

Avaliação clínica e microbiológica do uso de um creme dental contendo clorexidina a 1%

Augusto Cesar de Andrade MEYER^a, Tábata de Mello TERA^a,

Cristiane Yumi KOGA ITO^c, Warley David KERBAUY^b,

Maria Aparecida Neves JARDINI^b

^a*Graduandos pela Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil*

^b*Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil*

^c*Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil*

Meyer ACA, Tera TM, Ito CYK, Kerbauy WD, Jardim MAN. Clinical and microbiological evaluation of the use of a toothpaste containing chlorhexidine 1%. Rev Odontol UNESP. 2007; 36(3)255-260.

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia clínica e microbiológica de um creme dental com clorexidina a 1%, usado por um período de quatorze dias na redução do Índice de Placa, Índice Gengival e do Índice de Manchamento das superfícies dentais, bem como o impacto sobre os microrganismos salivares. Neste estudo duplo cego, os voluntários foram divididos em dois grupos, cada um com 15 participantes, sendo: 1) Teste - que fizeram uso de um creme dental com clorexidina a 1% e 2) Controle - que fizeram uso de um creme dental com semelhante formulação, porém sem a clorexidina a 1%. Um único examinador realizou a coleta da saliva e a avaliação dos índices ocorreu nos dias 0, 7 e 14. As amostras de saliva de cada paciente foram diluídas, semeadas e incubadas. Realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) de saliva, a análise da porcentagem de redução dos microrganismos salivares e a comparação da contagem entre os dias 7 e 0, 14 e 0, e 14 e 7. Os dados foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). Neste estudo de curta duração não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (Teste e Controle) quanto aos Índices de Placa, Gengival e Manchamento. Entretanto, observou-se redução expressiva dos microrganismos salivares entre os dias 14 e 0 ($p < 0,05$). Comparando-se entre si os grupos 1) Teste e 2) Controle, observou-se diferença significativa entre os dias 7 e 14 ($p < 0,05$), sendo essa diferença maior no dia 14 ($p = 0,0006$).

Palavras-chave: Clorexidina; creme dental; índice de placa.

Abstract: The aim of the present study was the evaluation of the clinical and microbiological efficacy on the reduction of salivary microorganisms and the impact on Plaque Index, Bleeding Index and Staining Tooth Index by using a 1% chlorhexidine toothpaste. This 14 days study applied a double-blind cross-over method over 2 groups with 15 volunteers each. The first one was a Test Group that used the 1% chlorhexidine toothpaste and the second one was a Control Group that used similar formulation toothpaste without the chlorhexidine. On the baseline, day 7 and day 14 one single examiner collected the saliva samples and measured the Plaque Index, Bleeding Index and Tooth Staining Index. After each collect, the saliva samples of each volunteer were diluted, spread and incubated. The total number of colony-forming units for mL (CFU.mL⁻¹) was counted; the percentage of reduction of salivary microorganisms was analyzed and compared between the days 7 and 0, 14 and 0, 14 and 7. The data was statistically assessed according the ANOVA test ($p < 0.05$). This short-term study did not reveal a significant difference between the Test Group and the Control Group among the Plaque Index, Bleeding Index and Staining Tooth

Index. However, there was a significant reduction of the salivary microorganisms between the days 14 and 0, ($p < 0.05$). Comparing the groups (Test and Control), there was a significant difference between the days 7 and 14 ($p < 0.05$), this difference was higher on the day 14 ($p = 0.0006$)

Keywords: *Chlorhexidine; toothpaste; plaque index.*

Introdução

A escovação com creme dental é o hábito mais comum de higiene bucal¹. Para um aumento da sua eficácia, um grande número de substâncias químicas, principalmente antimicrobianas tem sido acrescentado nas formulações². As principais funções da escovação são: remover a placa, proteger os dentes contra cáries, limpar os dentes removendo manchas e restos alimentares³.

A clorexidina é uma bisguanida catiônica com ampla atividade antimicrobiana. É o agente antiplaca e antigengivite mais efetivo utilizado na Odontologia¹. Os produtos de higiene oral com clorexidina são os agentes mais efetivos em termos de duração e espectro de ação⁴. Agem causando dano à membrana citoplasmática, levando à lise celular das bactérias, sendo bacteriostáticos ou bactericidas. Possuem afinidade por grande variedade de substratos e persistem nas superfícies bucais devido à sua alta substantividade⁵.

