes indutores. Os resultados dos experimentos mostrados nas figuras 15A e 15B indicam que, nas condições experimentais utilizadas, o BHT (10 μM) não inibiu a MPT estimulada por CHX. Estes dados sugerem que esta droga, portanto, induz a MPT por outros

mecanismos, não envolvendo a formação de radicais livres que reagem com BHT, apesar do seu envolvimento em processos de lipoperoxidação (figura 8A). Porém, deve-se ressaltar que nos experimentos onde o estímulo da lipoperoxidação foi observado, a concentração de CHX utilizada foi de 23 μM , portanto, muito superior às concentrações em que a MPT ocorre. Além disso, a lipoperoxidação foi estudada na presença de ferro e não de cálcio. Uma dosagem experimental interessante e que contribuiria para um aprofundamento desta questão seria a de avaliar a formação de produtos detectáveis pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), na presença de cálcio.

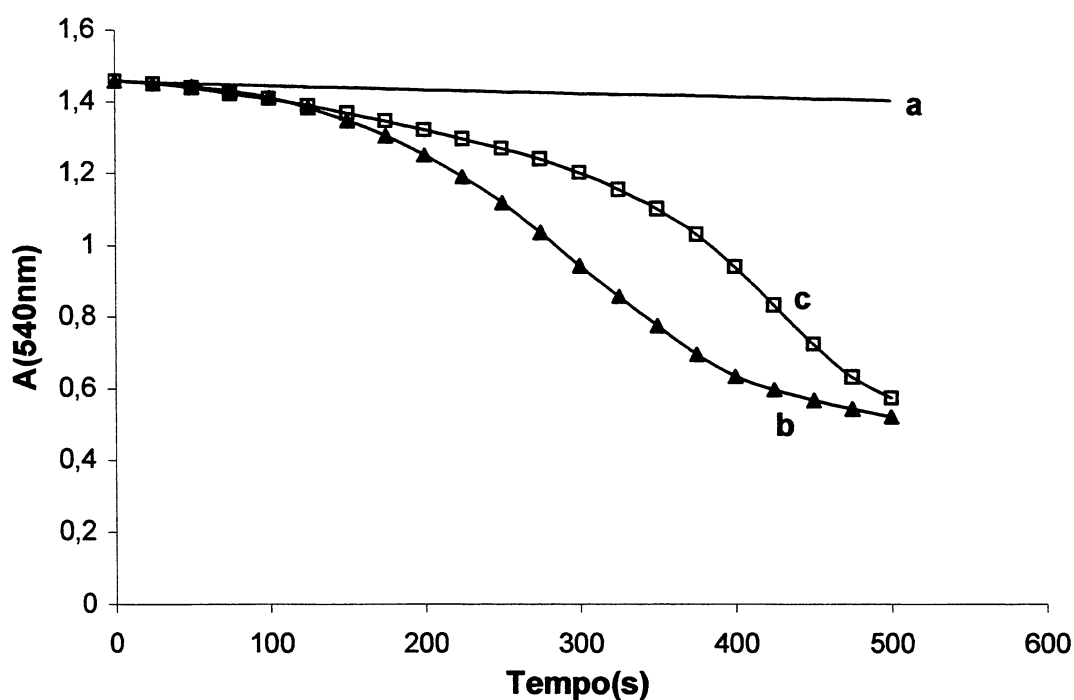


Figura 15A: Efeito do butilhidroxitolueno (BHT) na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM ; CHX 0,5 μM e BHT 10 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)
 c: BHT (10 μM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

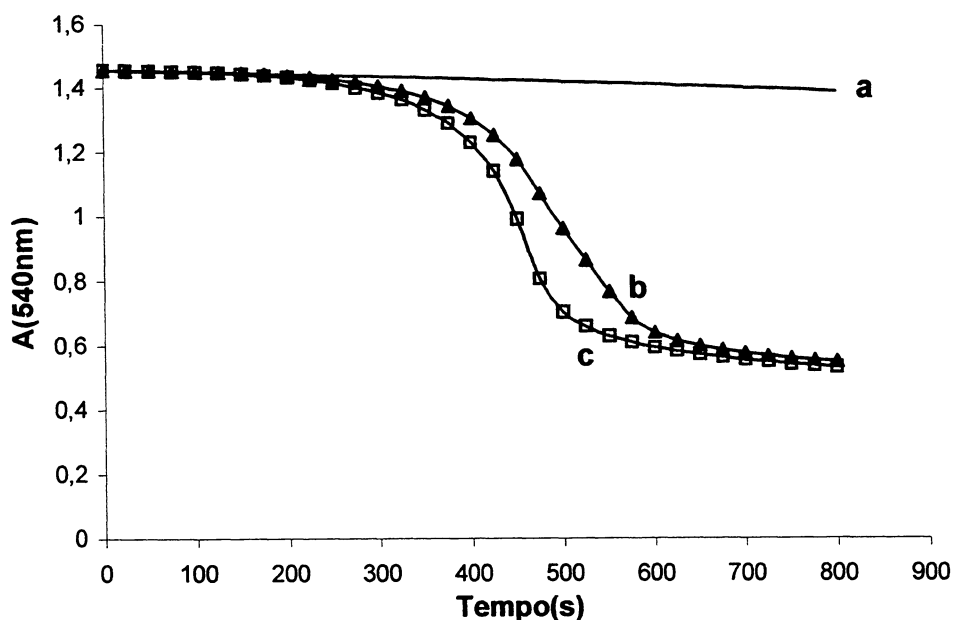


Figura 15B: Efeito do butilhidroxitolueno (BHT) na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM ; CHX 2,5 μM e BHT 10 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)

c: BHT (10 μM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

A catalase, enzima importante nos processos de proteção contra danos causados por ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), também foi utilizada neste estudo com a finalidade de verificar se ela seria capaz de inibir a ação da CHX. Como pode ser observado nas figura 16A e 16B, esta enzima também não inibiu o efeito da CHX sobre a MPT. Os resultados deste trabalho sugerem que a CHX estimula a MPT por um mecanismo diferente da produção de ERO. Estes resultados estão de acordo com os previamente obtidos com o seqüestrador de radicais livres, BHT (figuras 15A e 15B), o qual também foi incapaz de proteger as mitocôndrias da transição estimulada por CHX.

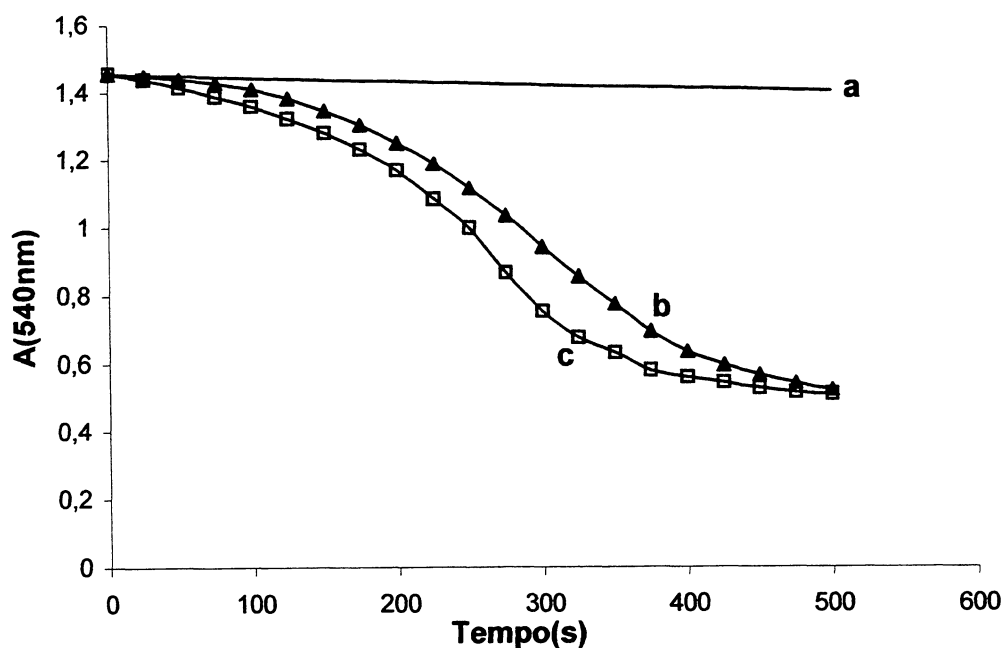


Figura 16A: Efeito da catalase na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM ; CHX 0,5 μM e catalase 1 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle **b:** CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)

c: catalase (1 μM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

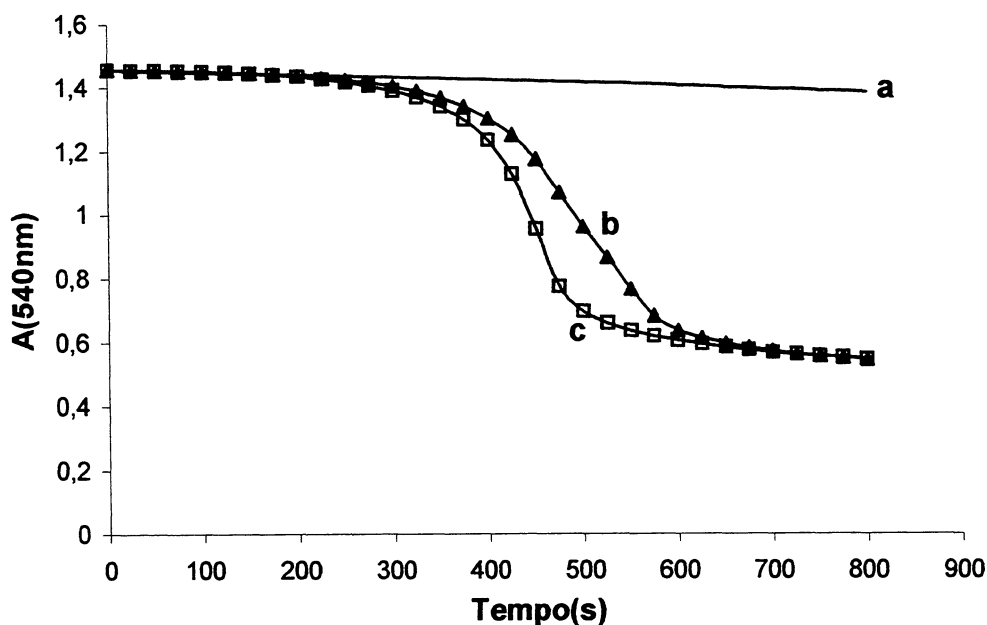


Figura 16B: Efeito da catalase na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM ; CHX 2,5 μM e catalase 1 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)

c: catalase (1 μM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

Considerando o papel fundamental do ferro no processo de lipoperoxidação na presença de CHX (Figuras 8A e 8B) e a presença de proteínas contendo ferro na mitocôndria, investigou-se se a presença deste metal também seria relevante para a MPT em presença de CHX. Para tanto, os experimentos foram desenvolvidos na presença de o-fenantrolina, um agente quelante com grande afinidade por ferro, além de cálcio e fosfato. As figuras 17A e 17B mostram que este agente quelante não impediu a MPT causada por CHX. Vale destacar que as concentrações de CHX utilizadas nestes experimentos eram inferiores às utilizadas nos experimentos de liberação de ferro de ferritina (Figura 7), onde os efeitos significativos foram observados a partir de 5 μM .

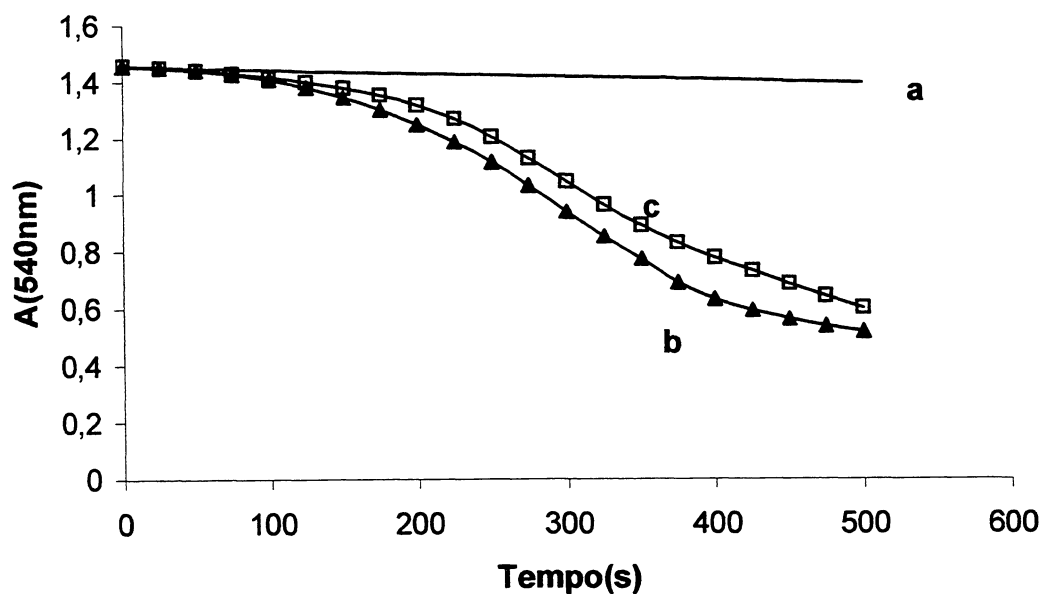


Figura 17A: Efeito da o-fenantrolina na MPT em presença de CHX e cálcio.
 Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 50 μM ; CHX 0,5 μM e o-fenantrolina 300 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.
 a: Mit. – controle b: CHX (0,5 μM) + CaCl_2 (50 μM)
 c: o- fenantrolina (300 μM) + CaCl_2 50 μM + CHX (0,5 μM)

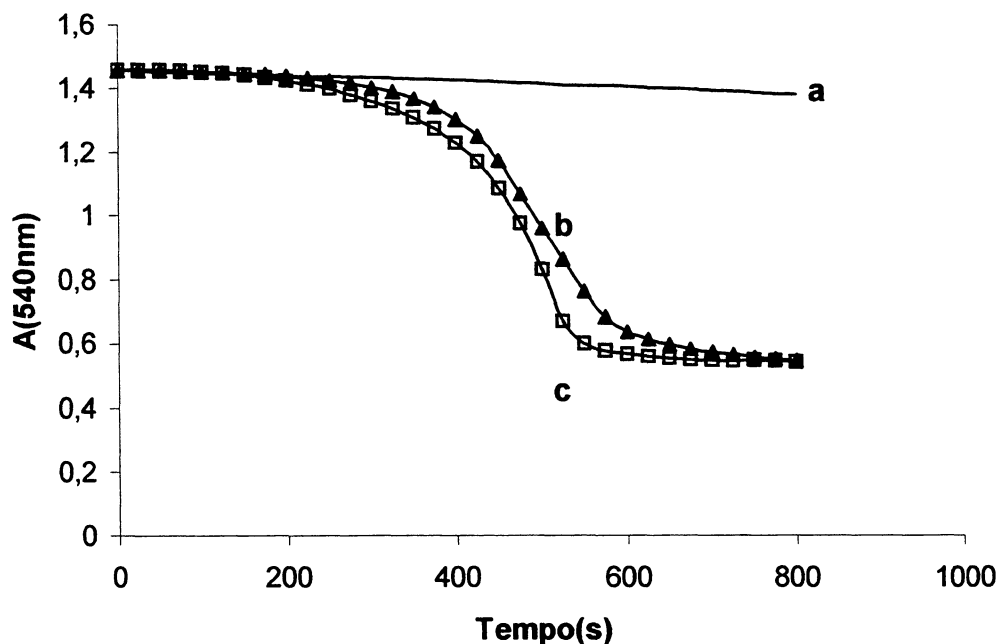


Figura 17B: Efeito da *o*-fenantrolina na MPT em presença de CHX e cálcio.

