



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**LAÍS FERNANDA FERREIRA FERRAZ**

**ADMINISTRAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei* 28.4 NO  
TRATAMENTO DA PERIODONTITE: desenvolvimento *in vitro*  
de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico  
randomizado placebo-controlado**

2023

**LAÍS FERNANDA FERREIRA FERRAZ**

**ADMINISTRAÇÃO DE *Lactobacillus paracasei* 28.4 NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE: desenvolvimento *in vitro* de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico randomizado placebo-controlado**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Ferraz, Laís Fernanda Ferreira

Administração de *Lactobacillus paracasei* 28.4 no tratamento da periodontite: desenvolvimento in vitro de formulação probiótica usando gellan gum e ensaio clínico randomizado placebo-controlado / Laís Fernanda Ferreira Ferraz. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

82 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Mauro Pedrine Santamaria.

1. Probióticos. 2. *Lactobacillus*. 3. Doenças periodontais. 4. Periodontite. 5. Desbridamento periodontal. I. Santamaria, Mauro Pedrine, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Assoc. Mauro Pedrine Santamaria** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)/Universidade do Kentucky (UK)

Instituto de Ciência e Tecnologia/Faculdade de Odontologia

Campus de São José dos Campos/Lexington

**Profa. Assoc. Andréa Carvalho De Marco**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Ass. Emanuel da Silva Rovai**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Felipe de Camargo Ribeiro**

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Escola Paulista de Medicina

Laboratório Especial de Micologia

**Profa. Dra. Mabelle de Freitas Monteiro**

Universidade Paulista (UNIP)

Clínica Odontológica (Periodontia)

Campus de Indianópolis

São José dos Campos, 17 de agosto de 2023.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Carlos e Elen**, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu recebesse sempre o melhor. Por apoiarem minhas escolhas e serem exemplos de dedicação e bom trabalho. Por confiarem em mim e permitirem tamanha dedicação aos estudos.*

*A vocês o meu eterno reconhecimento, amor e gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelo dom da vida, presença e proteção constante.*

*À minha irmã, Larissa, por me entender como ninguém e ser fonte dos melhores conselhos. Por me amparar em qualquer circunstância com suas conversas, cuidados e escuta genuína.*

*Ao meu noivo, Pedro, por todo o amor, respeito e confiança compartilhados ao longo desses anos. Por me incentivar constantemente e me lembrar que as escolhas não precisam ser eternas. Por permanecer em todas as nossas versões e caminhos.*

*Às minhas avós, Darci e Rosa (in memoriam), pelos inúmeros ensinamentos e por entenderem minha ausência nos aniversários e almoços em família. Honro suas existências e as levo comigo por onde vou.*

*À querida Cida, que cuidou de mim como uma mãe e continua com esse zelo mesmo à distância. Por ser admirável exemplo de resiliência e fé.*

*À amiga e quase irmã, Victória, por toda a amizade, histórias infinitas e suporte. Por ter sido fundamental em todas as minhas fases de Unesp. Sentirei saudades de dividir a casa e a vida com você. Que o sucesso te acompanhe por onde você for!*

*Às amigas Amanda, Beatriz, Manuela, Cássia e Ana Bonafé, por toda a amizade, experiências compartilhadas e ajudas incansáveis. Sem vocês nada disso seria possível! Cada uma tem um significado especial na minha jornada, muito além das nossas salinhas da pós-graduação.*

*À amiga Evelyn, por todos os ensinamentos, aventuras e companheirismo. Por abraçar comigo esse trabalho e se doar tanto aos nossos “ursinhos”. Sem você esse projeto não teria saído do papel!*

*Às amigas Ana Beatriz e Giovanna, pelos anos de amizade, apoio e lares compartilhados. Por tornarem a minha permanência em São José mais leve e valiosa.*

*Aos amigos que conheci na pós-graduação, em especial aos que compartilhei momentos nesse período de doutorado: Letícia, Clarissa, Eduardo, Tainá, Nátaly, Nicole, Mariana, Victória Oliveira, Bianca, Camila Lopes e Camila Moretto, por toda a convivência e boas risadas.*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. César Rogério Pucci e da vice-diretora Profa. Symone Cristina Teixeira.*

*Aos programas de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, juntamente com todo o corpo docente e funcionários envolvidos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria, por me receber no seu grupo de pesquisa e permitir a realização desse e de outros estudos. Por toda orientação e ensinamentos diversos que colaboraram para a concretização dessa jornada de cinco anos e meio de muito trabalho e superações.*

*À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT-Unesp e apostar no sucesso das nossas “gominhas”. Por compartilhar conhecimento e recursos para o desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Felipe de Camargo Ribeiro, por dividir tanto conhecimento e ideias mirabolantes para a construção desta metodologia. Por ter formado uma parceria fundamental num período tão louco envolvendo pandemia, gominhas e reality show.*

*À Profa. Dra. Andréa Carvalho de Marco, por me acompanhar nas bancas desde o mestrado e ser exemplo de docência e gentileza. Sou grata por todos os ensinamentos durante a minha formação e período de estágio docência.*

*Ao Prof. Dr. Emanuel da Silva Rovai, pelos aprendizados e incentivos. Nossas conversas foram importantes para que eu mergulhasse em novos desafios e oportunidades.*

*À Profa. Dra. Mabelle de Freitas Monteiro, pela disponibilidade e participação em mais um marco da minha trajetória acadêmica. Por ser inspiração para mim e tantas outras mulheres na Ciência!*

*Aos docentes Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, Prof. Dr. José Benedito Oliveira Amorim, Prof. Dr. Sérgio Lúcio Pereira de Castro Lopes e Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira por contribuírem para a minha formação e serem grandes exemplos dentro da profissão.*

*À psicóloga, Mariana, por seu papel essencial para que eu não desistisse pelo caminho. Por ter me apresentado o conceito de que “quando nós mudamos, o mundo também muda”.*

*Às técnicas e amigas **Valéria e Marcinha** e à secretária **Jacque**, por acompanharem de perto essa caminhada, ajudando em tantos momentos difíceis e tornando os dias mais leves e felizes.*

*Aos **funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos**, pelo apoio e colaboração nas atividades diárias em diversos setores como triagem, esterilização, portaria e limpeza.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Doutorado, tão importante nesse período.*

*A **todos os pacientes** a quem tive o privilégio de atender durante o doutorado. Em especial, àqueles que aceitaram participar desse estudo e contribuíram para o meu desenvolvimento profissional, intelectual e pessoal.*

*“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes.”*

*— Ernest Hemingway*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 PARTE A - Desenvolvimento da formulação probiótica para administração no tratamento de doenças periodontais: estudo <i>in vitro</i> .....	22
3.1.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>L. paracasei</i> 28.4.....	22
3.1.2 Preparo da formulação probiótica em <i>gellan gum</i> .....	22
3.1.3 Viabilidade de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir da formulação.....	25
3.1.4 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 da formulação de <i>gellan gum</i> após armazenamento.....	25
3.1.5 Análise do sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 em PBS .....	26
3.1.6 Sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 em saliva artificial .....	28
3.1.7 Preparo da formulação placebo.....	28
3.1.8 Armazenamento das formulações de <i>gellan gum</i> .....	29
3.1.9 Análise estatística (parte A) .....	29
3.2 PARTE B - Administração de <i>Lactobacillus paracasei</i> 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite: estudo clínico randomizado placebo-controlado de superioridade.....	30
3.2.1 Desenho do estudo .....	30
3.2.2 População-alvo e tamanho da amostra.....	30
3.2.3 Critérios de inclusão.....	31