Uma cuidadosa limpeza mecânica associada ao uso diário de bochecho com clorexidina reduziu o número de microrganismos que podem ser detectados em amostras salivares⁶.

Muitos ingredientes são adicionados às formulações de cremes dentais, como abrasivos, detergentes, flavorizantes, conservantes e umectantes, o que pode levar à inativação dos princípios ativos⁷.

Várias formulações têm sido estudadas em diferentes veículos e concentrações para se avaliar os resultados de sua atividade antiplaca da clorexidina para prevenção da doença periodontal e da cárie. Por ser uma molécula catiônica, apresenta interações com diversos componentes das formulações, o que pode interferir em sua atividade antimicrobiana.

A pasta de dente com clorexidina é de difícil formulação devido à possível interação da clorexidina com os demais ingredientes. O Monofluorofosfato de Sódio e o Lauril Sulfato de Sódio foram avaliados em relação à diminuição do potencial da clorexidina e, aparentemente, ambos, pela atração iônica por ânions e cátions, diminuem a ação da clorexidina e conseqüentemente sua atividade⁸. Conclui-se então, que a clorexidina tem redução de efetividade imediatamente após o uso de pastas de dentes devido à sua interação com agentes surfactantes, como o Lauril Sulfato de Sódio encontrado nesses produtos^{2,7,9,10}, demonstrando que cremes dentais contendo clorexidina a 1% são superiores no controle de placa. Após 24 horas da escovação, o índice e acúmulo de placa tiveram uma grande diminuição comparada ao creme dental controle.

Um efeito adverso observado clinicamente quando do uso prolongado da clorexidina é a pigmentação das superfícies dos dentes e da língua. Essa pigmentação ocorre devido à precipitação de produtos de interação da clorexidina com pigmentos oriundos dos alimentos nas superfícies orais⁹.

Outros efeitos colaterais relatados e referentes ao uso da clorexidina são: o gosto desagradável, sensação de queimação e perda de paladar⁷.

Sheen et al.¹¹ (2001) mostraram que o uso de creme dental antes ou após o uso de clorexidina reduziu o manchamento de superfícies.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia clínica e microbiológica de um creme dental com clorexidina a 1% produzido pela Byofórmula Farmácia de Manipulação. Esta pesquisa foi autorizada pelo comitê de ética de pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, sob o protocolo número 052/2004 – PH/CEP, em 14 de setembro de 2004.

Material e método

Foram recrutados aleatoriamente 30 voluntários de 18 a 30 anos de idade, de ambos os sexos, dentre os alunos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, que foram esclarecidos verbalmente sobre a finalidade bem como os procedimentos da pesquisa a serem realizados. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para participar da pesquisa todos os pacientes deviam estar em bom estado de saúde geral e bucal, ter pelo menos 24 dentes na boca, não ser fumante, não estar usando aparelho ortodôntico, não ter feito uso de antibióticos nos três meses anteriores ao início da pesquisa ou usar qualquer tipo de anti-séptico.

Neste estudo duplo cego, os voluntários foram divididos em dois grupos: teste e controle.

O grupo teste constou de 15 participantes que fizeram uso de um creme dental produzido pela “Farmácia de Manipulação Byofórmula”, com a seguinte formulação: Dióxido de titânio 2%, Aspartame 0,2%, Sacarina 0,04%, Glicerina 8%, Sorbitol 12%, Essência de menta 1%, Mentol 0,6%, Clorexidina 1% em gel de natrosol. O creme dental não apresenta agentes surfactantes como Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Lauril Éter Sulfato de Sódio (LESS), bem como qualquer forma de flúor, para evitar a ocorrência de interações com a clorexidina, garantindo assim a estabilidade da formulação.

O grupo controle teve 15 participantes que fizeram uso de um creme dental produzido pela mesma farmácia de manipulação com semelhante formulação, porém sem a clorexidina 1%.

Todos os participantes receberam uma escova dental do tipo Tek (Johnson & Johnson), adulto-média, sendo instruídos a usarem o creme dental em escovações de 2 minutos, sem alterar os hábitos e a técnica de higiene bucal de costume, por 14 dias após o início da pesquisa.

O examinador clínico foi previamente calibrado através do coeficiente de Kappa para coleta dos índices: gengival, placa e manchamento. O resultado obtido foi Kappa = 1, o que mostra um grau de acordo quase perfeito.