Sistema: D-manitol 250 mM; HEPES 10 mM; pH 7,2; fosfato de potássio 0,3 mM; succinato de potássio 3 mM; rotenona 5 μM ; proteína mitocondrial 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; CaCl_2 20 μM ; CHX 2,5 μM e *o*-fenantrolina 300 μM , como indicado. Condições experimentais realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.8). Gráfico representativo de 05 experimentos independentes.

a: Mit. – controle b: CHX (2,5 μM) + CaCl_2 (20 μM)

c: *o*-fenantrolina (300 μM) + CaCl_2 20 μM + CHX (2,5 μM)

Portanto, os resultados sugerem fortemente que o efeito da CHX sobre a MPT é dependente de grupamentos $-\text{SH}$ e de Ca^{2+} . Esta afirmação é baseada nos resultados de inibição do efeito da CHX por DTT e EGTA, respectivamente. O processo envolve PMPT, visto que foi inibido por concentrações submicromolares de CsA. Apesar da CHX estimular a lipoperoxidação ferro-induzida, o mecanismo pelo qual a CHX estimula a MPT não envolve a presença de ferro, pois *o*-fenantrolina não inibiu a MPT estimulada por CHX. Considerando que BHT ou catalase não protegeram o efeito da CHX, este processo parece ser independente da presença de ERO. Da mesma forma, a formação de lisofosfolídeos também

parece não ser necessária, visto que o brometo de *p*-bromofenacila (um inibidor da fosfolipase A₂) não protegeu as mitocôndrias da transição na presença de CHX.

4.4. Liberação de Hg de Corpos de Prova de Amálgama Dental

É amplamente reconhecido que fatores químicos, mecânicos e eletroquímicos estão envolvidos nas interações do amálgama com o ambiente oral (MAREK, 1992). Como resultado destas interações, componentes da liga metálica são continuamente liberados para o meio bucal, particularmente o mercúrio, trazendo importantes conseqüências para os pacientes (BLOCH & SHAPIRO, 1982; APOSHIAN *et al.*, 1992; MAREK, 1992). Em adição a estes mecanismos, a introdução de substâncias que modifiquem as propriedades do fluido oral, mesmo que transitoriamente, podem atuar de forma isolada e/ou em sinergismo, exacerbando a liberação dos componentes do amálgama, como tem sido descrito para alguns agentes utilizados em estética dental, os clareadores à base de peróxidos (ROTSTEIN *et al.*, 2000). Os resultados previamente apresentados mostraram que a CHX, substância que é amplamente utilizada como antisséptico bucal, promove acentuada liberação de ferro de ferritina e estimula a lipoperoxidação de membranas, induzida por este metal.

Com a finalidade de avaliar se a CHX poderia interferir na liberação de Hg de amálgama, corpos de prova deste material restaurador foram preparados, a partir de duas fontes comerciais (Figura 6). As condições experimentais idealizadas utilizaram a incubação dos corpos de prova por 24 horas a 37°C, em tampão fosfato pH 6,5, na presença ou ausência de CHX (0,12%). Após a retirada dos corpos de prova, a solução foi avaliada por espectrometria de absorção atômica quanto ao teor de Hg presente.

Os resultados de tais experimentos estão mostrados na Figura 18 e na Tabela 3, onde se verificam que na presença de CHX (0,12%), a liberação de Hg de corpos de prova foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparada com os controles realizados na ausência da droga. Os corpos de prova de amálgama

da marca 01 expostos por 24 horas ao tampão fosfato (controles) liberaram $196 \pm 11,3 \mu\text{g de Hg.ml}^{-1}$, enquanto que os da marca 02 liberaram $232,5 \pm 38,9 \mu\text{g de Hg.ml}^{-1}$. Estes valores determinados para os controles realizados na ausência de CHX foram superiores àqueles descritos na literatura (ROTSTEIN *et al.*, 2000) para outras marcas comerciais, onde os autores dosaram quantidades negligenciáveis de Hg em condições de incubação similares às descritas neste trabalho, porém com um tempo de incubação de 48 horas. Na presença de CHX, estes valores aumentaram para $438 \pm 35,4$ e $436 \pm 30,4 \mu\text{g de Hg.ml}^{-1}$, correspondendo a um aumento de 124 e 88%, respectivamente para as marcas 01 e 02. Este efeito da CHX, embora muito expressivo, foi inferior ao observado para o agente clareador peróxido de carbamida (ROTSTEIN *et al.*, 2000). Ressalta-se que as concentrações utilizadas para estes agentes foram aquelas recomendadas para a prática odontológica, ou seja, 10% para o peróxido de carbamida (ROTSTEIN *et al.*, 2000) e 0,12% para a CHX, neste trabalho. Portanto, a CHX é ativa na liberação de Hg em concentrações muito inferiores às do peróxido de carbamida.

Embora a exposição contínua por 24 horas dos corpos de prova à CHX seja maior que a exposição intermitente usual pelos pacientes, os resultados aqui mostrados são de grande importância clínica, pois usualmente os tratamentos com CHX requerem múltiplas aplicações, por um período de tempo relativamente longo.

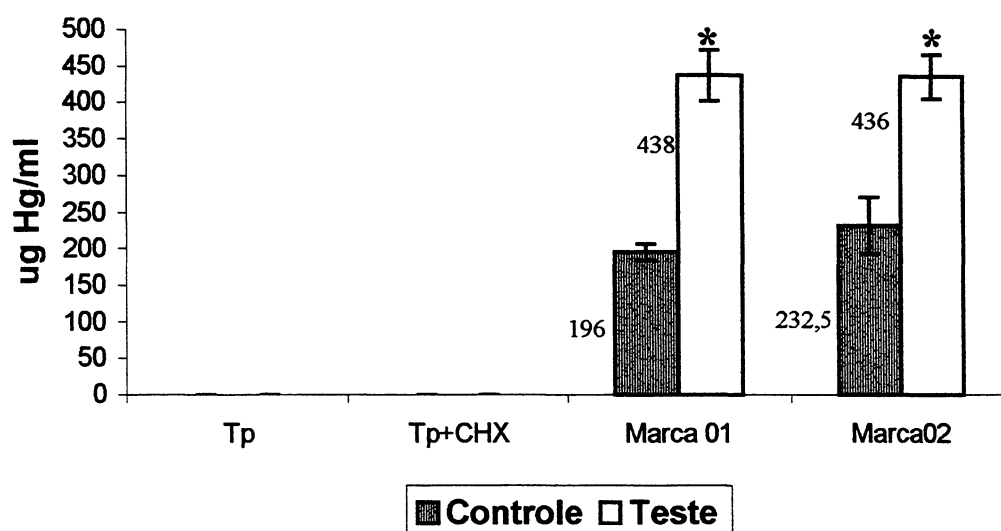


Figura 18: Efeito da CHX na liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama.

Corpos de prova de amálgama das diferentes marcas foram incubados por 24 horas a 37°C com tampão fosfato pH 6,5 (controle) ou na presença de CHX a 0,12% (teste). O Hg foi dosado como descrito em Materiais e Métodos (item 3.6). * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3: Dados estatísticos (teste-t) referentes ao ensaio de liberação de Hg a partir de corpos de prova de amálgama dental.

| Amálgama dental | <i>gl</i> | <i>t</i> | <i>p</i> ($p < 0,05$) |
|--------------------------|-----------|----------|-------------------------|
| Marca 01 (média \pm s) | 10 | -9,21 | 0,006 |
| Marca 02 (média \pm s) | 10 | -5,84 | 0,014 |

gl: grau de liberdade; *t*: t observado; *p*: probabilidade

Considerando a relevância destes resultados, visto que o uso contínuo deste agente pode potencializar o efeito de exposição ao Hg de amálgama por pacientes, uma série de experimentos *in vivo* utilizando a saliva de indivíduos voluntários doadores foram idealizados.

4.5. Caracterização dos sujeitos participantes deste estudo

Um conjunto de métodos e normas padronizadas para estudos de saúde bucal foi desenvolvido pela OMS, o qual é aplicado em todo o mundo. Sua utilização possibilita que levantamentos epidemiológicos realizados em qualquer país ou área possam ser comparados entre si, sendo consensual entre os especialistas que os métodos e critérios preconizados pela OMS devem ser empregados sempre que possível (PINTO, 1989).

Uma versão simplificada e modificada do método da OMS, apropriada para estudos envolvendo uma população menor foi utilizada neste trabalho (anexo IV). Este modelo de formulário foi escolhido porque permite estimar a prevalência de doenças bucais a nível local, regional ou nacional e proporciona dados de referência (linha-base) para avaliações posteriores de programas de saúde bucal.

A figura 19 é representativa da condição oral dos participantes deste estudo. Verifica-se que no momento da coleta de material não havia problemas gengivais ou de posicionamento/apinhamento dentário severos. As restaurações mostraram-se clinicamente satisfatórias, sendo que nenhuma delas possuía defeitos como grandes fraturas, sobre-contornos grosseiros ou excessiva oxidação na superfície, que pudessem vir a interferir nos resultados das análises para presença de Hg.

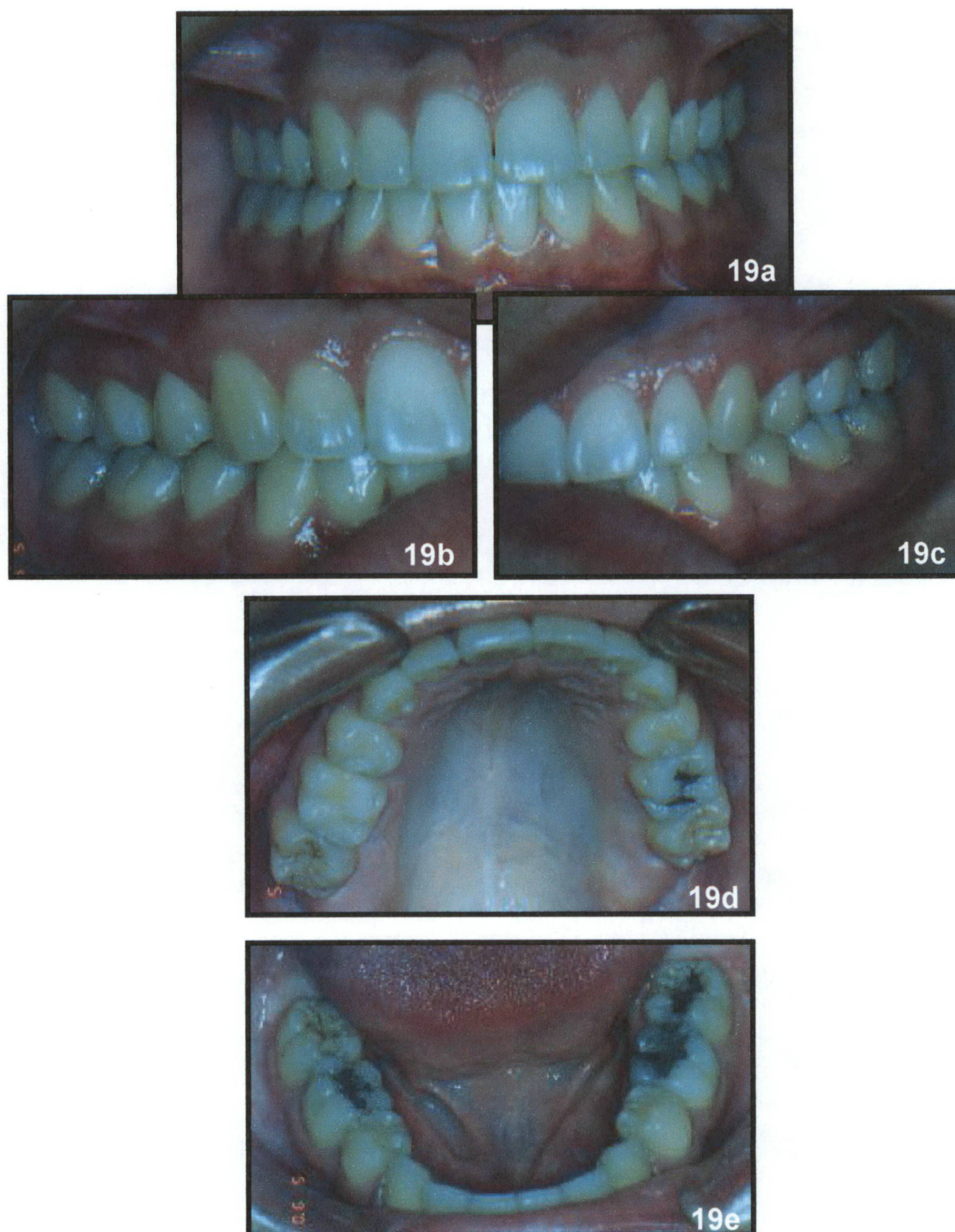


Figura 19: Fotos representativas da condição oral dos participantes deste estudo

Figura 19a: Vista frontal da oclusão.

Figuras 19b e 19c: Vistas laterais da oclusão.

Figuras 19d e 19e: Vistas oclusais das arcadas superior e inferior.