<b>3.2.4 Critérios de não inclusão e exclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.5 Grupos de tratamento .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.6 Randomização, ocultamento e cegamento.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.7 Procedimentos clínicos .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.7.1 Terapia inicial.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.7.2 Terapia periodontal não cirúrgica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.8 Avaliações clínicas .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.9 Adesão à terapia e consumo das formulações .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.10 Percepção do paciente e monitoramento de efeitos adversos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.11 Análise estatística .....</b>	<b>39</b>
<b>4 RESULTADO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Resultado <i>in vitro</i> (Parte A) .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Resultado clínico (Parte B) .....</b>	<b>48</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão metodológica e desenhos do presente estudo .....	21
Figura 2 – Formulações testadas durante adaptação da metodologia .....	23
Figura 3 – Formas de silicone utilizadas para verter a solução .....	24
Figura 4 – Teste de viabilidade de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir da formulação ...	26
Figura 5 – Teste de análise da liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 (60 minutos) .....	27
Figura 6 – Terapia inicial e raspagem supragengival .....	34
Figura 7 – Terapia inicial: antes, durante e depois .....	35
Figura 8 – Ultrassom utilizado na terapia periodontal não cirúrgica .....	36
Figura 9 – Diferença entre as formulações de <i>gellan gum</i> .....	41
Figura 10 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas imediatamente após o preparo da formulação de <i>gellan gum</i> .....	42
Figura 11 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas diariamente após armazenamento em refrigeração .....	43
Figura 12 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL), recuperadas semanalmente após armazenamento em refrigeração .....	44
Figura 13 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em PBS ...	46
Figura 14 – Média e desvio-padrão de células de <i>L. paracasei</i> 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em saliva..	47
Figura 15 – Fluxograma segundo o CONSORT 2010 .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos iniciais dos pacientes (n=40).....	49
Tabela 2 - Dados clínicos de boca toda ( <i>baseline</i> , 3 e 6 meses) .....	51
Tabela 3 - Estratificação das bolsas periodontais com PS $\geq$ 4mm e PS $\geq$ 5mm no <i>baseline</i> .....	52
Tabela 4 - Estratificação das bolsas periodontais moderadas (PS =5-6mm) e profundas (PS $\geq$ 7mm) no <i>baseline</i> .....	53
Tabela 5 – Adesão e consumo das formulações pelos pacientes.....	55
Tabela 6 – Percepção de sintomas e efeitos adversos.....	56

Ferraz LFF. Administração de *Lactobacillus paracasei* 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite: desenvolvimento *in vitro* de formulação probiótica usando *gellan gum* e ensaio clínico randomizado placebo-controlado [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

## RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória do periodonto associada ao acúmulo de biofilme dental, com consequente disbiose da microbiota oral e alteração da resposta imuno-inflamatória. O controle da periodontite realizado por meio do tratamento periodontal não-cirúrgico altera o ambiente subgingival e pode ser associado a terapias adjuntas. O uso de probióticos como terapia adjuvante a esse tratamento parece favorecer a modificação do biofilme bacteriano e resposta imuno-inflamatória. Entretanto, os probióticos empregados até o momento não são próprios da cavidade oral e, por isso, a busca por cepas originadas da microbiota oral tem ganhado espaço na tentativa de favorecer a aderência e colonização permanente dessas bactérias. Recentemente, a cepa de *Lactobacillus paracasei* 28.4 foi isolada da cavidade oral, exibindo atividades antimicrobianas promissoras sobre o controle de patógenos orais. O presente estudo teve como objetivos o desenvolvimento de uma formulação probiótica de *L. paracasei* 28.4 incorporado em *gellan gum* para uso humano, bem como a avaliação dos efeitos clínicos da administração desta formulação como adjuvante no tratamento periodontal. Para tal, o trabalho foi dividido em 2 etapas, contemplando uma etapa laboratorial (parte A), para desenvolvimento da formulação probiótica; e um ensaio clínico randomizado (parte B, n=40), envolvendo um protocolo de tratamento periodontal não cirúrgico associado à terapia adjunta probiótica ou placebo. Os resultados da parte A permitiram encontrar a melhor forma de apresentação e armazenamento da formulação de *gellan gum*. Na parte B, aos 3 e 6 meses de acompanhamento, os dois grupos apresentaram melhoras significativas dos parâmetros periodontais (índice de sangramento, índice gengival, profundidade de sondagem e ganho de nível de inserção) em relação ao *baseline*, sem diferença estatística na comparação intergrupo. Como conclusão, uma formulação probiótica segura e possível de ser aplicada na prática clínica foi obtida; no entanto, sua administração não promoveu efeitos clínicos adicionais ao tratamento de pacientes com periodontite generalizada estágios III/IV e graus B/C.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. Doenças periodontais. Periodontite. Desbridamento periodontal.

*Ferraz LFF. Administration of Lactobacillus paracasei 28.4 as adjuvant therapy in the treatment of periodontitis: in vitro development of the probiotic formulation using gellan gum and placebo-controlled randomized clinical trial [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.*

## **ABSTRACT**

*Periodontitis is an inflammatory disease of the periodontium associated with the accumulation of dental biofilm, with consequent dysbiosis of the oral microbiota and alteration of the immune-inflammatory response. The control of periodontitis carried out through non-surgical periodontal treatment alters the subgingival environment and can be associated with adjunctive therapies. The use of probiotics as an adjuvant therapy in the periodontal treatment seems to favor the modification of the bacterial biofilm and modulation of the immune-inflammatory response. However, the probiotics used so far are not specific to the oral cavity and, therefore, the search for strains originating from the oral microbiota has gained space to favor the adherence and permanent colonization of these bacteria. Recently, strain of Lactobacillus paracasei 28.4 was isolated from the oral cavity itself, showing promising antimicrobial activities in the control of oral pathogens. The present study aimed to develop and characterize a probiotic formulation of L. paracasei 28.4 incorporated into gellan gum for human use, as well as to evaluate the clinical effects of administering this formulation as an adjuvant in the treatment of periodontitis. To this end, the study was divided into 2 stages, comprising a laboratory stage (part A), for the development of the probiotic, and a randomized clinical trial (part B, n=40) contemplating a non-surgical periodontal treatment protocol associated with adjunctive probiotic therapy or placebo. The results from part A made it possible to find the best way to present and store the gellan gum formulation. In part B, at 3 and 6 months of follow-up, both groups showed significant improvements in periodontal parameters (bleeding index, gingival index, probing depth and attachment level gain) in relation to baseline, with no statistical difference in the intergroup comparison. In conclusion, a safe probiotic formulation that can be applied in clinical practice was obtained; however, its administration did not promote additional clinical effects in the treatment of patients with stage III/IV and grades B/C generalized periodontitis.*

*Keywords: Probiotics. Lactobacillus. Periodontal diseases. Periodontitis. Periodontal debridement.*

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são condições inflamatórias do periodonto com alta prevalência e capazes de afetar negativamente a função mastigatória, estética e qualidade de vida dos indivíduos (Kassebaum et al., 2014; Papapanou et al., 2018; Trombelli et al., 2018). Dentre elas, destaca-se a periodontite, uma doença inflamatória multifatorial caracterizada pela presença de bolsas periodontais, destruição irreversível do tecido de suporte periodontal e possível perda dos elementos dentais (Chapple et al., 2018; Tonetti et al., 2015; Trombelli et al., 2018). Esta condição configura um importante problema de saúde pública, visto que é considerada a sexta doença mais prevalente na humanidade (Kassebaum et al., 2014).