O índice gengival¹² foi realizado pelo examinador clínico em quatro sítios, mesiovestibular, vestibular, distovestibular e lingual. Todos os dentes foram examinados, exceto os terceiros molares. O índice de placa foi realizado utilizando o índice de Turesky et al.¹³ (1970), uma modificação de Quigley, Hein¹⁴ (1962).

O índice de manchamento das superfícies vestibulares e linguais dos incisivos e caninos foi feito por meio do índice de manchamento de Shan, Murray¹⁵ (1977). As possíveis manchas foram anotadas quanto à intensidade, em escores: 0 = sem mancha, 1 = mancha leve, 2 = mancha moderada e 3 = mancha acentuada.

Todos os resultados foram anotados em ficha própria para futura análise estatística.

Na anamnese de cada participante foi anotada a frequência do consumo de substâncias que possuem corante em sua composição, como: café, chá, vinho tinto, etc, as quais potencializam o manchamento.

Em caso de presença de manchamento dental causado pelo uso da clorexidina, os pesquisadores se comprometeram a realizar profilaxia após o término do estudo, para remoção das manchas.

No dia inicial da pesquisa de cada participante foram feitas as coletas de saliva, o exame clínico e a realização dos índices. Nesse momento todos os participantes receberam profilaxia e começaram a usar o creme dental de acordo com o seu grupo. Após 7 e 14 dias, foram aconselhados a trazer para exame os seus tubos de dentífricos para uma avaliação do seu uso. Os participantes foram questionados sobre alguma reação incomum e as respostas anotadas em ficha própria.

Coletaram-se amostras de saliva de todos os voluntários, sem estimulação, em coletores universais estéreis, que foram levados ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, e procedeu-se a análise. Sempre as amostras foram diluídas e semeadas num período inferior a 3 horas após a coleta, nos dias 0, 7 e 14 da pesquisa.

Dois mililitros de saliva de cada paciente foram diluídos em soro fisiológico (0,85% NaCl) estéril nos tubos de ensaios

em concentrações de 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-5} . Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em placas de Petri contendo ágar sangue (*triptic soy agar*, Difco, Detroit, USA; sangue total 10%) e incubado a 37°C durante 48 horas.

Após esse período as placas foram retiradas das estufas de incubação e foi feita a contagem das amostras da unidade formadora de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) de saliva. Após esse período o examinador laboratorial realizava a contagem dos microrganismos viáveis da saliva e o cálculo da unidade formadora de colônia por mililitro (UFC.mL⁻¹) de saliva, analisando-se a porcentagem de redução dos microrganismos salivares comparando a contagem entre os dias 7 e 0, 14 e 0, e 14 e 7 de pesquisa de cada paciente, cujos valores encontrados foram anotados em ficha própria.

Neste estudo não foi possível avaliar microrganismos anaeróbios, pois o laboratório não dispõe de equipamentos necessários para o cultivo destes microrganismos.

Os dados clínicos e microbiológicos foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial com a ajuda dos programas computacionais MINITAB for Windows (2004, version 14.12, State College, Pensilvania, USA, Minitab Inc.), GRAPHPAD PRISM for windows, (version 4.0, graphpad software, San Diego Califórnia, USA, www.graphpad.com).

As variáveis dependentes consideradas foram: (i) índice de placa; (ii) índice gengival; (iii) índice de manchamento; e (iv) contagem de microrganismos (UFC.mL⁻¹) da saliva.

A variável independente (fator em estudo) foi o efeito do creme dental (com ou sem clorexidina).

A análise descritiva consistiu no cálculo das medidas de: a) tendência central (média e mediana); b) dispersão (desvio padrão e faixa interquartil); e c) representação gráfica (gráfico de dispersão em uma coluna, "Dot – Plot").

Após uma análise exploratória dos dados obtidos no experimento (que tem como unidade experimental a saliva) decidiu-se por uma abordagem não paramétrica. Dentro do grupo controle a comparação entre os três períodos foi efetuada por meio do teste ANOVA não paramétrica de FRIEDMAN, tanto para o grupo de teste como para o de controle. Quando o teste ANOVA indicou diferença entre os valores medianos, então foi realizado o teste de DUNN. Para os tempos de 7 e 14 dias, separadamente, a diferença estatisticamente significante entre os dois grupos foi testada por meio do teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

Resultado

Trinta participantes concluíram o estudo. Apenas 3 participantes do grupo teste queixaram-se de discreta alteração no paladar, entretanto, houve boa aceitação do creme dental por parte dos indivíduos deste grupo. Todos os pacientes declararam usar apenas o creme dental dado nos dias da pesquisa, e que a quantidade dada foi suficiente para o período avaliado.