A Tabela 4 mostra os dados referentes aos sujeitos deste estudo e discrimina detalhadamente o perfil da amostragem estudada, quanto ao sexo, à idade, ao nível educacional, aos índices COP-D, de amálgama e gengival, à presença de lesões de mucosa, ao uso de medicamentos, ao tratamento periodontal e ao uso de CHX prévios, bem como à diferença no paladar.

4.5.1. Sexo/Idade

Dez indivíduos participaram deste estudo, sendo cinco do sexo feminino e cinco do sexo do masculino, com idade variando entre 22 e 30 anos, sendo a média de 25 anos. A idade do grupo feminino variou entre 22 e 29 anos, com média de 24 anos e a idade do grupo masculino variou entre 23 e 30 anos, com média de 26 anos. Portanto, a população de indivíduos participantes foi considerada homogênea, não ocorrendo variação estatisticamente significativa entre a idade dos participantes.

Neste estudo, cujo foco principal foi a realização de análises na saliva dos doadores participantes, a idade é um fator bastante importante a ser considerado. Estudos relacionando a idade com parâmetros quali e quantitativos da produção salivar mostram que, histologicamente, o volume proporcional de gordura e tecido fibrovascular aumenta nas glândulas parótida e submandibular, enquanto o volume proporcional de ácinos diminui. Além disso, à medida que a idade avança ocorre diminuição da secreção de IgA salivar e da concentração de mucinas salivares, parâmetros que influenciam as propriedades qualitativas da saliva. Clinicamente, há um decréscimo do fluxo salivar das glândulas submandibular, sublingual e salivares menores do palato (VISSINK & SPIJKERVET, 1996). Assim, estes aspectos interferiram pouco nos resultados, visto que a média de idade dos participantes era semelhante nos dois grupos e inferior àquela em que tais alterações ocorrem (VISSINK & SPIJKERVET, 1996).

Tabela 4: Perfil detalhado dos sujeitos participantes deste estudo.

| Sujeito | Idade | Sexo | Nível Educacional | CPO | Índice de Amálgama | Índice Gengival | Lesões de Mucosa | Uso de Medicamentos | Tratamento Periodontal/ Uso CHX Prévios | Diferença no Paladar |
|---------|-------|------|-------------------|-----|--------------------|-----------------|------------------|---------------------|---|----------------------|
| 01 | 22 | F | Sup. Compl. | 14 | 06 | 00 | Não | Não | Não/Não | Não |
| 02 | 22 | F | Sup. Compl. | 09 | 06 | 00 | Não | Anticonc. | Sim/Sim | Sim |
| 03 | 27 | M | Sup. Compl. | 13 | 15 | 0,66 | Não | Não | Não/Não | Não |
| 04 | 26 | F | Mestrado | 07 | 04 | 00 | Não | Anticonc. | Sim/Sim | Não |
| 05 | 23 | M | Sup. Compl. | 10 | 07 | 0,33 | Não | Não | Não/Não | Não |
| 06 | 28 | M | Mestrado | 09 | 10 | 00 | Não | Não | Não/Sim | Não |
| 07 | 23 | F | Sup. Compl. | 08 | 09 | 00 | Não | Anticonc | Não/Sim | Sim |
| 08 | 30 | M | Mestrado | 17 | 28 | 00 | Não | Não | Não/Não | Sim |
| 09 | 29 | F | Mestrado | 08 | 07 | 0,66 | Não | Não | Não/Sim | Sim |
| 10 | 23 | M | Mestrado | 09 | 13 | 1,0 | Não | Não | Não | Não |

F: feminino; M: masculino; Anticonc: anticoncepcional;
 Sup.Compl.: nível educacional superior completo

4.5.2. Nível Educacional

Segundo a OMS, ao lado dos indicadores ligados diretamente à saúde, tais como a ocorrência das doenças, o comprometimento de recursos financeiros e humanos e serviços de assistência, os indicadores sociais e econômicos mais gerais, relacionados à distribuição de renda, às condições de trabalho e moradia, à instrução, à disponibilidade de alimentos, ente outros, são igualmente importantes na avaliação de uma população (PINTO, 1989). Assim, as considerações relativas ao nível educacional são importantes ao se caracterizar uma população em estudo.

Todos os participantes deste estudo possuíam livre acesso a bens de consumo e nível superior completo, sendo que 50% possuía mestrado completo. Tal característica populacional eliminou parâmetros referentes à falta de informação, cuidados com a higiene/saúde individuais e mesmo à presença na cavidade oral de materiais restauradores de qualidade duvidosa. A população estudada foi considerada homogênea quanto ao nível educacional dos participantes.

4.5.3. Índice CPO

O índice CPO mede o ataque de cárie dental à dentição permanente. Desde sua publicação em 1937, tornou-se o mais utilizado dentre todos os índices odontológicos, mantendo-se hoje como ponto básico de referência para o diagnóstico de cárie e avaliação dos programas de saúde bucal (PINTO, 1989).

Um fator importante de ser notado é que o CPO aumenta paralelamente à idade, existindo diferenças importantes em seus componentes segundo o nível de saúde e a existência ou não de serviços curativos e preventivos satisfatórios disponíveis à população. Geralmente em populações carentes com altos níveis de cárie e oferta limitada de serviços ou programas com insuficiente cobertura populacional, o crescimento do índice se dá em função do componente **P**, ou seja, dentes perdidos predominam de forma ampla sobre os componentes **C** (cariados) e **O** (obturados). Além disso, com o aumento da idade ocorre também o aumento

da incidência de doenças periodontais, as quais também são responsáveis por grande número de extrações dentárias. Por outro lado, em populações de alta renda e livre acesso a bens de consumo, o componente **O** é o predominante, valendo ainda ressaltar que o CPO médio de tais populações é inferior àquele encontrado em populações de baixa renda, visto que as medidas preventivas são efetivamente tomadas antes da instauração de doenças (cárie/periodontal).

A população avaliada no presente estudo mostrou apenas o componente **O** no levantamento feito. Apenas um participante teve quatro elementos dentários extraídos, mas por motivos ortodônticos e, portanto, estes elementos não foram considerados como componente **P**. A amostragem do presente estudo foi considerada homogênea ("Spearman Rank R"), não ocorrendo variação estatisticamente significativa entre o índice CPO dos participantes ($p > 0,05$). Portanto, a ausência dos componentes **C** e **P**, com prevalência do componente **O** reforça a proposição de que o nível educacional influi na condição de saúde oral do indivíduo. A Tabela 5 mostra mais detalhadamente o perfil do índice CPO obtido neste estudo.

Tabela 5: Distribuição do índice CPO na população estudada.

| Índice CPO – componente O | Até 10 | Entre 11-15 | Mais de 16 | Total |
|----------------------------------|---------------|--------------------|-------------------|--------------|
| Feminino | 04 | 01 | 00 | 05 |
| Masculino | 03 | 01 | 01 | 05 |
| Total | 07 | 02 | 01 | 10 |

Spearman R = 0,258; t = 0,756; p = 0,471

4.5.4. Índice de Amálgama

Considerando a natureza deste trabalho, visando avaliar a liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama, uma descrição acurada de tais restaurações se fez necessária. Assim, foi utilizado o índice de amálgama

preconizado por APOSHIAN *et al.* (1992) com algumas modificações. Tal índice considerou o dente como um cubo de 05 lados e verificou o número de faces dentárias restauradas com este material. Assim, dentes com restauração de amálgama de 01 face recebem o índice 01; dentes com duas faces restauradas, índice 02 e dentes com 03 ou mais faces restauradas, índice 03. O índice de amálgama individual corresponde à somatória de todos os índices dentários do sujeito e foi utilizado posteriormente para correlacionar o número de faces dentais restauradas com amálgama e a quantidade de Hg liberado após bochecho com CHX. A Figura 20 mostra o índice de amálgama obtido de cada indivíduo. A Tabela 6 mostra a comparação de índices de amálgama entre sexos (teste de Mann-Whitney U). Este foi o único parâmetro que mostrou diferença estatisticamente significativa entre os sexos.

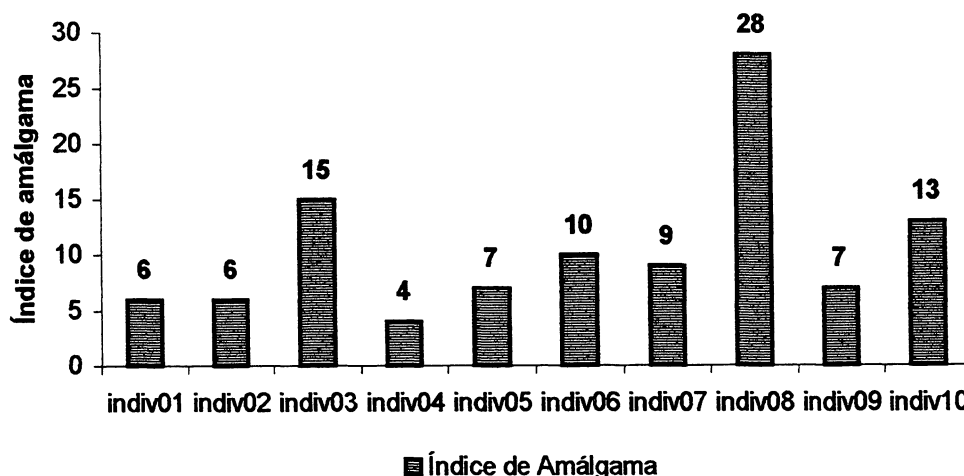


Figura 20: Índice de amálgama obtido de cada indivíduo.

Dentes com restauração de amálgama de 01 face receberam índice 01; dentes com duas faces restauradas, índice 02 e dentes com 03 ou mais faces restauradas, índice 03. O índice individual corresponde à somatória de todos os índices dentários do sujeito.

Tabela 6: Comparação de índices de amálgama entre sexos

| | <i>Soma de postos</i> | | | | N N | | |
|--------------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | F | M | U | Z | p | F | M |
| Dados | 16,5 | 38,5 | 1,5 | -2,298 | 0,022 | 5 | 5 |

Zc= $\pm 1,96$; F: feminino; M: masculino; U: teste de Mann Witney U; Z: Z observado; p: p observado

4.5.5. Índice Gengival

O índice gengival (IG) é específico para analisar as condições de saúde dos tecidos gengivais sendo utilizado notadamente em estudos clínicos (PINTO, 1989). Baseia-se nas avaliações de um dente em cada sextante bucal: 16, 12, 24, 36, 32 e 44. Estes dentes são divididos em quatro faces: vestibular (V), lingual (L), mesial (M) e distal (D), atribuindo-se um valor de 00 a 03 a cada face, como mostrado na Tabela 6. Somando-se os valores de todas as faces e dividindo o resultado por 04, obtém-se o IG do dente. O IG do indivíduo é obtido pela soma dos índices dentários dividida por 06 (seis dentes examinados). Alternativamente, podem também ser formulados índices por grupos de dentes ou pelo exame integral das arcadas. Neste estudo, utilizou-se o critério por sextantes, por sua representatividade e maior rapidez.

Tabela 7: Critérios diagnósticos e códigos para o índice gengival

| CRITÉRIOS | CÓDIGOS |
|--|----------------|
| Ausência de inflamação = gengiva uniformemente rosada | 00 |
| Inflamação leve = modificação pequena na cor e textura gengivais | 01 |
| Inflamação moderada = gengiva moderadamente avermelhada, vítrea, edemaciada e hipertrófica, com sangramento sob estímulo | 02 |
| Inflamação severa = gengiva nitidamente avermelhada, hipertrófica, com tendência ao sangramento espontâneo e presença de ulceração | 03 |

O IG individual dos participantes deste estudo está mostrado na Tabela 4. O valor do IG para sexo foi testado pelo método não paramétrico U de Mann-Witney e a população estudada foi considerada homogênea, não ocorrendo variação estatisticamente significativa entre o índice gengival para sexo ($U = 7,5$; $Z = -1,044$; $p = 0,296$).

O IG é de grande valia em estudos clínicos, pois mostra o real estado de higiene do paciente. A presença de inflamação gengival é um processo gradativo. Ou seja, a modificação de cor e de textura gengivais (código 01) até a presença de inflamação severa, com gengiva hipertrófica, tendência ao sangramento espontâneo e presença de ulceração (código 03) não irá desaparecer com uma escovação um pouco mais acurada na véspera da consulta odontológica. O processo inflamatório levou alguns dias para se instalar e, da mesma forma, levará alguns outros para regredir. Assim, por mais livre de placa que o paciente possa estar no dia do exame, será o IG que mostrará ao profissional como são os reais hábitos do paciente. Esta é uma grande vantagem de se utilizar este índice em estudos clínicos no lugar de se avaliar o índice de placa visível. A placa bacteriana visível, após uma eficiente escovação, pode ser quase completamente removida das superfícies dentárias e isso pode levar a diagnósticos não tão corretos sobre a condição de higiene oral do indivíduo. Esta é uma outra razão para a adoção deste índice no presente estudo.

4.5.6. Lesões de Mucosa

Nenhuma lesão de mucosa foi observada nos participantes deste estudo no momento da coleta de material.

4.5.7. Uso de Medicamentos

Entre o sexo feminino, 03 dos 05 indivíduos relataram fazer uso contínuo de anticoncepcionais, mas não pôde ser feita qualquer correlação deste fato com algum problema periodontal. Entre o sexo masculino, nenhum dos indivíduos relatou fazer uso contínuo de nenhum tipo de medicamento.

4.5.8. Tratamento Periodontal Prévio/Usos de Colutório contendo CHX

A necessidade de tratamento periodontal mostra que o controle de placa não está sendo feito corretamente/adequadamente pelo paciente. Dentre os recursos existentes para a realização do tratamento periodontal está o uso de colutórios contendo antimicrobianos. Dentre estes, o mais largamente utilizado é a CHX. Assim, dois tópicos do formulário preenchido visavam saber se o sujeito já havia feito algum tipo de tratamento periodontal anteriormente e/ou se já havia feito uso de colutório contendo CHX.

Como pode ser observado na Tabela 4, dentre os 10 sujeitos examinados, 06 (60%) nunca haviam feito tratamento periodontal prévio nem uso de colutório contendo CHX; dois (20%) já haviam recebido tratamento periodontal com uso concomitante de colutório contendo CHX e dois (20%), apesar de nunca terem necessitado de tratamento periodontal, já haviam feito uso de colutório contendo CHX, mas para outros fins (preparo pré-cirúrgico).