A etiologia da periodontite está associada ao acúmulo de biofilme local, que leva à disbiose do biofilme presente na cavidade bucal e aumento dos microrganismos periodontopatogênicos (Kantarci, Van Dyke, 2005; Løe et al., 1965; Murakami et al., 2018; Papapanou et al., 2018). Outros fatores como resposta imune, susceptibilidade do hospedeiro, influências ambientais e aspectos comportamentais também estão fortemente relacionados ao início e à progressão da doença periodontal (Murakami et al., 2018; Page et al., 1997).

Clinicamente, o tratamento da periodontite tem como objetivo desorganizar o biofilme e reverter a disbiose da área dentogengival, alterando assim o ambiente ecológico subgengival (Laleman et al., 2020; Wennstrom et al., 2005). A instrumentação radicular por meio de curetas ou aparelhos ultrassônicos, associada a medidas efetivas de controle caseiro de placa supragengival realizadas pelo paciente, contribui para esse propósito (Wennstrom et al., 2005). Embora o número de microrganismos seja amplamente reduzido na cavidade oral por meio da raspagem e alisamento

radicular, os periodontopatógenos rapidamente recolonizam os sítios tratados (Teughels et al., 2007), o que pode levar ao insucesso da terapia periodontal. Dessa forma, o tratamento periodontal convencional apresenta limitações em termos de estabilidade ao longo prazo dos resultados em bolsas periodontais profundas, sendo frequentemente observado elevado número de bolsas residuais e com sangramento à sondagem após o período de tratamento (Aimetti, 2014). Por essa razão, terapias adjuvantes frequentemente são empregadas em associação à terapia periodontal não cirúrgica para auxiliar na alteração do biofilme bacteriano e modulação da resposta inflamatória, especialmente em pacientes com bolsas periodontais profundas (Aimetti, 2014; Keestra et al., 2015).

Dentre essas terapias, a administração de antibióticos sistêmicos é frequentemente utilizada (Araujo et al., 2019; Bechara Andere et al., 2018; Casarin et al., 2012; Rabelo et al., 2015). Todavia, o uso recorrente de agentes antibióticos como terapia adjuvante ao tratamento da periodontite pode favorecer o desenvolvimento de resistência bacteriana na microbiota periodontal (Ardila et al., 2010; Rams et al., 2014), além de promover alterações prejudiciais à microbiota intestinal protetora (Blaser, 2011). Diante disso, novas alternativas terapêuticas têm se destacado no combate às doenças periodontais, como é o caso da probioticoterapia.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são microrganismos vivos que, quando ministrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Reid et al., 2003). Tradicionalmente, os probióticos têm sido empregados na manutenção da saúde sistêmica no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e distúrbios gastrointestinais (Broekaert, Walker, 2006; Hasslof et al., 2010). Seus benefícios estão associados, principalmente, à regulação da microbiota residente,

modulação do sistema imune e produção de moléculas antimicrobianas (Herbel et al., 2013). Como algumas bactérias benéficas apresentam propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, a administração de probióticos surgiu como um conceito promissor na prevenção e tratamento das doenças da cavidade bucal (Teughels et al., 2013).

Na odontologia, o efeito dos probióticos foi relacionado inicialmente à modulação da cárie dentária e à ação antifúngica em infecções como a candidose oral (Coman et al., 2014; Meurman, Stamatova, 2007; Mundula et al., 2019; Nässe et al., 2001; Nikawa et al., 2004). Devido à capacidade de interação com microrganismos que causam injúrias à saúde, a utilização de bactérias probióticas tem sido investigada no tratamento das doenças periodontais. Estudos demonstram que algumas espécies de bifidobactérias e lactobacilos são capazes de promover redução significativa de periodontopatógenos, corroborando para a prevenção, controle e tratamento dessas doenças (Kuru et al., 2017; Mayanagi et al., 2009; Teanpaisan et al., 2011) ou capazes de promover melhores resultados quando usados como adjuntos à terapia periodontal convencional (Laleman et al., 2020). Outrossim, determinados probióticos são capazes de inibir a adesão, colonização e formação de biofilmes por bactérias patogênicas, além de inibir o crescimento de determinados periodontopatógenos por meio de substâncias como ácido lático, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (Stamatova, Meurman, 2009). Além da interação bacteriana, a associação de probióticos à terapia periodontal desperta interesses devido aos mecanismos de ação relacionados à modulação da resposta do hospedeiro, como inibição das colagenases, redução das moléculas associadas à inflamação, indução da expressão de proteínas citoprotetoras, prevenção da apoptose induzida por citocinas e modulação das vias pró-inflamatórias induzidas por patógenos (Stamatova, Meurman, 2009).

Dentre os probióticos utilizados na periodontia, os lactobacilos são

frequentemente associados ao tratamento periodontal, apresentando vasta literatura *in vitro*, *in vivo* e clínica que sugerem sua efetividade no controle de periodontopatógenos (Gatej et al., 2018; Kõll-Klais et al., 2005; Mayanagi et al., 2009; Pangsomboon et al., 2006; Shimauchi et al., 2008; Sookkhee et al., 2001; Stamatova, Meurman, 2009; Teanpaisan et al., 2011). Diversos estudos indicam um papel favorável de *Lactobacillus* spp. na manutenção da saúde, estimulando a imunidade e contribuindo para o equilíbrio da microbiota oral (Kõll-Klais et al., 2005; Stamatova, Meurman, 2009; Teanpaisan et al., 2011). Em estudos *in vitro* envolvendo lactobacilos, cepas de *Lactobacillus paracasei* demonstraram potencial promissor como agentes antimicrobianos no controle de periodontopatógenos. Sookkhee et al. (2001), por exemplo, observaram atividade antimicrobiana do *L. paracasei* subsp. *paracasei* sobre *Porphyromonas gingivalis*. Em corroboração com esses resultados, Teanpaisan et al. (2011) demonstraram forte efeito inibitório da cepa de *L. paracasei* SD1 sobre *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Todavia, os métodos mais eficazes de administração de probióticos como terapia adjuvante ao tratamento periodontal ainda não estão bem estabelecidos.