Índice de placa (Tabela 1 e Figura 1)

No grupo controle, entre os dias 7 ($0,0793 \pm 0,0632$) e 0 ($0,3059 \pm 0,2654$), observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o mesmo acontecendo entre os dias 14 ($0,0729 \pm 0,0674$) e 0 ($0,3059 \pm 0,2654$) ($p < 0,05$). No entanto, não se observaram diferenças com significância estatística entre os dias 14 e 7.

No grupo teste entre os dias 7 ($0,1369 \pm 0,1358$) e 0 ($0,2997 \pm 0,2811$) houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o mesmo acontecendo entre os dias 14 ($0,0639 \pm 0,0827$) e 0 ($0,2997 \pm 0,2811$), ($p < 0,05$). Entre os dias 14 e 7 não houve redução significativa ($p > 0,05$).

Comparando os dias 7 e 14 entre os dois grupos, teste e controle, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles.

Índice gengival

Não foi necessário efetuar a análise estatística, pois não houve variabilidade nos dados. Os valores medianos dos grupos não diferiram entre si.

Tabela 1. Mediana e desvio padrão do índice de placa para os grupos Teste (T) e Controle (C)

Variável	n	Mediana	Desvio padrão
T 0	15	0,2997	0,2811
T 7	15	0,1369	0,1358
T 14	15	0,0639	0,0827
C 0	15	0,3059	0,2654
C 7	15	0,0793	0,0632
C 14	15	0,0729	0,0674

T7 significativa quando comparado com T0. T14 significativa quando comparado com T0, e não significativa quando comparado com T7. C7 significativa quando comparado com C0. C14 significativa quando comparado com C0, e não significativa quando comparado com C7

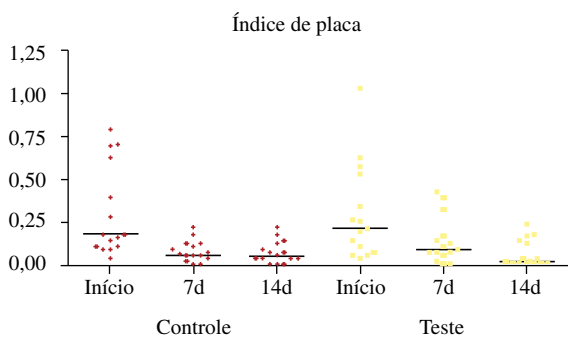


Figura 1. Distribuição dos valores de índice de placa (ao redor da mediana) obtidos em 15 pacientes do grupo sem clorexidina (Controle), e em 15 pacientes do grupo que receberam clorexidina (Teste), segundo três períodos de avaliação.

Índice de manchamento

Não houve necessidade de se efetuar a análise estatística, pois não houve variabilidade nos dados. Os valores medianos dos grupos não diferiram entre si. Apenas um voluntário apresentou manchamento moderado, sendo que este ocorreu em locais com resíduos de resinas empregadas nas colagens de *bracket* devido a um tratamento ortodôntico prévio.

Análise microbiológica (Tabela 2 e Figura 2)

No grupo controle, entre os períodos avaliados ocorreu discreta redução dos dados, porém não foi significativa ($p > 0,05$) e as medianas não mostraram diferenças significantes.

No grupo teste houve redução da contagem de UFC.mL⁻¹ de saliva entre todos os períodos, sendo estatisticamente significativa apenas entre os dias 14 (8280667 ± 22171666) e 0 (23968000 ± 39474531), ($p < 0,05$). Comparando os grupos entre si, teste e controle, observou-se diferença significativa entre os dias 7 e 14 ($p < 0,05$), sendo essa diferença maior no dia 14 ($p = 0,0006$) (Quadro 1).