4.5.9. Diferença na Percepção do Paladar

Considerando que o uso contínuo de CHX pode causar efeitos sobre o paladar, reduzindo temporariamente a intensidade de percepção ao NaCl e ao quinino-HCl (SCHAUPP & WHONAUT, 1978; LANG *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995), a avaliação da possibilidade deste parâmetro ser afetado após um único bochecho na dose de 0,12% seria interessante. Assim, após o preenchimento do formulário e coleta do material pós-bochecho com CHX, os participantes receberam orientação para notar se iriam sentir alguma diferença na percepção do paladar após o uso da CHX.

Como discriminado na Tabela 4, da população estudada, 40% relatou sentir diferença na percepção do paladar, com diminuição na intensidade de percepção ao NaCl. Entretanto, imediatamente após o bochecho, todos os participantes (100%) relataram sensação de ageusia leve a moderada. SCHAUPP & WHONAUT (1978) relataram que após um único bochecho com CHX a 20%,

ocorreu ageusia (sensação constante de sabor fortemente amargo na boca). No presente trabalho não foi utilizado aparelho específico para medidas gustométricas. Além disso, a ageusia relatada por SCHAUPP & WHONAUT (1978) foi verificada após um único bochecho com CHX, porém a uma concentração muito mais elevada que a presentemente utilizada; os resultados não são, portanto, comparáveis. Vale ressaltar, no entanto, que este dano no paladar em relação ao NaCl permaneceu apenas no dia do bochecho, confirmando, assim dados da literatura, que afirmam que este dano é reversível (SCHAUPP & WHONAUT, 1978; LANG *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995).

4.6. Liberação de Hg de Restaurações de Amálgama Dental

As dosagens de Hg no sobrenadante da incubação dos corpos de prova de amálgama tratados com CHX (Figura 18) mostrando acentuado aumento da liberação do metal motivaram uma avaliação *in vivo* com vistas a verificar se este efeito da CHX seria também visualizado nas condições do ambiente oral, após o uso do colutório.

De acordo com vários autores (HAHN *et al.*, 1989; HAHN *et al.*, 1990; VIMY *et al.*, 1990; BOYD *et al.*, 1991; LORSCHIEDER *et al.*, 1995), após mastigação prolongada e/ou escovação dentária, ocorrem picos de Hg na atmosfera oral (6-10 vezes o valor basal), condição que permanece durante aproximadamente 90 minutos (LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Assim, no dia anterior do experimento, os participantes receberam orientação relativa à coleta de saliva, a qual salientava a impossibilidade de consumo de alimentos e/ou bebidas de qualquer forma por, pelo menos, duas horas antes da coleta. Portanto, a dosagem de Hg detectada na saliva foi, de fato, referente à concentração real de Hg na cavidade oral, antes e após o bochecho com CHX.

Os resultados de tais experimentos estão apresentados na Figura 21 e na Tabela 8. Verifica-se que 50% da população analisada (indivíduos 04, 06, 08, 09 e 10) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações

de Hg salivar após o bochecho com CHX. Em 20% (indivíduos 02 e 03), a quantidade de Hg foi maior antes do bochecho e em 30% dos casos (indivíduos 01, 05 e 07), não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as dosagens de Hg antes e após o uso do colutório. A média geral entre os indivíduos também mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na quantidade de Hg dosada após o bochecho com CHX. Chama a atenção que entre os indivíduos em que se detectou o aumento da liberação de Hg após o uso da CHX, em 03 deles (60%), a quantidade de Hg liberada ultrapassou o valor basal em, pelo menos, três vezes, sendo que no indivíduo 04, chegou a ser cinco vezes maior que o valor basal. Portanto, estes resultados não apenas estão de acordo com aqueles previamente obtidos *in vitro* com os corpos de prova (Figura 17), como também mostram que no ambiente oral, mesmo em um intervalo curto de tempo de exposição à CHX, este agente é capaz de estimular a liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama dental. Os resultados fortemente sugerem que o uso contínuo e prolongado deste agente pode contribuir com o aumento da concentração de Hg na cavidade bucal e expor o paciente aos efeitos deletérios do Hg, já relatados na literatura (LUND *et al.*, 1993; HULTMAN *et al.*, 1994; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; BULAT *et al.*, 1998; HULTMAN *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 2001). Esta questão assume contornos ainda mais preocupantes, considerando o livre acesso da população a colutórios com CHX, por exemplo, em supermercados.

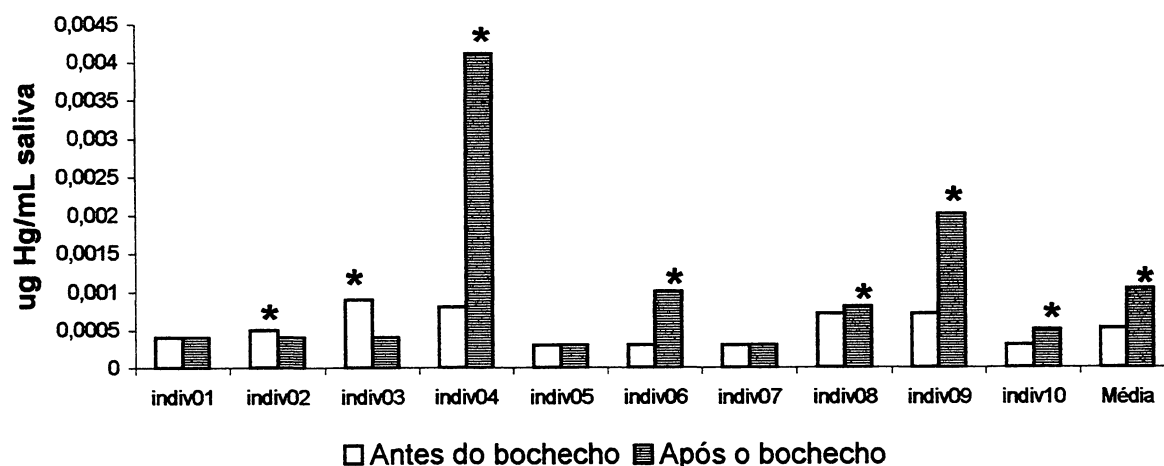


Figura 21: Efeito da CHX (0,12%) na liberação de Hg de restaurações de amálgama.

Condições experimentais: as análises utilizaram saliva antes do bochecho por 1 minuto com CHX, e a saliva produzida no minuto subsequente foi desprezada. A saliva produzida após isso foi coletada novamente. A dosagem de Hg foi realizada como descrito em Materiais e Métodos (item 3.7). Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste-t. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8: Teste t pareado para comparação da liberação de Hg a partir de restaurações de amálgama.

| Estatística | Indiv01 | Indiv02 | Indiv03 | Indiv04 | Indiv05 | Indiv06 | Indiv07 | Indiv08 | Indiv09 | Indiv10 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| M antes | 3,9 | 4,97 | 8,93 | 8,03 | 2,87 | 2,83 | 3 | 7,13 | 7,03 | 2,83 |
| M depois | 4 | 4 | 4 | 41,67 | 3,1 | 10,93 | 3,03 | 8,1 | 21,3 | 5,13 |
| s antes | 0,10 | 0,153 | 0,208 | 0,153 | 0,115 | 0,153 | 0,1 | 0,153 | 0,153 | 0,153 |
| s depois | 0,10 | 0 | 0 | 1,242 | 0,057 | 1,792 | 0,153 | 0,100 | 1,527 | 0,153 |
| gl | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| to | -1 | 10,96 | 41,05 | -53,11 | -2 | -7,36 | -0,23 | -29 | -15,39 | -15,06 |
| p | 0,211 | 0,004 | 0,0003 | 0,0002 | 0,092 | 0,009 | 0,42 | 0,0006 | 0,0021 | 0,0022 |
| tc | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 | 2,92 |

M antes: média antes bochecho; M depois: média depois bochecho; s antes: desvio padrão antes bochecho; s depois: desvio padrão depois bochecho; to: t observado; tc: t crítico; p: probabilidade

Pacientes que necessitam de tratamento periodontal são indivíduos cujo controle efetivo da placa bacteriana é deficiente. Esta é uma questão que ocorre desde as idades mais precoces, época em que as lesões cariosas são mais prevalentes, até a instalação da doença periodontal crônica. Assim, uma correlação positiva entre pacientes que necessitam de tratamento periodontal e o número de restaurações neles encontradas poderia ser inferida. Aliado a isso, tem-se o fato de que os materiais à base de compósitos, por serem mais sensíveis, não são indicados a pacientes com controle de placa inadequado, sendo, então, o amálgama de prata o material restaurador de escolha nestes pacientes. Portanto, com a finalidade de avaliar uma possível correlação entre a liberação de Hg individual e o índice de amálgama dos participantes deste estudo, foi efetuado o cruzamento dos dados referentes ao índice de amálgama individual e a liberação de Hg após o bochecho com CHX (análise de correlação de Pearson). Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que não houve correlação entre tais dados ($R = -0,2932$; $p = 0,411$); isto é, aparentemente a liberação de Hg das restaurações de amálgama estimulada por CHX não está relacionada com o número de restaurações presentes na cavidade oral do indivíduo. Pode-se sugerir, portanto, que outros fatores devem estar envolvidos, como: idade das restaurações, grau de oxidação/degradação da superfície do amálgama, marca e manipulação do material bem como adestramento profissional durante a inserção da restauração.

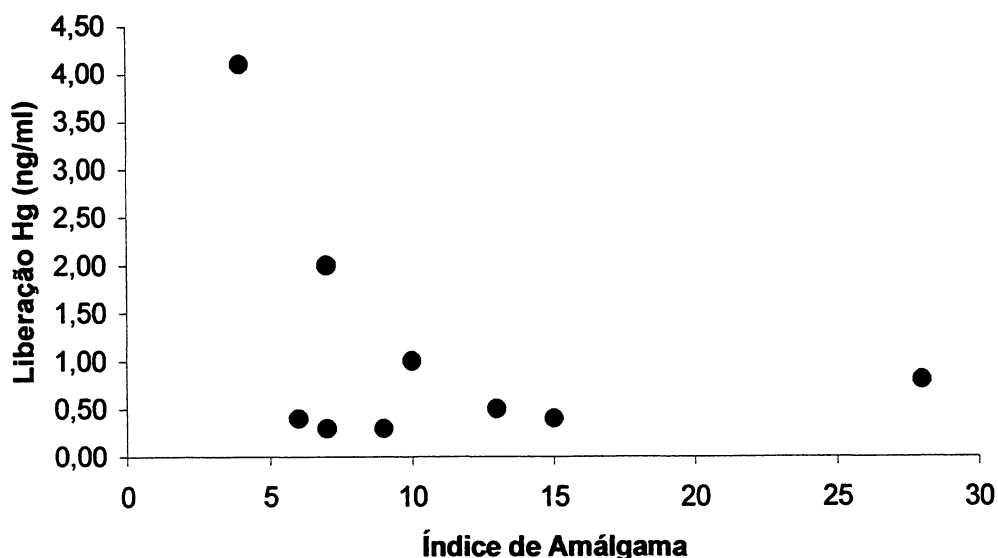


Figura 22: Gráfico para a liberação de Hg de restaurações de amálgama e o índice de amálgama individual.

Condições experimentais como descrito nas legendas das figuras 20 e 21.

(R= -0,2932; p= 0,411)

4.7. Atividade antimicrobiana da CHX após um único bochecho

Vários dados da literatura já habilitaram a CHX como potente e eficaz agente antimicrobiano (CANCRO *et al.*, 1972; SCHIOTT *et al.*, 1976a; SCHIOTT *et al.*, 1976b; SCHIOTT *et al.*, 1976c; KNUUTTILA & SÖDERLING, 1980; NEWBRUN, 1988; JENKINS *et al.*, 1988; PUCHER & DANIEL, 1993; WARNER *et al.*, 1993; LAMBERT *et al.*, 1997; SKÖLD *et al.*, 1998). Entretanto, nenhum deles realmente mostrou evidências quantitativas quanto à real diminuição microbiana obtida antes e após um único bochecho com este agente.

É reconhecido que os hábitos alimentares podem influir quali e quantitativamente sobre a flora presente na cavidade oral, pois dietas ricas em sacarose colaboram para a formação de floras ricas em estreptococos do grupo mutans (JORGE, 1995). Outra variável trata-se do fluxo salivar, que também influi na flora presente, através da ação de limpeza exercida pela saliva. No presente

estudo, tais variáveis foram minimizadas, tendo em vista que as amostras do grupo controle e do grupo teste foram coletadas dos mesmos indivíduos voluntários, respectivamente antes e após o bochecho com CHX.

Os resultados apresentados nas figuras 23a e 23b são representativos da amostragem populacional estudada neste trabalho e demonstram o crescimento bacteriano ocorrido a partir de amostras de salivas coletadas antes e após o bochecho com CHX (0,12%), respectivamente nos meios líquido (Müller Hinton) e sólido (ágar-sangue), nos quais se verifica expressiva diminuição do crescimento bacteriano após o uso do colutório. Vale destacar que o ágar-sangue utilizado favorece o crescimento de estreptococos (BIER, 1994).

A figura 24 mostra os resultados quantitativos das análises de turbidimetria dos meios líquidos. A contagem bacteriana feita antes do bochecho com CHX mostrou-se bastante homogênea, ou seja, as culturas do grupo controle coletadas dos 10 indivíduos participantes deste estudo não mostraram diferenças estatísticas entre si. Estes resultados são semelhantes àqueles relatados por SCHIOTT *et al.* (1976), os quais, utilizando outros meios de cultura, verificaram que previamente ao bochecho com CHX não houve diferenças estatísticas para as contagens bacterianas da população estudada.

Os dados da Figura 24 mostram também uma drástica e significativa diminuição ($p < 0,05$) na contagem bacteriana após o uso da CHX, em 100% dos casos. Houve, em média, uma redução de 4 vezes na contagem bacteriana das culturas do grupo teste. SCHIOTT *et al.* (1976) mostraram uma diminuição no número de bactérias salivares de cerca de 20 a 50%, com o uso ininterrupto de colutório contendo CHX a 0,2% por dois anos. No presente estudo, onde se utilizou um único bochecho de uma solução de CHX menos concentrada, a redução na contagem bacteriana foi maior. Por outro lado, JENKINS *et al.* (1988), utilizando uma solução de CHX a 0,2% e analisando as colônias bacterianas formadas na superfície dentária por eletromicroscopia de varredura, relataram uma diminuição na contagem bacteriana de quase 10.000 vezes em relação ao grupo controle (bochechos com água), valor muito maior que o presentemente

obtido. Portanto, embora a metodologia utilizada possa influenciar na magnitude dos resultados, a atividade antimicrobiana da CHX é inquestionável.