Pensando em prolongar o efeito local dos probióticos na cavidade oral, é interessante que esses microrganismos sejam capazes de aderir e colonizar as superfícies orais (Wescombe et al., 2012). Entretanto, as bactérias empregadas para esse fim geralmente não são próprias da cavidade oral, o que dificulta a permanência desses probióticos no local e eficácia no tratamento de condições bucais como a periodontite (Meurman, Stamatova, 2007). Estudos como o de Yli-Knuutila et al. (2006), que avaliaram a colonização de *Lactobacillus rhamnosus* GG na cavidade oral de estudantes, demonstraram que a contagem desses microrganismos diminui gradualmente após o período de administração dos probióticos, indicando a ausência de colonização permanente das bactérias benéficas na cavidade oral. Desse modo, um importante questionamento no

âmbito da terapia probiótica aplicada à saúde oral refere-se à capacidade dos probióticos de colonizarem o ambiente bucal de modo permanente e não somente temporário (Stamatova, Meurman, 2009).

Em estudo *in vitro* e *in vivo*, o grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT-Unesp (São José dos Campos/SP) isolou cepas de *Lactobacillus* diretamente da cavidade oral de indivíduos livres de cárie (Rossoni et al., 2018). Dentre as cepas observadas, o isolado de *Lactobacillus paracasei* 28.4 exibiu atividade inibitória significativa contra *Candida albicans*, apresentando potencial para ser empregado como método alternativo para controle da candidose oral (de Barros et al., 2018). Em estudo posterior, esse mesmo grupo de pesquisa observou que a maioria dessas cepas de *Lactobacillus* produziram substâncias bioativas capazes de exercer atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Streptococcus mutans*, bactéria primordial no processo da cárie dentária (Rossoni et al., 2018). Em seguida, Ribeiro et al. (2020) desenvolveram formulações probióticas para aplicação na cavidade oral através da impregnação de *L. paracasei* 28.4 em *gellan gum*, que é um hidrogel amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e medicamentosa (Coutinho et al., 2010; D'Arrigo et al., 2014; Ribeiro et al., 2020; Shukla, Shukla, 2018; Zhu et al., 2015).

Os hidrogéis são biomateriais formados por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos, capazes de proporcionar alta biocompatibilidade devido ao potencial de absorver grandes quantidades de água e apresentar familiaridade com a matriz extracelular dos tecidos (Abalymov et al., 2022; Muthukumar et al., 2019). Por esse motivo, são frequentemente usados na prática clínica e na medicina experimental, podendo ser manipulados em diferentes formas físicas como gomas, pastilhas, filmes, micropartículas e nanopartículas (Ambalymov et al., 2022; Lin, Anseth, 2009). O *gellan gum* utilizado por Ribeiro et al. (2020) é um polissacarídeo natural, secretado por bactérias do gênero *Sphingomonas*, que

tem ganhado destaque entre os hidrogéis destinados a produtos alimentares e farmacêuticos (Abalymov et al., 2022; Huang et al., 2020). Através de análises *in vitro* e *in vivo*, Ribeiro et al. (2020) concluíram que o *gellan gum* utilizado é um biomaterial promissor e que pode ser usado como um sistema carreador capaz de promover colonização dos probióticos na cavidade bucal e prevenção oral (Ribeiro et al., 2020).

Todos esses achados revelam um avanço nas pesquisas com probióticos, uma vez que a cepa de *L. paracasei* 28.4 representa um dos primeiros microrganismos probióticos isolados diretamente da cavidade bucal, com aparente potencial para ser associada ao tratamento e prevenção de doenças da cavidade oral. Além disso, a utilização de *gellan gum* como sistema carreador desperta novas possibilidades terapêuticas a serem exploradas. Portanto, diante do exposto, observa-se que a terapia probiótica é um tema com evidências ainda limitadas para apoiar seu uso no tratamento das doenças bucais. Entretanto, a identificação de microrganismos probióticos próprios da cavidade oral parece ser promissora para desenvolver formulações probióticas que sejam eficazes no tratamento das doenças periodontais. Assim, investigações nesse sentido se fazem necessárias.

## 2 PROPOSIÇÃO

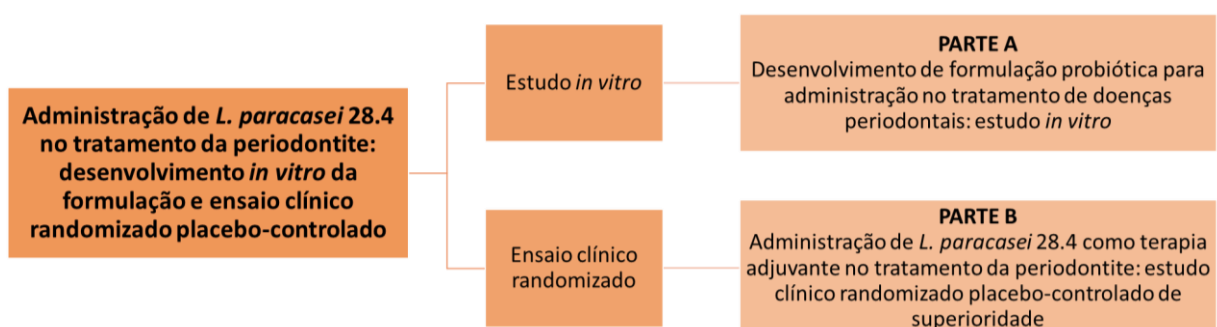
O presente trabalho teve como objetivos:

- a) desenvolver e caracterizar uma formulação probiótica de *L. paracasei* 28.4 incorporado em *gellan gum* para aplicação clínica no tratamento periodontal;
- b) avaliar os efeitos clínicos da administração de *L. paracasei* 28.4 como terapia adjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico em pacientes com diagnóstico de Periodontite Estágios III ou IV, Graus B ou C, Generalizada (Tonetti et al., 2018), após 3 e 6 meses de tratamento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desse trabalho foi dividida em duas partes, compreendendo um estudo *in vitro* (parte A) e um estudo clínico randomizado (parte B), conforme divisão metodológica apresentada na Figura 1. A formulação probiótica foi desenvolvida em colaboração com a Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira e foi baseada na metodologia utilizada por Ribeiro et al. (2020), com modificações. O protocolo clínico desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Estadual Paulista (CEP-Unesp - CAAE: 35900620.6.0000.0077; Anexo A) e registrado no *ClinicalTrials.gov* (NCT05107622). Os pacientes foram informados quanto à natureza, riscos e benefícios da investigação clínica. Apenas os pacientes que concordaram com as condições pré-estabelecidas foram incluídos no estudo, confirmando a aceitação em consentimento formal. A metodologia clínica foi conduzida de acordo com o Código de Ética Odontológico (Resolução nº118 de 11 de maio de 2012) do Conselho Federal de Odontologia (CFO) para experimentos em humanos e seguiu as normas do Consort-Statment (Moher et al., 2010) e do Spirit (Chan et al., 2013) para ensaios clínicos randomizados.