Tabela 2. Mediana e Desvio padrão da análise microbiológica para os grupos Teste (T) e Controle (C)

Variável	n	Mediana	Desvio padrão
T 0	15	23968000	39474531
T 7	15	6196667	5481006
T 14	15	8280667	22171666
C 0	15	26871267	49651594
C 7	15	21503333	26292289
C14	15	17903333	19359258

T7 não significativa quando comparado com T0. T14 significativa quando comparado com T0 e não significativa quando comparado com T7

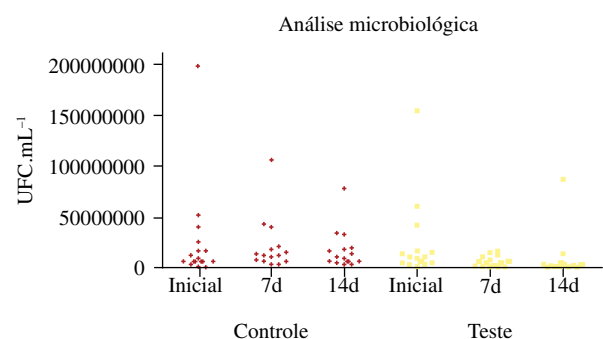


Figura 2. Distribuição dos valores da análise microbiológica (ao redor da mediana) obtidos em 15 pacientes do grupo sem clorexidina (Controle), e em 15 pacientes do grupo que receberam clorexidina (teste), segundo três períodos de avaliação.

Quadro 1. Significâncias da análise microbiológica entre os grupos teste e controle nos dias 7 e 14

T 7 Comparado com C 7 p = 0,0066
T 14 Comparado com C 14 p = 0,0006

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo não mostraram diferença significativa entre os grupos teste e controle no que diz respeito ao índice de placa. Isto pode ser devido ao fato de que os participantes são estudantes de Odontologia e já apresentam, no início da pesquisa, baixos índices de placa, resultado de bom controle mecânico. Pode ser que pelo fato de se sentirem supervisionados durante o decorrer da pesquisa, tenham melhorado ainda mais o controle caseiro. Neste particular, observaram-se baixos índices de placa, concordando com pesquisas que evidenciam que em pacientes com bom controle mecânico não há necessidade de se empregar controle químico da placa¹⁶.

O mesmo raciocínio pode ser utilizado para explicar os baixos índices gengivais encontrados. Seria interessante a realização desse estudo em pacientes com doença periodontal ou pacientes que apresentem dificuldades motoras e com altos índices de placa e gengival.

Na contagem microbiológica do grupo teste foi observada uma média de redução da contagem total de microrganismos salivares de 65% nos 14 dias, sendo que o maior valor encontrado foi de 96% de redução. Em apenas 1 participante houve aumento da contagem de microrganismos salivares. No estudo realizado por Gerardu et al.¹⁷ (2003), de 13 pacientes que utilizaram um verniz com clorexidina 40%, 4 indivíduos não mostraram resposta ao tratamento. O autor relata que nem todos os pacientes apresentam uma resposta favorável à clorexidina.

Nossos resultados foram concordantes com os de Sekino et al.⁶ (2003), que mostraram redução de 95% da contagem de microrganismos em poucos dias de uso de uma solução com clorexidina 0,2%. É interessante salientar que no estudo de Sekino et al.⁶ (2003), foi observada menor formação de placa durante a fase sem higiene bucal, talvez devido à redução de microrganismos salivares proporcionada pelo uso de anti-sépticos.

Pannuti et al.¹⁸ (2003) avaliaram o uso de um gel dental de clorexidina a 0,5% durante 16 semanas, comparando dois grupos teste e controle em amostras de placa bacteriana. Os autores observaram que não ocorre diferença entre os grupos no total do número de microrganismos presentes na placa bacteriana no início da pesquisa, encontrando redução significativa após 16 semanas de uso.

Em nosso estudo não foi realizada a análise estatística do índice de manchamento, pois apenas 1 participante acusou

manchamento dental. Em um estudo com maior duração pode ocorrer manchamento das superfícies dentais como mostraram Yates et al.¹⁹ (1993), que estudaram um creme dental com clorexidina 1% durante seis meses, e observaram manchamento estatisticamente significativo nas semanas 6, 12 e 24.

Segundo Jones⁹ (1997) e Pontefract et al.²⁰ (2004), o manchamento dental causado pela clorexidina é devido à precipitação de produtos resultantes da interação da clorexidina com o pigmento dos alimentos, como café, chá e vinho nas superfícies dentais. Supõe-se que, devido à ação da escovação removendo tanto a placa quanto resíduos de pigmentos dos alimentos das superfícies dentais, impede-se a interação com a clorexidina, diminuindo a possibilidade de manchamento. A ausência do surgimento de manchas observada em nosso estudo pode estar relacionada ao bom controle mecânico de placa realizado pelos participantes e à curta duração do uso da clorexidina.