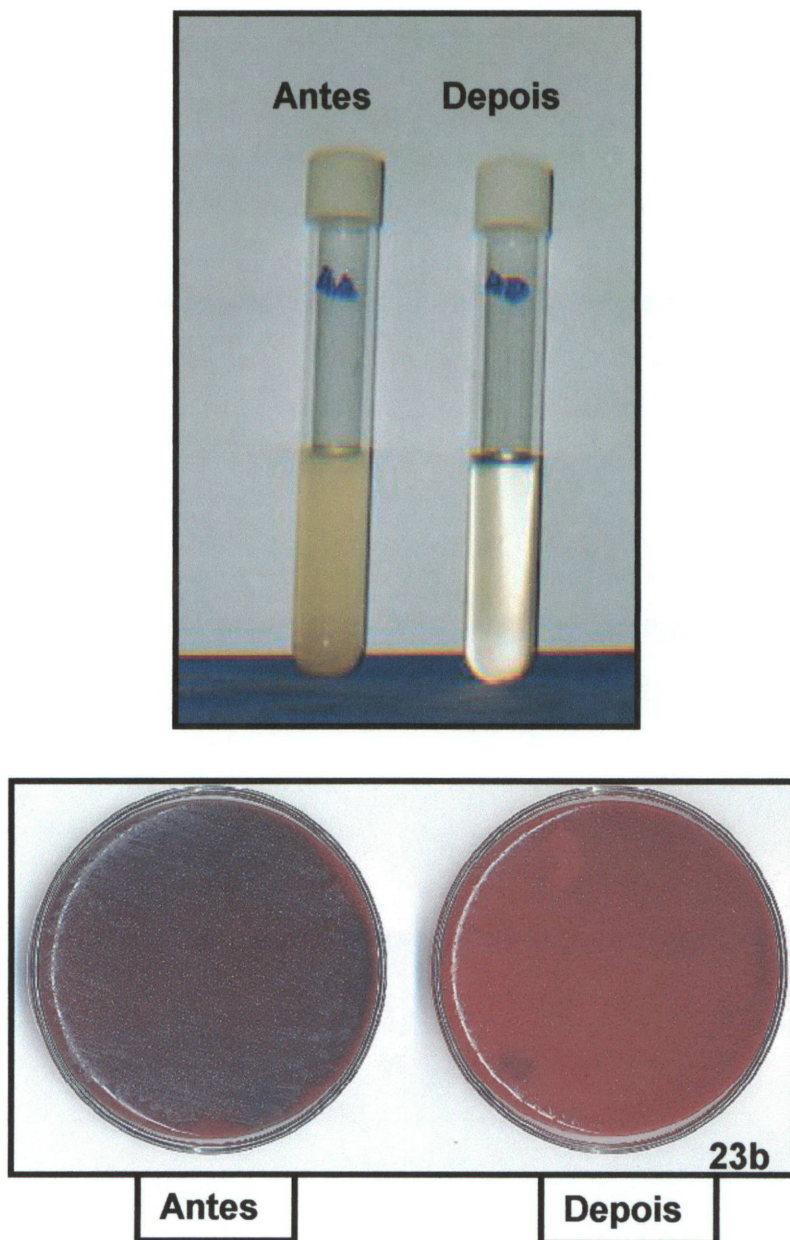


Figura 23: Atividade antimicrobiana da CHX após um único bochecho

Figura 23a: Crescimento bacteriano representativo ocorrido em meio líquido (Caldo Müller Hinton) antes e depois o bochecho com CHX (0,12%).

Figura 23b: Crescimento bacteriano representativo ocorrido em meio sólido (ágar-sangue) antes e depois do bochecho com CHX (0,12%).

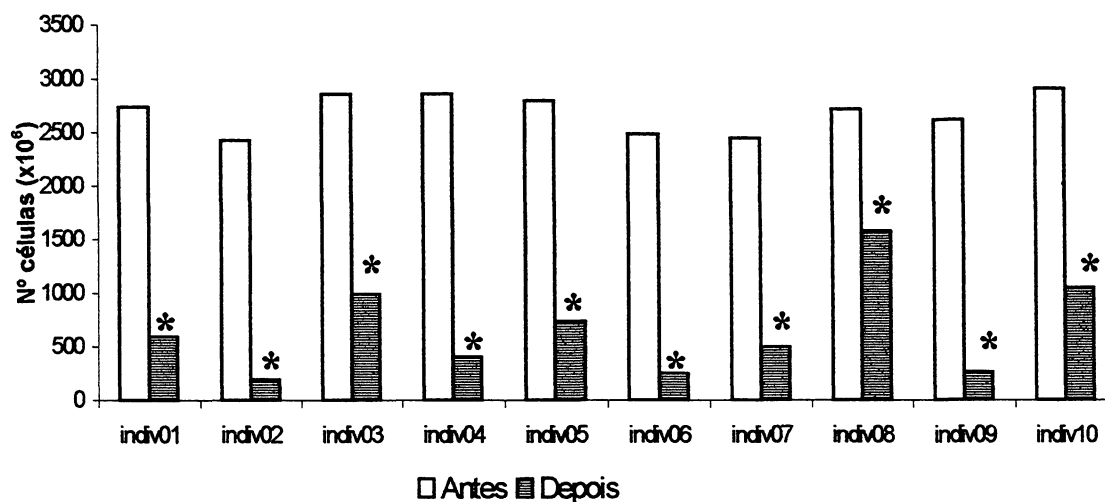


Figura 24: Crescimento bacteriano em meio líquido a partir das amostras salivares, inoculadas em meio líquido (Müller Hinton), por 24 horas a 37°C. A contagem bacteriana utilizou o tubo número 05 da escala de McFarland, o qual equivale a aproximadamente 1500×10^6 células/ml. Foi utilizado para as análises estatísticas o Teste-t.* indica diferença estatisticamente significativa

Os trabalhos clínicos com CHX disponíveis na literatura (SCHIOTT *et al.*, 1976; JENKINS *et al.*, 1988; PUCHER & DANIEL, 1993; HELMS *et al.*, 1995; LAMBERT *et al.*, 1997; SKOLD *et al.*, 1998) não discriminam os cuidados tomados em relação a algumas variáveis que possivelmente possam interferir nos resultados obtidos, como por exemplo, hábitos alimentares, fluxo salivar e número de restaurações presentes nos grupos controle e teste. O número de restaurações de cada indivíduo participante de um estudo é uma das variáveis mais negligenciadas nos trabalhos envolvendo atividade antimicrobiana da CHX. Com a finalidade de avaliar se o crescimento bacteriano em meio líquido após o bochecho com CHX teria relação com o número de restaurações de amálgama presentes na cavidade oral, os dados do índice de amálgama (Figura 20) e do crescimento bacteriano (Figura 24) foram analisados em conjunto (análise de correlação de Pearson). Os resultados de tal análise estão mostrados na Figura 25. Verifica-se que os indivíduos que possuem baixos índices de amálgama mostram também os menores valores para contagem bacteriana após o bochecho

com CHX; da mesma forma, os indivíduos que possuem os maiores índices de amálgama, mostram as maiores contagens bacterianas após o bochecho com CHX. Portanto, os resultados sugerem uma correlação direta entre o índice de amálgama e o crescimento bacteriano após o bochecho com CHX ($R= 0,8679$; $p= 0,01$). Segundo SUMMERS *et al.* (1993), o Hg liberado de restaurações de amálgama é responsável pela seleção de bactérias que possuem plasmídeos de resistência a Hg e a antibióticos nas floras intestinal e oral de primatas, e freqüentemente, estes dois tipos de resistência são geneticamente ligados (SUMMERS, 1986; SUMMERS *et al.*, 1993; LORSCHIEDER *et al.*, 1995). Assim, embora o número de restaurações de amálgama não seja estatisticamente relacionado com o aumento da liberação de Hg pela CHX, o número de restaurações com este material presentes nos indivíduos participantes de um estudo deve ser levado em consideração. Além disso, a possibilidade de que o Hg continuamente liberado na cavidade oral possa favorecer o surgimento de bactérias resistentes à CHX não pode ser excluída, embora GREENSTEIN & POLSON (1998) afirmem que o desenvolvimento de resistência a este agente é incomum. Tais autores apontam o reduzido potencial destes agentes induzirem à resistência bacteriana como uma vantagem no seu uso em relação aos antibióticos.

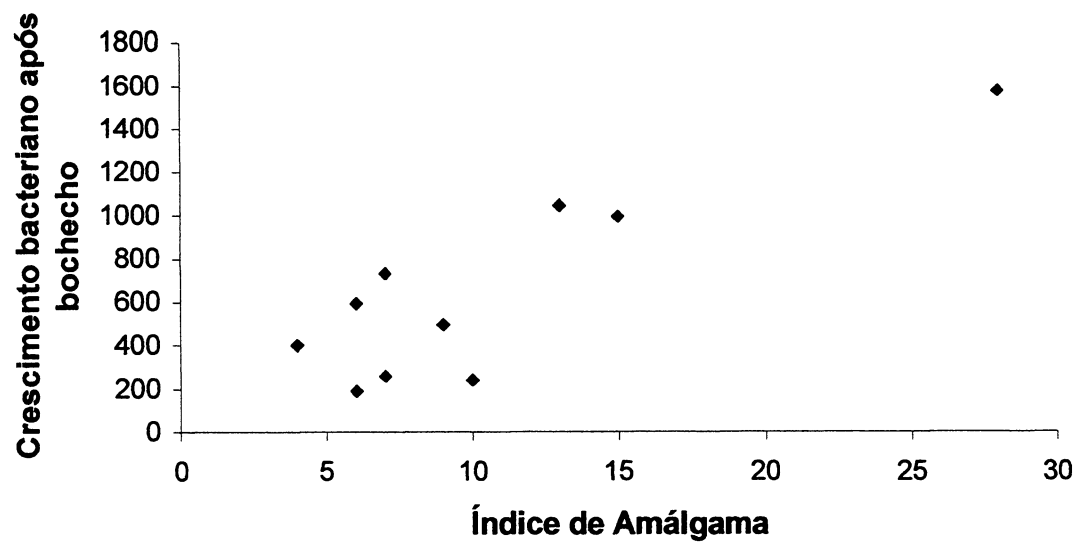


Figura 25: Gráfico para o índice de amálgama e a contagem microbiana após o bochecho com CHX (0,12%).

Condições experimentais como descrito nas legendas das figuras 20 e 24.

($R = 0,8679$; $p = 0,01$)

5. Discussão Final

A CHX, uma bisbisguanida de ação fungicida e bactericida efetiva sobre microrganismos Gram negativos e Gram positivos, tem sido estudada e muito utilizada em Odontologia quanto aos seus efeitos clínicos de inibição de formação de placa bacteriana (DAVIES *et al.*, 1970; LOE & SCHIOTT, 1970; CANCRO *et al.*, 1972; SCHIOTT *et al.*, 1976a; SCHIOTT *et al.*, 1976b; SCHIOTT *et al.*, 1976c; MACKENZIE *et al.*, 1976; NUKI *et al.*, 1976). Vários outros estudos mostrando os diversos aspectos da toxicidade e características deste agente também são disponíveis (JENKINS *et al.*, 1988; HELMS *et al.*, 1995; HA & CHEUNG, 1996; LAMBERT *et al.*, 1997; GREENSTEINS & POLSON, 1998; SHEEN *et al.*, 2001). No entanto, os estudos avaliando a possibilidade da CHX interagir e/ou liberar metais de diferentes estruturas são raros. De fato, existem evidências de um envolvimento do ferro no manchamento dos dentes por colutórios contendo CHX (NORDBO *et al.*, 1983; WARNER *et al.*, 1993; ADDY *et al.*, 1995; SHEEN *et al.*, 2001).

Considerando tais dados da literatura, no presente estudo avaliou-se a interação da CHX com ferritina, através da liberação de ferro desta proteína. Observou-se que a CHX foi capaz de liberar este metal de ferritina, de forma dose-dependente e significativa em todas as concentrações testadas (figura 7). O ferro é um metal importante, que está envolvido tanto nos processos de formação de ERO (por exemplo, pela reação de Fenton) quanto para o metabolismo de muitos microrganismos, entre eles, os microrganismos constituintes da flora oral. A partir de tais resultados, seria interessante a realização de outros estudos com vistas a avaliar se este agente também poderia liberar ferro de outras proteínas, como a lactoferrina. Esta é uma proteína constituinte da saliva que, assim como a ferritina, também é capaz de ligar ferro. Na cavidade bucal, a lactoferrina, por sua vez, tem papel antimicrobiano, por remover ferro do meio, não deixando este metal disponível para o metabolismo de microrganismos (JORGE, 1995). Sua forma saturada, que é, portanto, incapaz de ligar mais ferro, perde o efeito

bacteriostático (THYSTRUP & FEJERSKOV, 1995). Portanto, além de sua ação sobre a proteína, caso a CHX pudesse induzir a liberação de ferro para o meio, ela poderia comprometer a função antimicrobiana da lactoferrina, por disponibilizar mais metal para o metabolismo dos microrganismos orais. Portanto, apesar de ter efeitos antimicrobianos amplamente reconhecidos, a CHX poderia diminuir as defesas naturais da saliva do indivíduo, por diminuir a eficácia de uma das proteínas constituintes da saliva (lactoferrina), com reconhecidos efeitos protetores.

A liberação de ferro de ferritina implicaria a CHX nos processos de lipoperoxidação ferro-induzida, os quais são muito importantes de serem estudados, visto que trazem conseqüências deletérias às membranas biológicas, principalmente o dano oxidativo (VLADMIROV *et al.*, 1980; MASINI *et al.*, 1985; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). De fato, os resultados obtidos não apenas mostram que a CHX é capaz de induzir a lipoperoxidação em concentrações muito inferiores às utilizadas na prática clínica (figura 8A) como também comprovam o papel determinante do ferro neste processo, pois a adição de um agente quelante deste metal (*o*-fenantrolina) inibiu completamente o efeito indutor da CHX (figura 8B). Assim, além de liberar ferro de ferritina, a CHX, no ambiente oral, poderia utilizar este mesmo metal liberado para induzir a lipoperoxidação, levando à injúria celular, aumentando seu efeito danoso ao paciente.