Figura 1 – Divisão metodológica e desenhos do presente estudo



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **3.1 PARTE A - Desenvolvimento da formulação probiótica para administração no tratamento de doenças periodontais: estudo *in vitro***

#### **3.1.1 Preparo da suspensão padronizada de *L. paracasei* 28.4**

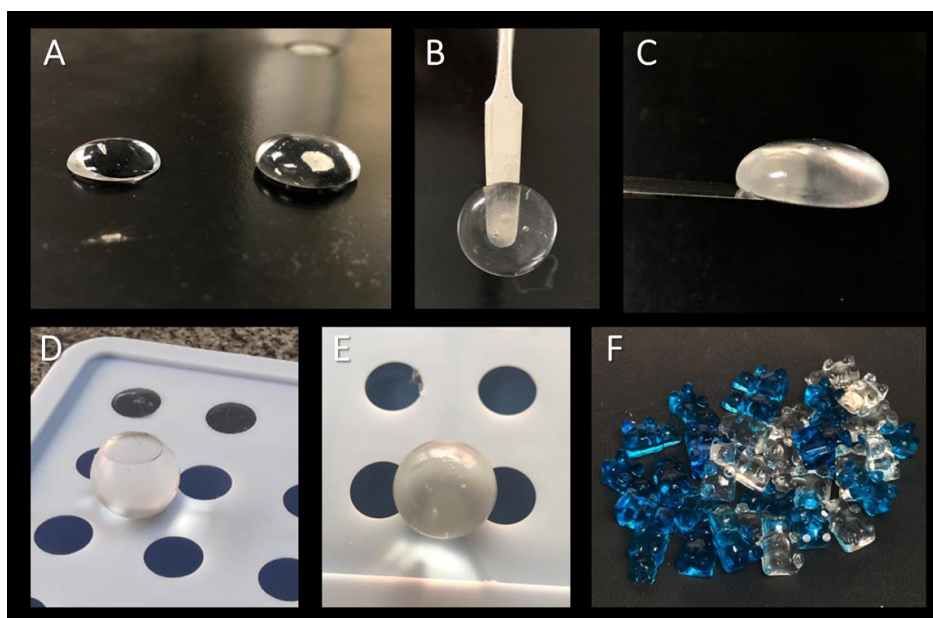
Para realização desse trabalho, foi utilizada a cepa clínica de *L. paracasei* 28.4 isolada da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie obtida em estudo prévio (Rossoni et al., 2018a). Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *L. paracasei* 28.4 foi cultivada em ágar Lactobacilli MRS (Himedia, Mumbai, Índia) por 24 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Para o preparo da suspensão, as células dos micro-organismos *L. paracasei* 28.4 foram centrifugadas (2000 xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento obtido foi suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) de pH 7,4. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. A contagem do número de células de *L. paracasei* 28.4 da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo, Brasil), com comprimento de onda a 600 nm e densidade óptica de 1.200, ajustado para obter uma concentração de 10<sup>9</sup> células/mL de *L. paracasei* 28.4.

#### **3.1.2 Preparo da formulação probiótica em *gellan gum***

A partir da metodologia utilizada previamente por Ribeiro et al. (2020), diversos testes foram realizados para adaptar a metodologia existente e criar uma formulação com possibilidade de aplicação clínica. Inicialmente, foram

testadas diferentes concentrações de *gellan gum*, variando de 1,5 a 3% (p/v). Também foram estudadas variadas concentrações de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), bem como suas formas de uso e meios de incorporação ao hidrogel. Diferentes formatos de moldes e materiais também foram testados, a fim de se obter uma forma de apresentação que fosse condizente com a utilização clínica do produto probiótico. A Figura 2 (A-F) ilustra alguns dos modelos testados durante a adaptação a partir da metodologia descrita por Ribeiro et al. (2020).

Figura 2 –Formulações testadas durante adaptação da metodologia



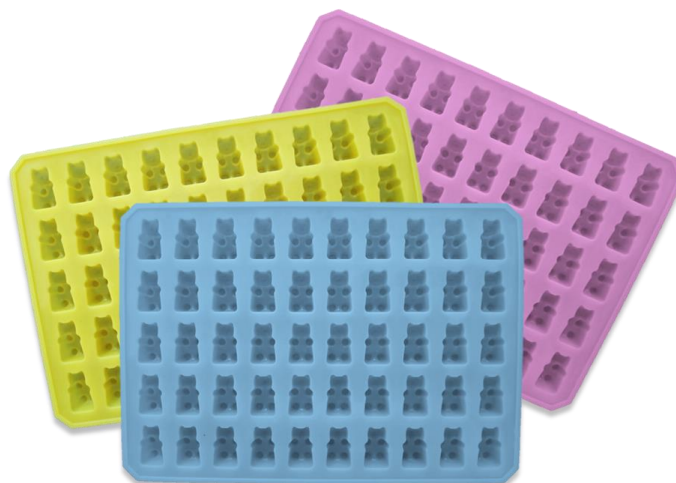
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após inúmeros experimentos combinando os variados aspectos citados, a forma de manipulação e de apresentação do produto foi finalmente estabelecida, conforme descrito nesta metodologia. Dessa forma, a formulação utilizada nesse estudo foi preparada com o hidrogel na concentração de *gellan gum* à 2% (p/v), que apresentou consistência mais apropriada para a mastigação

e possibilidade de armazenamento individualizado. Para isso, o pó de *gellan gum* foi incorporado em 45 mL de água destilada e essa mistura foi submetida a agitação, sob temperatura de 85-90°C, até dissolução completa. A solução de *gellan gum* foi autoclavada e, após o resfriamento para 40°C, 2 mL de suspensão de *L. paracasei* 28.4 contendo  $10^9$  células/mL foram adicionados a solução de *gellan gum*.

Essa solução foi vertida em forma de silicone estéril (Figura 3) com espaços de 1 ml para produção das amostras individualizadas. Após 10 minutos, essas amostras foram acondicionadas em frascos estéreis contendo 50 mL de  $\text{CaCl}_2$  a 2mM e levadas para estufa agitadora por 30 minutos para gelificação (Centrífuga MPW-350, 60 rpm e 25°C). Após esse período, o  $\text{CaCl}_2$  foi retirado e foram realizadas 2 lavagens com água destilada estéril para remoção do excesso de  $\text{CaCl}_2$  da superfície das amostras. Depois de preparadas, as amostras foram armazenadas em embalagens plásticas estéreis e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento de sua utilização.