Segundo Pontefract et al.²⁰ (2004), o manchamento causado pela clorexidina pode ser removido pelo uso de cremes dentais contendo agentes abrasivos e por profilaxia profissional, concordando com nossos achados, uma vez que o dióxido de titânio contido na formulação apresenta também ação abrasiva.

Embora a clorexidina apresente efeitos benéficos, o seu uso ainda é na maioria das vezes em curto prazo, pois podem ocorrer efeitos colaterais como alteração do paladar e formação de cálculo supragengival.

O creme dental com clorexidina mostra-se eficaz, pois associa a ação do dentífrício com o agente químico antimicrobiano, não introduzindo novos hábitos na rotina do paciente, motivando-o a aderir melhor ao tratamento quando há a necessidade do emprego de um agente antimicrobiano e efeitos colaterais menos presentes.

Conclusão

Neste estudo de curta duração não se observaram diferenças entre os grupos teste e controle quanto aos índices de placa, gengival e manchamento. Quanto à análise microbiológica, observou-se redução dos microrganismos salivares, sugerindo novas pesquisas para verificar se a redução continua após a cessação do uso do agente antiplaca e se esse benefício tem algum efeito sobre a redução de formação do biofilme dental.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, sob o Processo nº 04/11892-0 – Iniciação Científica.

Ao professor Ivan Balducci, pela realização da análise estatística.

Referências

1. Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* 2004;38:223-9.
2. Binney A, Addy M, McKeown S, Everatt L. The effect of a commercially available triclosan – containing toothpaste compared to a sodium-fluoride-containing toothpaste and a chlorhexidine rinse on 4 day plaque regrowth. *J Clin Periodontol.* 1995;22:830-4.
3. Forward GC, James AH, Barnett P, Jackson RJ. Gum health products formulation: what is in them and why? *Periodontol 2000.* 1997;15:32-9.
4. Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol.* 1996;67:572-6.
5. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0,12% chlorexidine muothrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol.* 2003;30:307-14.
6. Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J. Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003;30:919-25.
7. Arweiler NB, Ausschil TM, Reich E, Netuschil L. Substantivity of toothpaste slurries and their effects on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol.* 2002;29:615-21.
8. Owens J. A short-term clinical study designed to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinse when used as adjunct to toothpaste: applied to Chlorhexidine. *J Clin Periodontol.* 1997;24:732-7.
9. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the good standard? *Periodontol 2000.* 1997;15:55-62.
10. Claydon N, Addy M. The use of plaque area and plaque index to measure the effect of fluoride and chlorhexidine toothpaste on 24 – h plaque regrowth. *J Clin Periodontol.* 1995;22:540-2.
11. Sheen S, Owens J, Addy M. The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetylpyridinium chloride to produce stain in vitro: a possible predictor of inactivation. *J Clin Periodontol.* 2001;28:46-51.
12. Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol Scand.* 1963;21:533-51.
13. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduce plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol.* 1970;41:41-3.
14. Quigley G, Hein J. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Clin Periodontol.* 1962;19:749-53.
15. Shan L, Murray JJ. New index for measuring extrinsic stains in clinical trials. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1977;5:116-20.
16. Axelsson P. Mechanical plaque control. In: Lang NP, Karring T, editors. *Proceedings of the 1st European workshop on periodontology.* London: Quintessence; 1994. p. 219–43.
17. Gerardu VA, Buijs MJ, Ten Cate JM, Van Loveren C. The effect of a single application of a 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. *Caries Res.* 2003;37:369-73.
18. Pannuti CM, Lotufo RF, Cai S, Saraiva Md Mda C, de Freitas NM, Falsi D. Effect of a 0.5% chlorhexidine gel on dental plaque superinfecting microorganisms in mentally handicapped patients. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:228–33.
19. Yates R, Jenkins S, Newcombe R, Wade W, Moran J, Addy M. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste (I). Effects on plaque, gingivitis, calculus and toothstaining. *J Clin Periodontol.* 1993; 20:130-8.
20. Pontefract H, Courtney M, Smith S, Newcombe RG, Addy M. Development of methods to enhance extrinsic tooth discoloration for comparison of toothpastes: two-product clinical study. *J Clin Periodontol.* 2004;31:7-11.