Um importante processo relacionado freqüentemente à lipoperoxidação trata-se da MPT. Porém, no caso da MPT, é o cálcio que tem papel fundamental. Verificou-se neste trabalho que a CHX é um potente indutor da MPT, com as seguintes características quanto ao mecanismo: este mecanismo envolve grupamentos -SH (DTT protegeu o efeito da CHX, figuras 11A e 11B), é dependente de cálcio, visto o papel inibitório do EGTA (figuras 12A e 12B) e está relacionado ao PMPT (visto a ação da CsA em concentração submicromolar, figuras 13A e 13B); por outro lado, ele não é dependente da formação de ERO, visto a inabilidade tanto do BHT (figuras 15A e 15B) quanto da catalase (figuras 16A e 16B), não é dependente da formação de lisofosfolípídeos, pois o brometo de

p-bromofenacila também não foi capaz de proteger as mitocôndrias do efeito da CHX (figuras 14A e 14B) nem da presença de ferro, visto a inabilidade da *o*-fenantrolina em proteger as mitocôndrias do efeito da CHX (figuras 17A e 17B). Portanto, parece que este mecanismo pelo qual a CHX induz a MPT é diferente daquele pelo qual ela induz a lipoperoxidação, visto ser este, um processo dependente de ferro. Outra questão importante que deve ser salientada aqui é o papel desempenhado pela CsA neste processo. Vale ressaltar que estudos mais recentes (ZORATTI & SZABÒ, 1995) mostraram que o mecanismo de MPT não depende da presença de lisofosfolípídeos, mas envolve o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PMPT), o qual é especificamente inibido por concentrações submicromolares de CsA. Ou seja, estes autores e outros (CROMPTON *et al.*, 1988) não acreditam que a ação da fosfolipase A₂ (presença de lisofosfolípídeos) seja suficiente para que ocorra a MPT, mas sim, a formação de um poro na m.m.i. que induz à entrada de suporte osmótico, colapso do potencial eletroquímico e inchamento mitocondrial, o que caracteriza a MPT. Portanto, os resultados do presente estudo estão de acordo com tais autores, visto que o processo foi especificamente inibido por CsA enquanto que o brometo de *p*-bromofenacila, o qual é inibidor da fosfolipase A₂, não o inibiu.

Estes dados são relevantes, pois os tratamentos com CHX geralmente são longos e, muitas vezes, necessitam de repetições. Portanto, o cirurgião dentista deve estar atento a estes possíveis efeitos deletérios causados pelo uso de CHX, a qual clinicamente é usada em concentrações muito mais elevadas que as utilizadas no presente estudo e deve considerar a relação dano-benefício que tal tratamento trará a seu paciente. Normalmente a prática odontológica deixa um pouco de lado aspectos como formação de radicais livres e dano oxidativo das células, contudo estas questões estão sendo cada vez mais abordadas e o conhecimento de que uma droga tão amplamente utilizada em odontologia pode causar tais danos não deve passar despercebido pelo profissional de saúde.

Este é o primeiro relato de que a bisbisguanida CHX interage com o amálgama dental, liberando Hg da liga metálica. Neste aspecto, o presente estudo

possui características fenomenológicas, não abordando o mecanismo pelo qual esta liberação ocorre. No entanto, algumas considerações podem ser feitas.

O amálgama dental é um biomaterial metalúrgico complexo, que consiste de várias fases distintas (8 a 10) com características microestruturais também distintas. A distribuição e a composição de cada fase depende da liga, dos métodos de colocação e manipulação do material, além das características individuais do hospedeiro (MAREK, 1992; ROTSTEIN *et al.*, 2000). A matriz de mercúrio é a principal fase do amálgama em qualquer marca comercial e, portanto, representa uma potencial fonte para a contínua, e muitas vezes prolongada, liberação deste metal, de fato comprovada em vários estudos (VIMY *et al.*, 1990; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; ECHEVERRIA *et al.*, 1998; HALBACH *et al.*, 2000).

Embora a possibilidade de formação de um complexo metálico entre a CHX e o Hg não possa ser ainda excluída, pois os espectros de absorção comparativos da droga, na ausência e na presença de Hg, não mostraram de forma inequívoca a formação de complexos (resultados não mostrados), a CHX pode ter facilitado a degradação do amálgama, removendo os filmes protetores de superfície e expondo, desta forma, a matriz de prata-mercúrio (Ag-Hg). A superfície de amálgama desprotegida poderia sofrer oxidação mais facilmente, levando à dissolução química da fase de Hg e, desta forma, liberar o Hg disponível para o meio. Esta proposição foi também aventada para o peróxido de carbamida, que também levou à liberação de Hg em experimentos *in vitro* (ROTSTEIN *et al.*, 2000).

Como não pôde ser feita nenhuma correlação estatisticamente significativa entre o índice de amálgama individual e a quantidade de Hg liberado após o bochecho com CHX, outros fatores como idade das restaurações, grau de degradação/corrosão prévios do amálgama, marca e manipulação do material bem como adestramento profissional durante a inserção da restauração devem ser levados em consideração.

Aspecto importante a ser também ressaltado no presente estudo é a correlação encontrada entre o índice de amálgama individual e o crescimento bacteriano após o bochecho com CHX (0,12%). Os dados da Figura 25 mostram que, naqueles indivíduos que apresentam menor índice de amálgama, o crescimento bacteriano foi menos expressivo e, da mesma forma, naqueles com maior índice de amálgama, o crescimento bacteriano foi maior. Em uma análise superficial, poder-se-ia supor que o resultado é conseqüência das diferenças individuais do ambiente oral e mesmo da saliva que, entre outros fatores, influenciaria qualitativamente a flora oral. No entanto, a possibilidade já discutida de que a exposição ao Hg poderia estar favorecendo uma seleção de flora resistente também a agentes antissépticos como a CHX não pode ser descartada, visto os dados da literatura (SUMMERS, 1986; SUMMERS *et al.*, 1993; LORSCHIEDER *et al.*, 1995), os quais mostram que a resistência bacteriana a Hg freqüentemente está relacionada com a resistência a antibióticos. Assim, os profissionais devem estar atentos quanto à presença de restaurações de amálgama dental na cavidade oral de pacientes periodontais, visto que tal presença poderá acarretar possíveis falhas ou diminuição de eficácia no tratamento periodontal associado com o uso de antimicrobianos.

Em relação à liberação de Hg das restaurações de amálgama, os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados da literatura, que mostram uma liberação contínua do metal para o ambiente bucal. A ADA considera o amálgama dental um material seguro, posicionando-se a favor de seu uso (ADA Council on Scientific Affairs, 1998); entretanto, existem muitos estudos mostrando o contrário (HAHN *et al.*, 1989; BOYD *et al.*, 1991; APOSHIAN *et al.*, 1992; LUND *et al.*, 1993; HULTMAN *et al.*, 1994; LORSCHIEDER *et al.*, 1995; HULTMAN *et al.*, 1998). Não é objetivo do presente trabalho gerar polêmica quanto ao uso do amálgama dental, apesar da contínua liberação de Hg para a cavidade oral. Entretanto, o conhecimento de que certas substâncias rotineiramente utilizadas na prática odontológica, como peróxido de carbamida (ROTSTEIN *et al.*, 2000) e CHX (no presente trabalho), estimulam a liberação de

Hg das restaurações de amálgama na cavidade oral dos pacientes, os quais ficam ainda mais expostos aos efeitos deletérios do Hg deve ser levado em consideração no momento da sua utilização.

Vale ressaltar a relevância dos resultados descritos no presente estudo, visto a facilidade de acesso à CHX, que é vendida em farmácias e supermercados sem supervisão profissional.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- *A CHX é um agente capaz de induzir a liberação de ferro de ferritina, de maneira dose-dependente;

- *A CHX é capaz de estimular a lipoperoxidação ferro-induzida a uma concentração (23 μM) muito inferior à usada na clínica odontológica (1,34 mM);

- *O processo de MPT induzido por CHX (0,5 e 2,5 μM) envolve a oxidação de grupamentos $-\text{SH}$ e a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, visto que foi inibido por DTT e CsA.

- *O processo de MPT induzido por CHX (0,5 e 2,5 μM) não envolve a formação de radicais livres que reagem com BHT nem de ERO (visto que BHT nem catalase foram capazes de inibir o processo), nem a presença de ferro ou de lisofosfolídeos, pois, respectivamente, a *o*-fenantrolina e o brometo de *p*-bromofenacila não foram capazes de inibir este processo;

- *Existe correlação entre o índice de amálgama e o crescimento bacteriano observado na saliva após o bochecho com CHX. Quanto maior o índice de amálgama, maior o crescimento bacteriano, após um bochecho com CHX a 0,12%, na população estudada;

- *A CHX aumenta a liberação de Hg de amálgama dental, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, o estímulo da liberação de Hg foi de aproximadamente duas vezes para ambas as marcas comerciais, GS50 e Permite C. *In vivo*, 50% da população avaliada mostrou um aumento na liberação de Hg estatisticamente significativo. Em 60% dos indivíduos que apresentaram liberação aumentada de Hg, o aumento foi de, pelo menos, três vezes o valor basal, obtido antes do bochecho com CHX.

- *Não existe correlação entre o índice de amálgama e a liberação de Hg induzida por bochechos com CHX na população estudada.

7. ANEXOS

ANEXO I

CLORHEXIDINA DIGLUCONATO 20%
55
SP - SPIns^o

Lote : A-000125

Origem: Espanha
Procedencia: EspanhaFabric.: 03/2000
Validade: 03/2003

Formula: C22H30CL2N10,2C6H12O7

NCM : 2925.20.23

Categoria Terapeutica: ANTIBACTERIANO

PM: 898

DCB: 0302.01-5

No. DEG: 00003701 12/09/2000

CAS: 55-56-1

| Ensaio | Especificacao | Resultado |
|------------------|--|---------------|
| DESCRIÇÃO | LIQUIDO AMARELO PALIDO OU QUASE INCCOLOR | DE ACORDO |
| IDENTIFICAÇÃO | PH. EUR., BP | POSITIVA |
| DENSIDADE | 1.06 - 1.07 | 1.066 |
| PH 5.0% V/V SOL | 5,5 - 7,0 | 6.2 |
| CINZAS SULFATAD | NAO MAIS QUE 0.1% | DE ACORDO |
| COROANILINA | MAX. 100PPM | PASSA O TESTE |
| SUBST. RELATADAS | PH. EUR., BP | PASSA O TESTE |
| DOSEAMENTO | 19,0 - 21,0% W/V | 20,4% W/V |
| | MONOGRAFIA - AS ESPECIFICACOES CUMPREM COM EP E SP. | |

Armazenamento - Conservar em recipientes bem fechados
- Proteger da luz

Informacoes Adicionais: SINONIMO. CHLORHEXIDINE GLUCONATE SOLUTION

Parecer Tecnico : - NA IMPOSSIBILIDADE TECNICA DE RE-ANALISE DA REFERIDA SUBSTANCIA,
INFORMAMOS SER ESTA, UMA COPIA DO LAUDO ORIGINAL

Ok
juo
03/11/00

03/11/00
LABORATORIO DE ANALISES QUIMICAS
RUA JURUPARI, 775/779
JARDIM ORIENTAL, SÃO PAULO - SP
CEP 04348-070

DEG-IMP. PRODS. QUIM. LTDA
Rua Jurupari, 775/779
CNPJ: 44.015.477/0001-16

Fone (011) 5031-6555
Jardim Oriental

Fax (011) 5031-6055
São Paulo - SP
Inscrição Estadual: 109.235.767.110

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO CLÍNICO

“Análise dos efeitos clínicos da clorexidine: interação com restaurações de amálgama e atividade antibacteriana”

Pesquisador Responsável: Ana Paula Negrelo Newton Cirurgiã Dentista

Este é um convite para você participar voluntariamente de um estudo clínico sobre os efeitos da clorexidine (nome comercial: Periogard), como sua interação com restaurações de amálgama e sua atividade antibacteriana após um único bochecho. Por favor, leia com atenção as informações abaixo, antes de dar seu consentimento para participar ou não do estudo. Qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com que você está conversando neste momento.

OBJETIVO DO ESTUDO:

O objetivo principal deste trabalho é analisar algumas questões ainda não bem esclarecidas em relação ao uso deste colutório (bochecho) bucal, principalmente sua possível interação com restaurações de amálgama presentes na boca de seus usuários.

PROCEDIMENTOS:

Caso você concorde em participar deste estudo, você terá apenas que permitir a coleta de sua saliva antes e após o bochecho com clorexidine.

A primeira coleta será feita antes do bochecho. É importante que você não tenha consumido nenhum alimento ou bebida por, pelo menos, duas horas antes, pois isso leva à estimulação da salivagem, e a saliva que queremos analisar é a saliva chamada “não estimulada” ou “em repouso”. Você terá apenas que acumular a saliva na cavidade bucal, para que a coleta (em tubos cônicos estéreis e em béckers individuais) possa ser feita (2,5ml cada).

Após esta coleta inicial, você fará o bochecho com 10ml de uma solução de clorexidine a 0,12%, durante 1 minuto. Após isso, cuspirá todo o excesso do colutório, desprezará a saliva formada no primeiro minuto após o bochecho e, então novamente começará a acumular saliva na boca (2,5mL) para a segunda coleta.

Estas duas coletas (antes e após o bochecho) servirão para as análises da interação da droga com as restaurações de amálgama e sua capacidade antimicrobiana após um único bochecho.

EFEITOS ADVERSOS/DESCONFORTOS ESPERADOS:

Já existem na literatura alguns relatos sobre os efeitos adversos do uso da clorexidine como colutório bucal. Entre eles estão: manchamento dos dentes e/ou restaurações, devido à interação da droga com corantes alimentares e outras substâncias; comprometimento reversível do paladar, principalmente ao salgado e, mais raramente, descamação da mucosa oral e reações de hipersensibilidade de contato à droga (alergias). Entretanto, estes efeitos são observados após o uso a longo prazo da droga (após duas semanas de uso ininterrupto). Como este estudo irá analisar os efeitos da droga após um único bochecho, não esperamos que nenhum destes efeitos ocorra em nenhum dos pacientes.

CONTRA-INDICAÇÕES:

O uso de clorexidine é contra-indicado a pessoas com história prévia de hipersensibilidade a este agente.

BENEFÍCIOS:

Este projeto não irá interferir em nenhum benefício adicional à sua saúde. O estudo servirá para esclarecer melhor os efeitos da droga bem como suas interações com o ambiente oral (restaurações e microbiota).

TRATAMENTOS/PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS DISPONÍVEIS:

Durante um tratamento periodontal, a opção de se fazer uso ou não de colutórios contendo substâncias antimicrobianas juntamente com o tratamento clínico fica a critério do cirurgião dentista.