Figura 3 – Formas de silicone utilizadas para verter a solução



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.1.3 Viabilidade de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação

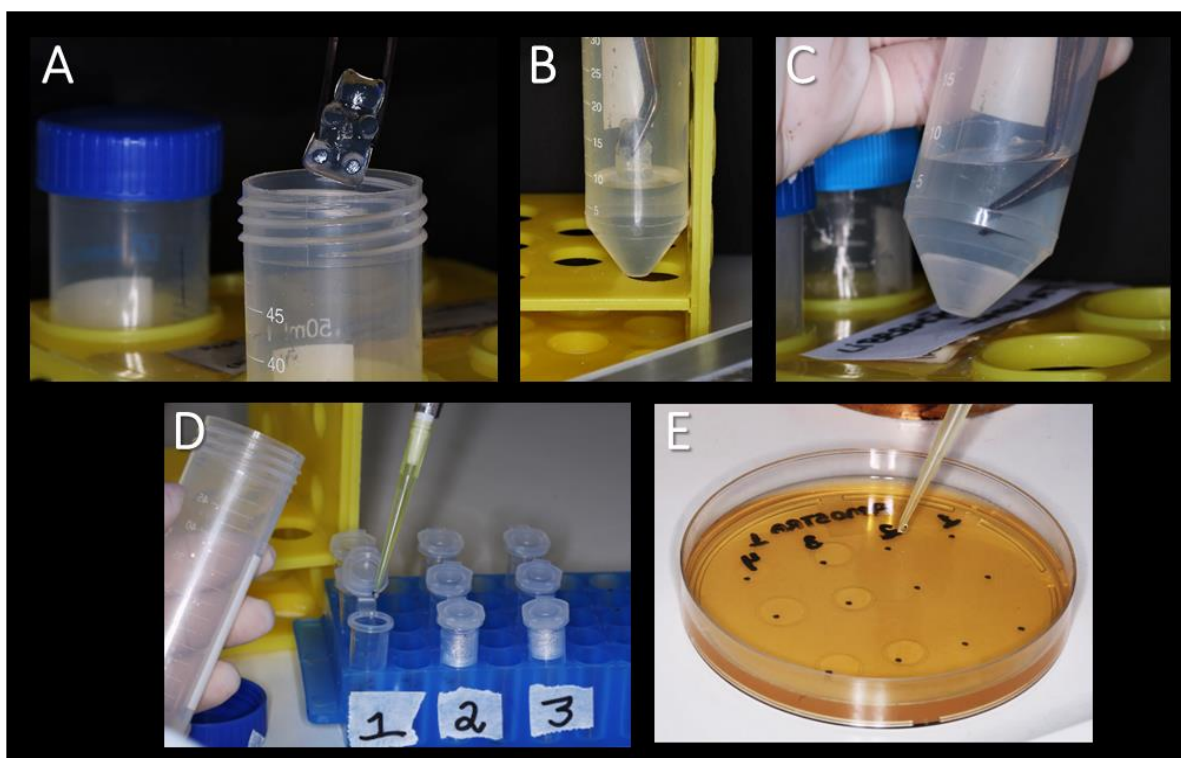
A quantificação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação de *gellan gum* foi realizada imediatamente após a finalização do preparo das amostras probióticas, em triplicata. Para isso, cada amostra da formulação foi suspensa em 9 mL de PBS e submetida à trituração manual (60 s) por meio de apreensão e soltura de pinça clínica, realizada por operador treinado previamente, seguida de agitação (30 s) à temperatura ambiente. Subsequentemente, 100 µL da solução foram diluídos em PBS e semeados em ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Uma suspensão de *L. paracasei* 28.4 em PBS, na mesma concentração (10<sup>9</sup> células/mL) e não incorporada em *gellan gum*, foi usada como controle.

### 3.1.4 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 da formulação de *gellan gum* após armazenamento em curto e longo prazo

A formulação preparada foi armazenada sob refrigeração (4°C). Nos dias seguintes, três amostras da formulação foram ressuspensas diariamente em 9 mL de PBS e submetidas à trituração manual (60 s) e agitação (30 s) à temperatura ambiente. Posteriormente, esta suspensão foi submetida a diluição seriada, semeada em ágar MRS e incubada a 37°C para determinar o número de UFC/mL. Este procedimento foi repetido diariamente durante 7 dias. Para a análise da viabilidade de *L. paracasei* 28.4 após armazenamento prolongado, o procedimento descrito acima foi realizado semanalmente, durante 35 dias.

A Figura 4 ilustra a sequência de procedimentos realizados para analisar a viabilidade imediata e após armazenamento das células de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação desenvolvida.

Figura 4 – Teste de viabilidade de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação



Legenda: a e b) amostra da formulação colocada em 9 mL de PBS; c) trituração manual; d) diluição seriada; e) plaqueamento em ágar MRS.

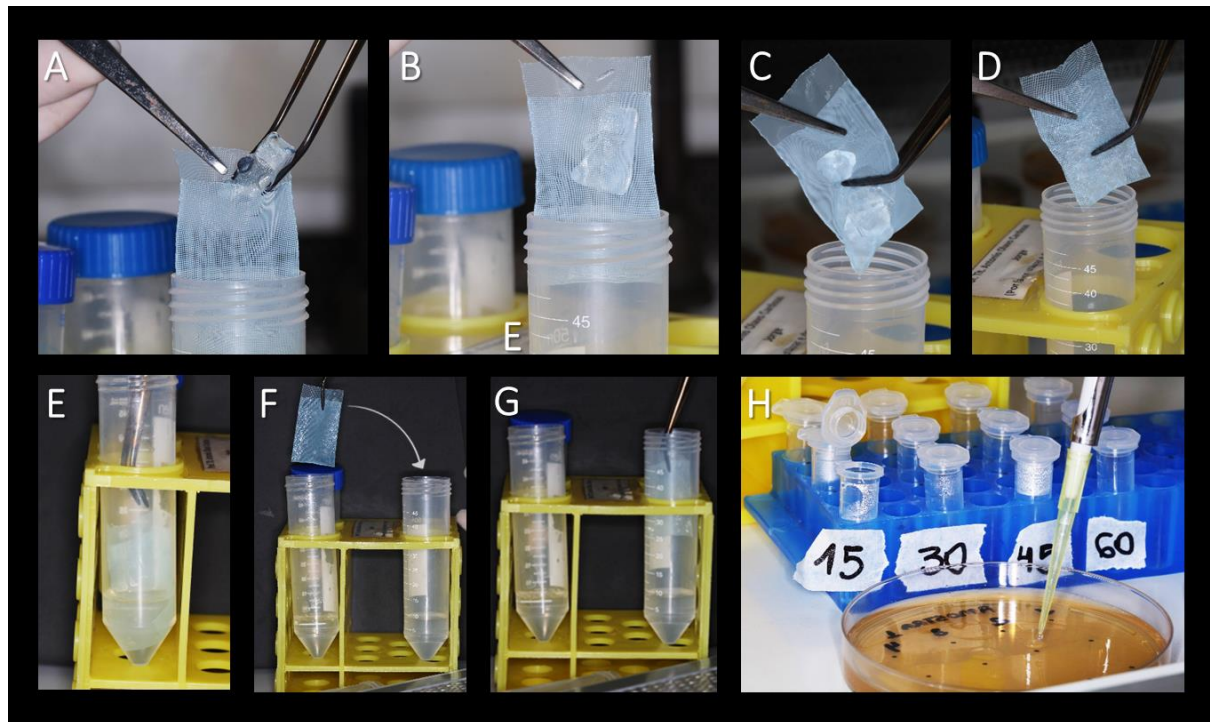
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.1.5 Análise do sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 em PBS

A quantificação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 liberadas a partir da formulação probiótica (2% p/v) foi avaliada usando sacos de biópsia (Biopsy bags, malha de 0,2 mm de diâmetro, *Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts,

EUA). Três amostras foram colocadas em três sacos de biópsia e maceradas para permitir a difusão das bactérias do *gellan gum* para o líquido circundante, sendo depois transferidas para tubos contendo 9 mL de PBS. Os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos e, após esse tempo, foram homogeneizados em vortex por 10 segundos. Os sacos de biópsia foram transferidos para tubos subsequentes contendo 9 mL de PBS e deixados em repouso por mais 15 minutos. Este processo foi repetido por um tempo total de 60 minutos. Após a remoção do saco de biópsia, uma alíquota de 100  $\mu$ L foi retirada de cada tubo e diluições seriadas foram realizadas e semeadas em ágar MRS e incubadas por 48 h a 37°C (CO<sub>2</sub>) para determinar o número de UFC/mL (Figura 5).