USO DE GRUPO CONTROLE/PLACEBO:

Os grupos controle teste utilizados nesta pesquisa serão constituídos pelo mesmo grupo de pacientes. Assim, o controle será feito utilizando-se as amostras de saliva coletadas antes do bochecho com clorexidina e o teste será feito utilizando-se as amostras de saliva coletadas após o bochecho. Assim, variáveis como fluxo salivar, número de restaurações, fluidez/viscosidade da saliva estarão presentes nos dois grupos da mesma forma, não alterando significativamente os resultados.

DESPESAS:

Todas as despesas necessárias para a realização desta pesquisa são de responsabilidade dos pesquisadores.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

A sua participação neste estudo é voluntária. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado para justificar a sua falta.

GARANTIA DE SIGILO E PRIVACIDADE:

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos dentistas que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS:

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

IDENTIFICAÇÃO:

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

EQUIPE DE PESQUISADORES:

Os pesquisadores envolvidos neste projeto são:

- * Mestranda Ana Paula Negrelo Newton Cirurgiã Dentista. CRO 11.806
- * Prof.a Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira Matrícula UFPR n.º 77461

A pesquisadora Ana Paula Negrelo Newton (tel. 278-8691) poderá ser contactada para esclarecimentos ou possíveis problemas que possam surgir durante a pesquisa.

COMITÊ DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Fui informado de que este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas e que no caso de qualquer problema ou reclamação em relação à conduta dos pesquisadores deste projeto, poderei procurar o referido Comitê, localizado na Direção do Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná.

Diante do exposto acima eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os possíveis desconfortos que poderei sentir, assim como sobre os benefícios que poderão resultar deste estudo. Concedo meu acordo de participação de livre e espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos neste projeto, ou seja, os pesquisadores deste projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos, não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar desta pesquisa.

Curitiba, ____ de _____ de 2001.

Assinatura do sujeito experimental
RG:

Assinatura do pesquisador



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê Setorial de Ética em Pesquisa



Projeto: “Análise dos efeitos clínicos da clorexidine (CHX): tempo de retenção na cavidade oral, interação com restaurações de amálgama e atividade antibacteriana”

Pesquisadora Responsável: Dra. Maria Benigna M. Oliveira, Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Local: Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, UFPR

Data de Apresentação à CEP Setor de Ciências Biológicas: 20 de agosto de 2000

Banpesq: 2001009487

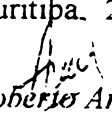
Trata-se da parte clínica de um projeto maior (“Efeito das bisbiguanida clorhexedine (CHX) sobre a transição de permeabilidade mitocondrial, lipoperoxidação e sua interação com metais), cujos resultados dos estudos realizados *in vitro* e em animais indicaram uma significativa liberação de Hg do amálgama dentário quando da interação com clorhexidine, ressaltando a importância desta avaliação clínica.

O presente estudo, através de desenho analítico tipo pré X pós, pretende avaliar: a liberação de Hg de restaurações de amálgama dental, tempo de retenção da CHX na boca, atividade antimicrobiana residual na saliva após um único bochecho, O bochecho com clorhexidine será realizado segundo indicação clínica consagrada, consistindo em tratamento usual para a patologia apresentada pelos pacientes, em tratamento na Disciplina de Periodontia da UFPR.

A metodologia a ser empregada é adequada, sendo uma pesquisa exequível no local proposto, apresentando grande relevância científica e clínica. O estudo será coordenado por pesquisadora com ampla qualificação e experiência na área, como pode ser verificado pela análise de seu curriculum.

Parecer apresentado à reunião ordinária da CEP-Setor de Ciências Biológicas - UFPR em **27 de agosto de 2001**, tendo sido **aprovado por unanimidade**. Conforme resolução 186/96, por tratar-se de área temática, este parecer, assim como cópia completa do projeto, será encaminhado ao CONEP.

Curitiba, 27 de agosto de 2001


Roberto Andreatini

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do
Setor de Ciências Biológicas

FORMULÁRIO SIMPLIFICADO DA OMS PARA COLETA DE INFORMAÇÕES EM SAÚDE BUCAL

País: _____ Ano: _____ Mês/Dia: __/__/ N° Incrição: _____

INFORMAÇÕES GERAIS:

NOME: _____ IDADE: _____

SEXO: () F () M

Nível Educacional

Superior Incompleto () Superior Completo () Mestrado () Doutorado ()

Índice CPO-D: _____

| Componente C | Componente P | Componente O |
|--------------|--------------|--------------|
| | | |

Índice de Amálgama: _____

| Número de Faces da Restauração | Número de Restaurações |
|--------------------------------|------------------------|
| 01 | |
| 02 | |
| 03 ou mais | |

Índice Gengival: _____

Lesões de Mucosa: () Não () Sim Onde? _____

Uso de Medicamentos: () Não () Sim Qual? _____

Já fez algum tratamento periodontal antes? () Não () Sim
Há quanto tempo? _____

Já fez uso de colutório contendo CHX anteriormente? () Não () Sim
Há quanto tempo? _____

Após o uso do colutório, notou alguma diferença an percepção do paladar?

() Não () Sim

8. Referências Bibliográficas

ADDY, M.; MAHDAVI, S. A.; LOYN, T. Dietary staining *in vitro* by mouthrinses as a comparative measure of antiseptic activity and predictor of staining *in vivo*. **J. Dent.**, Oxford, v. 23, p. 95-99, 1995.

ADDY, M.; PRAYITNO, S.; TAYTLOR, L.; CADOGAN, S. An *in vitro* study of the role of dietary factors in the etiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 14, p. 403-410, 1979.

APOSHIAN, H. V. Mobilization of mercury and arsenic in humans by sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate (DMPS). **Environ. Health Perspect.**, Washington, v. 106, Supplem. 04, 1998.

APOSHIAN, H. V.; BRUCE, D. C.; ALTER, W.; DART, R. C.; HURLBUT, K. M.; APOSHIAN, M. M. Urinary mercury after administration of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid: Correlation with dental amalgam score. **FASEB J.**, Bethesda, v. 6, p. 2472-2476, 1992.

ASTOE-JÖRGENSEN, V.; ATTSTRÖM, R.; LANG, N.; LÖE, H. Effect of a chlorhexidine dressing on the healing after periodontal surgery. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 45, p. 13, 1974.

AUDUS, K. L., TAVAKOLI-SABERI, M. R., ZHENG, H., BOYCE, E. N. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 71, n. 6, 1298-1303, 1992.

BERNARDI, P. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers and Permeability Transition. **Phys. Rev.**, Chicago, v. 79, n. 4, p. 1127-1155, 1999.

BERRY, T. G.; NICHOLSON, J.; TROENDLE, K. Almost two centuries with amalgam: Where are we today? **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 125, p. 392, 399, 1994.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24^a ed. São Paulo : Melhoramentos, 1994.

BLACK, G. V. **Operative dentistry**. 7^a ed. Chicago : Médico Dental, 1936, v.2.

BLOCH, P.; SHAPIRO, I. M. Summary of the International Conference on Mercury Hazards in Dental Practice. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 104, p. 489-490, 1982.

BONINE, F. L. Effect of chlorhexidine rinse on the incidence of dry socket in impacted mandibular third molar extraction sites. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 79, p. 154, 1995.

BOYD, N. D.; BENEDIKTSSON, H.; VIMY, M. J.; HOOPER, D. E.; LORSCHIEDER, F. L. Mercury from dental "silver" tooth fillings impairs sheep kidney function. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 261, R1010-R1014, 1991.

BREMNER, M. D. K. **The Story of Dentistry**. 3rd Ed. Brooklyn : Dental Items of Interest Publ. Co.

BRETHERRICK, M. **Hazards in the Chemical Laboratory**. 4th ed. London : The Royal Society of Chemistry., 1986.

BRUNE, D.; GJERDET, N.; PAULSEN, G. Gastrointestinal and in vitro release of copper, cadmium, indium, mercury and zinc from conventional and copper-rich amalgams. **Scand. Dent. Res.**, Copenhagen, n. 91, p. 66-71, 1983.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. **Microsomal Lipid Peroxidation**. In: FLEICHER, S., PACKER, L. **Methods in Enzimology**. New York/London : Academic Press, 1978. v.52. pp.302-310.

BULAT, P.; DUJIC, I.; POTKONJAK, B.; VIDA KOVIC, A. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **Int. Arch. Occup. Health**, Berlin, v. 71, Suppl, S37-S39, 1998.

CANCRO, L. P., PAULOVICH, D. B., KLEIN, K., PICOZZI, A. Effects of a chlorhexidine gluconate mouthrinse on dental plaque and calculus. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 43, n. 11, p. 687-691, 1972.

CANTONI, O.; EVANS, R. M.; COSTA, M. Similarity in the acute cytotoxic response of mammalian cells to mercury (II) and X-rays: DNA damage and glutathione depletion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 108, p. 614-619, 1982.

CARBONERA, D & AZZONE, G. F. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. **Biochem. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 943, p. 245-255, 1988.

CASSARINO, D. S.; PARKS, J. K.; PARKER Jr., D.; BENNETT Jr, J. The parkinsonian MPP⁺ opens the mitochondrial permeability pore and releases cytochrome *c* in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1453, p. 49-62, 1999.

CHAN, K. C. & SVARE, C. W. Mercury Vapor Emission from Dental Amalgam. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 51, n. 02, p. 555-560, 1972.

CHAVES, M. M. **Odontologia social**. 3^aed. São Paulo: Artes Médicas, 1986.

CHRISTENSEN, F.; BLEEG, H. S.; JENSEN, J. E. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver mitochondria. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v.36, p.01-12, 1975.

CHRISTENSEN, F.; JENSEN, J. E. The effect of chlorhexidine on some biochemical parameters of rat liver microsomes. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v.35, p.33-41, 1974.

CHUNG, A. S.; MAINES, M. D.; REYNOLDS, W. A. Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney: Reversal by selenium. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 31, p. 3093-3100, 1982.

CROMPTON, M.; McGUINNESS, °; NAZARETH, W. The involvement of cyclosporin A binding proteins in regulating and uncoupling mitochondrial energy transduction. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1101, p. 214-217, 1992.

DA LOZZO, E.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. V. S. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, Madison, v. 12, n. 5, 1998.

DAVIES, R. M.; LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R.; JENSEN, S. B. Chlorhexidine in the prevention of gingivitis. In: EASTOE, J. E.; PICTON, D. C. A.; ALEXANDER, A. G. **The prevention of periodontal disease**. London : Henry Kimpton Publ. 1970, p.224-229.

DRASCH, G.; SCHUPP, I.; HÖFL, H.; REINKE, R.; ROIDER, G. Mercury burden of human fetal and infant tissues. **Eur. J. Pediatr.**, Paris, v. 153, p. 607-610, 1994.

ECHEVERRIA, D.; APOSHIAN, H. V.; WOODS, J. S.; HEYER, N. J.; APOSHIAN, M. M.; BITTNER Jr., A. C.; MAHURN, R. K.; CIANCIOLA, M. Neurobehavioral

effects from exposure to dental amalgam Hg: new distinctions between recent exposure and Hg body burden. **FASEB J.**, Bethesda, v. 12, p. 971-980, 1998.

ELLINGSEN, J. E.; ROLLA, G.; ERIKSEN, H. M. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.9, p. 317-322, 1982.

ERIKSEN, H. M.; NORDBÖ, H. Extrinsic discoloration of teeth. Review Article. **J. Clin. Periodont.**, Copenhagen, v. 5, p. 229-236, 1978.

FAGIAN, M. M.; DA SILVA, L. P.; MARTINS, I. S.; VERCESI, A. E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus oxidants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 19955-19960, 1990.

FLOTRA, L.; GJERMO, P.; ROLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 79, p. 119-125, 1971.

FOWLER, B. A.; WOODS, J. S. Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria following chronic oral methyl mercury exposure: The relationship to renal function. **Exp. Mol. Pathol.**, Orlando, v. 27, p. 403-412, 1977.

FRUSTACI, A.; MAGNAVITA, N.; CHIMENTI, C.; CALDARULO, M.; SABBIONI, E.; PIETRA, R.; CELLINI, C.; POSSATI, G. F.; MASERI, A. Marked elevation of myocardial trace elements in idiopathic dilated cardiomyopathy compared with secondary cardiac dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 33, n. 06, p. 1578-1583, 1999.

FUNK, F.; LENDERS, J. P.; CRICHTON, R. R.; SHNEIDER, W. Reductive mobilisation of ferritin iron. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 152, p. 167-172, 1985.

GERHARD, I.; MONGA, B.; WALDBRENNER, A.; RUNNEBAUM, B. Heavy metals and fertility. **J. Toxicol. Environm. Health PART A**, London, v. 54, p. 593-611, 1998.

GOLDSCHMIDT, P., COGEN, R. & TAUBMAN, S. Cytopathological effects of chlorhexidine on human cells. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 48, p. 212-215, 1977.

GOYER, R. A.; RHYNE, B. C. Toxic changes in mitochondrial membranes and mitochondrial function. *In: Pathobiology of Cell Membranes*, Eds Trump B. F. and Arstila A. U., v. 1; p. 383-428, Academic Press, New York, 1975.

GREENSTEIN, G.; POLSON, A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: A comprehensive review. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 5, p. 507-520, 1998.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W; KOTANKO, P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 32, p. 2969-2972, 1983.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S.; GAVIN, C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 267, C313-C399, 1994.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. 755-786, 1990.

HA, Y.; CHEUNG, A. P. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 14, p. 1327-1334, 1996.

HAHN, L. J.; KLOIBER, R.; VIMY, M. J.; TAKAHASHI, Y.; LORSCHIEDER, F. L. Dental "silver" tooth fillings: a source of mercury exposure revealed by whole-body image scan and tissue analysis. **FASEB J.**, Bethesda, v. 3, p. 2641-2646, 1989.

HAHN, L. J.; KLOIBER, R.; LEININGER, R. W.; VIMY, M. J.; LORSCHIEDER, F. L. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 3256-3260, 1990.

HALESTRAP, A. P.; KERR, P. M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K. Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsternam, v. 1366, p. 70-94, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed. New York : Oxford University Press, 1999.

HAROLD, F. M.; BAARDA, C.; BARON, C., ABRAMS, A. DIO₉ and Chlorhexidine: Inhibitors of membrane-bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 183, p. 129-136, 1969.