Figura 5 – Teste de análise da liberação de *L. paracasei* 28.4 (60 minutos)



Legenda: a e b) amostra sendo colocada no saco de biópsia; c e d) maceração da formulação probiótica de *gellan gum*; e) repouso em PBS por 15 minutos; f) transferência do saco de biópsia para outro tubo com PBS; g) repouso e repetição do processo até concluir 60 minutos; h) diluição seriada e semeadura em ágar MRS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.1.6 Sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 em saliva artificial

A quantificação de células viáveis liberadas em PBS e liberação de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação também foi avaliada em saliva artificial. Para isso, foram realizados os mesmos passos do experimento descrito anteriormente (ilustrado na Figura 4), com alteração somente do meio líquido de PBS para saliva artificial. A saliva utilizada foi produzida em farmácia de manipulação (localizada em São José dos Campos, SP), contendo em sua fórmula cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, fosfato monossódico potássico, cloreto de cálcio anidro, metilparabeno, propilparabeno, carboximetilcelulose, sorbitol líquido e água purificada. Assim como no teste anterior, uma alíquota de 100 µL do meio de líquido foi retirada de cada tubo e diluições seriadas foram realizadas e semeadas em ágar MRS e incubadas por 48 h a 37°C (CO<sub>2</sub>) para determinar o número de UFC/mL.

### 3.1.7 Preparo da formulação placebo

Para a formulação placebo, foi empregada a mesma metodologia descrita para a confecção da formulação de *gellan gum* probiótica, com a diferença de que foram adicionados 2 mL de água destilada estéril em substituição à suspensão de *L. paracasei* 28.4 durante o preparo. Após finalizadas, as formulações de *gellan gum* probióticas e placebos apresentaram as mesmas características em termos de aparência e consistência, não sendo possível fazer a distinção entre os produtos por meio desses aspectos.

### 3.1.8 Armazenamento das formulações de *gellan gum*

Durante todo o período de testes, as amostras permaneceram em condições adequadas para uso, sem sinais de contaminação ou degradação. Após testar diferentes métodos de armazenamento, foi escolhido aquele que demonstrou controle total da contaminação nas avaliações por meio de esfregaço das embalagens, semeadura em ágar MRS e incubação por 48 h a 37°C (CO<sub>2</sub>). Dessa forma, cada amostra foi acondicionada em embalagem plástica estéril individual e vedada usando seladora manual (PFS200, Cetro, Bauru, São Paulo, Brasil). Os produtos ficaram armazenados sob refrigeração em geladeira, simulando o armazenamento que seria realizado pelos pacientes. Para uso terapêutico (parte B), as amostras foram colocadas em potes de plástico idênticos, diferenciados apenas por etiqueta externa e removível. Em cada pote foi colocada a quantidade de gomas a serem consumidas de acordo com a indicação (60 por paciente), bem como instruções escritas quanto à sua forma de armazenamento e consumo (Apêndice A).

### 3.1.9 Análise estatística (parte A)

Inicialmente, o teste de normalidade foi aplicado em todos os resultados obtidos. Em seguida, foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Tukey para a análise da viabilidade e recuperação de *L. paracasei* 28. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism 7.0*, com nível de significância de 5%.

## **3.2 PARTE B - Administração de *Lactobacillus paracasei* 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite: estudo clínico randomizado placebo-controlado de superioridade**

### **3.2.1 Desenho do estudo**

O estudo foi desenhado como um estudo do tipo clínico, controlado, randomizado, prospectivo, triplo-cego, placebo de superioridade, com acompanhamento de 6 meses.

### **3.2.2 População-alvo e tamanho da amostra**

A amostra desse estudo foi composta por indivíduos com diagnóstico de Periodontite Estágios III ou IV, Graus B ou C, Generalizada, provenientes da clínica de periodontia do ICT-Unesp de São José dos Campos/SP.

O tamanho da amostra foi calculado para detectar diferença de pelo menos 1 mm de redução no nível de inserção clínica (NIC, variável primária) entre os grupos aos 3 meses de acompanhamento. Considerando nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05, erro tipo B de 20% (poder de 80%) e desvio-padrão de 0,97 mm, conforme observado em estudo prévio que avaliou o uso de probióticos no tratamento da periodontite (Teughels et al., 2013), 16 pacientes por grupo seriam necessários para atingir essa finalidade. Com uma amostra de 40 pacientes (20 por grupo), o estudo apresentou poder maior que 80%.

### 3.2.3 Critérios de inclusão

Nesse estudo, foram incluídos pacientes de ambos os sexos, que obedeciam aos seguintes critérios de inclusão:

- a) idade igual ou superior a 35 anos;
- b) diagnóstico de Periodontite Estágios III ou IV, Graus B ou C, do tipo Generalizada (Papapanou et al., 2018; Tonetti et al., 2018);
- c) presença de no mínimo 20 dentes em boca;
- d) assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Para o diagnóstico da periodontite, foi utilizada a seguinte classificação:

- a) periodontite: caracterizada por perda de inserção detectada em dois ou mais dentes não adjacentes e/ou perda de inserção  $\geq 3$  mm com PS  $> 3$  mm nas faces livres de pelo menos dois dentes;
- b) estágio III e IV: presença de pelo menos 1 dente com um ou mais sítio(s) interproximal(is) com PS  $\geq 6$ mm, perda de inserção  $\geq 5$ mm e perda óssea excedendo até o terço médio ou apical da raiz;
- c) grau B: histórico de perda de inserção  $< 2$  mm nos últimos 5 anos ou percentual de perda óssea/idade (dente mais afetado) entre 0,25 e 1.;
- d) grau C: histórico de perda de inserção  $\geq 2$  mm nos últimos 5 anos ou percentual de perda óssea/idade (do dente mais afetado)  $> 1$ ;
- e) generalizada: envolvimento de pelo menos 30% dos dentes.

### **3.2.4 Critérios de não inclusão e exclusão**

Não foram incluídos nessa pesquisa pacientes inseridos em um ou mais dos seguintes critérios:

- a) presença de condições sistêmicas que contraindiquem o procedimento periodontal ou influenciem na progressão da doença (como por exemplo discrasias sanguíneas, imunodeficiência, diabetes etc.);
- b) ter realizado tratamento periodontal nos últimos seis meses;
- c) ser tabagista;
- d) estar gestante ou lactante;
- e) uso de terapia antibiótica ou probiótica nos últimos três meses;
- f) fazer uso crônico de anti-inflamatórios ou medicações que podem alterar a resposta dos tecidos periodontais;
- g) ter indicação de profilaxia antibiótica para procedimentos odontológicos.