HATCH, W. R.; OTT, W. L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. **Anal. Chem.**, Washington, v. 40, p. 2085-2087, 1968.

HEARD, D. D. & ASHWORTH, R. W. The colloidal properties of chlorhexidine and its interaction with some macromolecules. **J. Pharm. Pharmac.**, London, v. 20, p. 505-512, 1968.

HELGELAND, K., HEYDEN, G. & RÖLLA, G. Effect of chlorhexidine and animal cells in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 83, p. 288-292, 1975.

HELMS, J. A.; DELLA-FERA, M. A.; MOTT, A. E.; FRANK, M. E. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch. Oral Biol.**, Kidlington, v. 40, n. 10, p. 913-920, 1995.

HUGGINS, H. A. Systemic reactions to silver amalgam fillings. **Workshop on Biocompatibility of metals in dentistry**. Chicago : National Institute of Health, American Dental Association, p. 201-264, 1984.

HULTMAN, P.; JOHANSSON, U.; TURLEY, S. J. ; LINDH, U.; ENESTRÖM, S.; POLLARD, K. M. Adverse immunological effects and autoimmunity induced by dental amalgam and alloy in mice. **FASEB J.**, Bethesda, v. 08, p. 1183-1190, 1994.

HULTMAN, P.; LINDH, U.; HÖRSTED-BINDSLEV, P. Activation of the Immune System and Systemic Immune-Complex Deposits in Brown Norway Rats with Dental Amalgam Restorations. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, n. 06, p. 1415-1425, 1998.

HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanism. **Arch. Biochim. Biophys.**, Duluth, v. 195, n. 2, p. 453-459, 1979.

JAMINET, FR., DELATTRE, L., DELPORTE, J. P., MOES, A. Influence de la température de stérilisation et du pH sur la stabilité de la chlorhexidine en solution. **Pharm. Acta Helvetiae**, Surich, v. 45, p. 60-63, 1970.

JENKINS, S., ADDY, M., WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine; A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, p. 415-424, 1988.

JENSEN, J. E. Binding of dyes to chlorhexidine-treated hydroxyapatite. **Scand. J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 85, p. 334-340, 1977.

JENSEN, J. E.; BLEEG, H.; CHRISTENSEN, F. The effect of chlorhexidine on some enzymes activities of rat liver lysosomes and peroxisomes. **Acta pharmacol. et toxicol.**, Copenhagen, v.36, p.366-376, 1975.

JOHNSON, N. W. & KENNEY, E. B. Effects of topical application of chlorhexidine on plaque and gingivitis in monkeys. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 7, p. 180, 1972.

JORGE, A. O. **Microbiologia Bucal**. 2^a ed. São Paulo : Ed. Santos, 1995.

KANTOLA, M. Different biological forms of mercury. **Food Chem.**, Exeter, v. 57, n. 1, p. 120-121, 1996.

KENNEY, E. B., SAXE, S. R. & BOWLES, R. D. Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. **Arch. Oral Biol.**, Kidlington, v. 17, p. 1633-1636, 1972.

KNUUTTILA, M. & S+ODERLING, E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 39, p. 285-289, 1981.

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Rad. Biol. & Med.**, New York, v. 26, n. 3/4, p. 463-471, 1999.

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca²⁺:

correlation with mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1318, p. 395-402, 1997.

LAMBERT, P. M., MORRIS, H. F., OCHI, S. The influence of 0,12% chlorhexidine digluconate rinses on the incidence of infectious complications and implant success. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 55, p. 25-30, 1997, Suppl. 5.

LANG, N. P.; CATALANOTTO, F. A.; KNÖPFLI, R. U.; ANTCZAK, A. A. A. Quality specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, p. 43-48, 1988.

LENGA, R. E. **The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data.** Edition 1. Milwaukee : Aldrich Chemical Co., 1985.

LEINFELDER, K. F.; LEMONS, J. E. **Clínica Restauradora - Materiais e Técnicas.** São Paulo : Ed. Santos, 1995.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica.** 2ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara – Koogan, 1992.

LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J. Periodontal Res.** Copenhagen, v.5, p.79-83, 1970.

LORSCHIEDER, F. L.; VIMY, M. J.; SUMMERS, A. O. Mercury exposure from “silver” tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. **FASEB J.**, Bethesda, v. 09, p. 504-508, 1995.

LOWRY, O. H.; RESENBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p.265-275, 1951.

LUND, B.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid oxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 42, S181-S187, 1991.

LUND, B.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 45, n. 10, p. 2017-2024, 1993.

MACKENZIE, I. C.; NUKI, K.; LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. Two years oral use of chlorhexidine in man V. Effects on stratum corneum of oral mucosa. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.11, p.165-171, 1976.

MAGOS, L.; HALBACH, S.; CLARKSON, T. W. Role of Catalase in the oxidation of mercury vapor. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 27, p. 1373-1377, 1978.

MALKEVITCH, N. V.; DEDUKHOVA, V. I.; SIMONIAN, R. A.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A.A. Thyroxine induces cyclosporine A-insensitive, Ca²⁺-dependent reversible permeability transition pore in rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 412, p. 173-178, 1997.

MAREK, M. The Release of Mercury from Dental Amalgam: The Mechanism and *in vitro* Testing. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 69, n. 5, p. 1167-1174, 1990.

MAREK, M. Interactions Between Dental Amalgams and the Oral Environment. **Adv. Dent. Res.**, v. 6, p. 100-109, 1992.

MASINI, A.; TRENTI, T.; CECCARELLI-STANZANI, D.; VENTURA, E. The effect of ferric ion complex on isolated rat liver mitochondria. I. Respiratory and electrochemical responses. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 810, p. 20-26, 1985.

McNEAL, D. R. Anticalculus Agents for Treatment, Control and Prevention of Periodontal Disease. **J. Public Health Dent.**, Richmond, v. 29, p. 139, 1969.

MEZZOMO, E. **Reabilitação oral para o clínico.** 3ª ed. São Paulo : Ed. Santos, 1997.

MOLIN, M.; BERGMAN, B.; MARKLUND, S. L.; SCHÜTZ, A.; SKERFVING, S. Mercury, selenium, and glutathione peroxidase before and after amalgam removal in man. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 48, p. 189-202, 1990.

NEWBRUN, E. **Cariologia.** 2ª ed. São Paulo : Ed. Santos, 1988.

NICHOLLS, D. G.; AKERMAN, K. Mitochondrial calcium transport. **Biochem Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 683, p. 57-58, 1982.

NIEMINEN, A. L.; GORES, G. J.; DAWSON, T. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Toxic injury from mercuric chloride in rat hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 2399-2408, 1990.

NORDBÖ, H. Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine and aldehydes or ketones in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 79, p. 356-361, 1971.

NORDBÖ, H.; ATTRAMADAL, A.; ERIKSEN, H. M. Iron discoloration of acrylic resin exposed to chlorhexidine or tannic acid: A model study. **J. Prosth. Dent.**, St. Louis, v. 49, n. 1, p. 126-129, 1983.

NORDBÖ, H.; ERIKSEN, H. M.; ROLLA, G.; ATTRAMADAL, A.; SOLHEIM, N. Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine; Preliminary report. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, p. 117-123, 1982.

NUKI, K.; SCHLENKER, R.; LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. Two years oral use of chlorhexidine in man VI. Effect on oxidative enzymes in oral epithelia. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.11, p.172-175, 1976.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 316, n. 1, p. 607-611, 1995.

OZAWA, T. Oxidative damage and fragmentation of mitochondrial DNA in cellular apoptosis. **Biosc. Rep.**, New York, v. 17, p. 237-248, 1997.

PHILLIPS, R. W. **Materiais Dentários de Skinner**. 8^a ed. Rio de Janeiro : Interamericana, 1984.

PINTO, V. G. **Saúde Bucal – Odontologia Social e Preventiva**. São Paulo : Ed. Santos, 1989.

POTER, V. R. The assay of animal tissues for respiratory enzymes. Further studies on oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 169, p. 17-37, 1947.

PUCHER, J. J. & DANIEL, J. C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, p. 526-532, 1993.

REED, M. J.; STAPLE, P. H.; MASHIMO, P. A. Use of chlorhexidine gluconate to inhibit dental plaque accumulation *Macaca speciosa*. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 48, p. 219, 1977.

REINHARDT, J. W. Risk assessment of mercury exposure from dental amalgams. **J. Publ. Health Dent.**, Richmond, v. 48, p. 172-177, 1988.

RING, M. E. **Dentistry: An Illustrated History**. New York : H. N. Abrams Inc. Publ., 1985.

ROCHA, M. E. M.; FERREIRA, A. M. D. C.; BECHARA, E. J. H. Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. **Free Rad. Biol. Med.**, Bethesda, v. 29, n. 12, p. 1272-1279, 2000.

ROTSTEIN, I.; DOGAN, H.; AVRON, Y.; SHEMESH, H.; STEINBERG, D. Mercury release from dental amalgam after treatment with 10% carbamide peroxide in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 89, n. 2, p. 216-219, 2000.

SAX, N. I. & LEWIS, R. J. **Hawley's Condensed Chemical Dictionary**. 11th ed, New York : Van Nostrand Reinhold, 1987.

SCHIÖTT, C. R.; BRINER, W. W.; LÖE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man II. The effect on the salivary bacterial flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.11, p.145-152, 1976.

SCHIOTT, C.; R.; LÖE, H.; JENSEN, B. K. M.; DAVIES, R. M.; GLAVIND, K. The Effect of Chlorhexidine Mouthrinses on the Human Oral Flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.5, p. 84, 1970.

SCHIÖTT, C. R.; BRINER, W. W.; KIRKLAND, J. J.; LÖE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man III. Changes in sensitivity of the salivary flora. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.11, p.153-157, 1976.

SCHIÖTT, C. R.; LÖE, H.; BRINER, W. W. Two year oral use of chlorhexidine in man IV. Effect on various medical parameters. **J. Periodontal Res**, Copenhagen, v.11, p.158-164, 1976.

SHEEN, S.; BANFIELD, N., ADDY, M. The propensity of individual saliva to cause staining in vitro – a developmental method. **J. Dent**, Oxford, v. 29, p. 99-102, 2001.

SHIP, I. I.; SHAPIRO, I. M.; MILLER, W. D. Mercury poisoning in dental practice. **Compend. Contin. Edu. Dent**, v. 4, p. 107-110, 1983.

SIEGRIST, B. E.; BRECX, M. C.; GUSBERTI, F. A.; JOSS, A.; LANG, N. P. In vivo study early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning microscope and bacteriological study. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 2, p. 38-46, 1991.

SKÖLD, K.; TWETMAN, S; HALLGREN, A.; YUCEL-LINDBERG, T.; MODÉER, T. Effect of a chlorhexidine/tymol-containing varnish on prostaglandin E₂ levels in gingival crevicular fluid. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 106, p. 571-575, 1998.

SOUTHARD, J. H.; NITISEWOJO, P. Loss of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from kidneys or mercury poisoned rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 52, 921-927, 1973.

STALLARD, R. E., VOLPE, A. R., ORBAN, J. E., KING, W. J. The effect of an Antimicrobial Mouthrinse on Dental Plaque, Calculus and Gingivitis. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, Supp., v. 4, p. 32, 1969.

STURZENBERGER, ° P. & LEONARD, G. S. The Effect of a Mouthrinse as Adjunct in Toothcleaning. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 40, p. 299, 1969.

SUMMERS, .A O. Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 40, p. 607-634, 1986.

SUMMERS, .A O.; WIREMAN, J.; VIMY, M. J.; LORSCHIEDER, F. L.; MARSHALL, B.; LEVY, S. B.; BENNET, S.; BILLIARD, L. Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. **Antimicrob. Agents Chemotherap.**, Whashington, v. 37, p. 825-834, 1993.

TAKAHASHI, Y.; TSURUTA, S.; HASEGAWA, J.; KAMEYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues. **Toxicology**, Shannon, v. 163, p. 115-126, 2001.

TAKAYANAGI, R.; TAKESHIGE, K.; MINAKAMI, S. NADH and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. **Biochem. J.**, London, v.192, p.853-860, 1980.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 2ª ed. São Paulo : Ed. Santos, 1995.

TOYOKUNI, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. **Free Raddic. Biol. Med.**, Chicago, v. 20, p. 553-566, 1996.

VIMY, M. J.; TAKAHASHI, Y.; LORSCHIEDER, F. L. Maternal-fetal distribution of mercury (²⁰³Hg) released from dental amalgam fillings. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 258, R939-R945, 1990.

VISSINK, A.; SPIKERVET, F. K. L. Aging and saliva: A review of the literature. **Spec. Care Dent.**, Chicago, v. 16, p. 95-103, 1996.

VLADIMIROV, Y. A.; OLENEV, V. I.; SUSLOVA, T. B.; CHEREMISINA, Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv. Lipid. Res.**, San Diego, v. 17, p. 173-249, 1980.

VOSS, D. O.; CAMPELLO, A. P.; BACILA, M. The respiratory chain and oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 4, p. 48-51, 1961.

WANNAY, A.; SIGAERASEN, J. Mercury accumulation in placenta and fetal membranes: a study of dental workers and their babies. **Environ. Phys. Biochem.**, Copenhagen, v. 5, p. 348-352, 1975.

WARNER, R. R.; MYERS, M. C.; TAYLOR, D. A. Electron probe analysis of human skin: Determination of the water concentration profile. **J Invest Dermatol.**, New York, v. 90, p. 218-224, 1988.

WARNER, R. R.; MYERS, M. C.; BURNS, J.; MITRA, S. Analytical electron microscopy of chlorhexidine-induced tooth stain in humans: direct evidence for metal-induced stain. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v. 28, p. 255-265, 1993.

WEINBERG, J. M.; HARDING, P. G.; HUMES, H. D. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. I. Direct effects of *in vitro* mercuric chloride on renal cortical mitochondrial function. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 60-67, 1982a.

WEINBERG, J. M.; HARDING, P. G.; HUMES, H. D. Mitochondrial bioenergetics during the initiation of mercuric chloride-induced renal injury. II. Functional alterations of renal cortical mitochondria isolated after mercuric chloride treatment. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 68-74, 1982b.

WEISS, B.; LANDRIGAN, P. J. The developing brain and the environment, an introduction. **Environm. Health Perspect.**, Washington, v. 108, n. 03, p. 373-4, 2000.

WHO. Environmental Health Criteria, Inorganic mercury. **World Health Organization.**, Geneva, v. 118p. 29-67, 1991.

ZORATTI, M. & SZABÒ, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.