Além disso, seriam excluídos da pesquisa os pacientes que fizessem uso de terapias antibióticas e/ou probióticas durante o período do estudo ou que decidissem abandonar a pesquisa.

### **3.2.5 Grupos de tratamento**

Os participantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos:

- a) grupo Controle (n=20): debridamento periodontal ultrassônico de boca toda associado à administração da formulação placebo, 2 vezes ao dia durante 30 dias;
- b) grupo Teste (n=20): debridamento periodontal ultrassônico de boca toda associado à administração da formulação probiótica, 2 vezes ao dia durante 30 dias.

### **3.2.6 Randomização, ocultamento e cegamento**

A randomização foi realizada por uma pessoa não participante do estudo, que gerou uma sequência de alocação aleatória em programa de computador (Microsoft Excel<sup>®</sup>) de acordo com o número amostral de participantes. Cada número foi escrito na parte externa de um envelope pardo, opaco e selado, contendo em seu interior um papel com a intervenção correspondente (placebo/probiótico). Os envelopes foram abertos por uma pessoa diferente do operador e do avaliador, responsável por fazer a adição de *L. paracasei* 28.4 (teste) ou de água destilada (controle) durante o preparo da formulação. Essa pessoa também ficou responsável por etiquetar as embalagens para a entrega dos produtos correspondentes a cada paciente. As formulações foram igualmente manipuladas (com exceção do carregamento ou não com bactérias probióticas), não sendo possível fazer a distinção entre os produtos. Além disso, todas as formulações ficaram armazenadas em embalagens idênticas, diferenciadas apenas por etiquetas que foram removidas antes da entrega aos participantes. Essas medidas permitiram o desenvolvimento de um estudo triplo cego, com operador, avaliador e paciente cegos às intervenções adotadas.

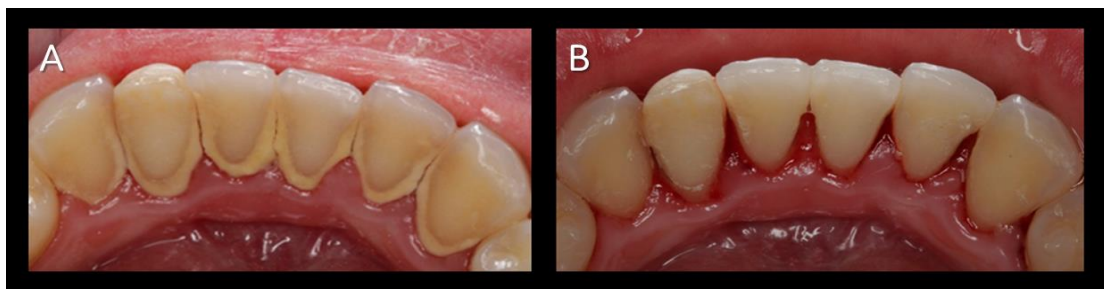
### 3.2.7 Procedimentos clínicos

Os procedimentos clínicos foram realizados em duas etapas: terapia inicial e terapia periodontal não cirúrgica, conforme descrito a seguir.

#### 3.2.7.1 Terapia inicial

Antes de iniciar o tratamento, os participantes passaram por exame clínico e radiográfico completo da cavidade oral e avaliação dos parâmetros periodontais. Todos os pacientes foram submetidos à terapia inicial de adequação prévia do meio bucal, com informações quanto à sua condição periodontal e instrução detalhada de higiene oral. Em seguida, foram realizadas raspagem de cálculo supragengival e profilaxia (Figura 6). Todos os dentes condenados foram extraídos e contenções periodontais foram realizadas. Nessa fase, cavidades abertas foram escariadas e seladas com restauração provisória.

Figura 6 – Terapia inicial e raspagem supragengival



Legenda: a) dentes com cálculo supragengival previamente à terapia inicial; b) dentes após orientação de higiene e raspagem supragengival.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Trinta dias após a finalização da terapia inicial, foi realizada nova avaliação periodontal e, somente os pacientes que apresentaram índice de placa visível (IP) menor ou igual a 25% (Figura 7) foram submetidos ao debridamento periodontal. Caso o controle de biofilme não fosse considerado adequado, o paciente era novamente submetido à readequação do meio bucal e instrução de higiene oral até que o controle fosse considerado satisfatório para prosseguir para a próxima etapa tratamento ( $IP \leq 25\%$ ).

Figura 7 – Terapia inicial: antes, durante e depois



Legenda: a) sorriso previamente à terapia inicial, com presença de cálculo e placa supragengival; b) sorriso corado com evidenciador de placa durante orientação de higiene e verificação do índice de placa inicial; c) sorriso após terapia inicial e controle de placa ( $IP \leq 25\%$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.2.7.2 Terapia periodontal não cirúrgica

Após a terapia inicial, todos os pacientes passaram por tratamento periodontal não cirúrgico de boca toda em estágio único (Wennstrom et al., 2005). Para tal, os pacientes foram anestesiados e, em uma única sessão, todos os sítios com bolsa periodontal foram submetidos ao debridamento periodontal com equipamento de ultrassom Cavitron® Select (Dentsply, Nova York, EUA)

com ponta universal específica para o debridamento (UI25K10S, Hu-Friedy, York, Pensilvânia, EUA), conforme ilustrado na Figura 8.

O debridamento foi realizado por um único operador, treinado, cego para a alocação dos pacientes e diferente do avaliador. Em caso de intercorrência que impossibilitasse a finalização do debridamento de toda a boca em sessão única, o procedimento era retomado no prazo máximo de 24 horas. Imediatamente após o debridamento, os pacientes receberam as formulações devidamente embaladas conforme a randomização correspondente. Todos os participantes foram instruídos a consumirem as amostras 2 vezes ao dia durante os 30 dias subsequentes ao tratamento periodontal e receberam orientações verbais e escritas quanto ao correto armazenamento e consumo das formulações.

Figura 8 – Ultrassom utilizado na terapia periodontal não cirúrgica



Fonte: Elaborada pelo fabricante.

### 3.2.8 Avaliações clínicas

Todas as medidas clínicas foram realizadas por um único pesquisador, previamente calibrado para as medidas e cego em relação ao tratamento

recebido pelos pacientes. O examinador foi considerado calibrado ao alcançar um nível de concordância superior a 75% de reprodutibilidade no teste de correlação intraclasse, após comparar os valores de profundidade de sondagem (PS) e NIC de 10 pacientes, medidos duas vezes em um intervalo de 24 horas.

No estudo, a primeira avaliação foi realizada previamente à terapia inicial e, depois de trinta dias, uma nova avaliação foi realizada para verificar se o paciente já estava apto para iniciar o debridamento periodontal. Os resultados do tratamento foram avaliados 3 e 6 meses após a realização do debridamento periodontal associado ao uso da formulação de *gellan gum* placebo ou probiótica. Todos os dentes presentes na cavidade oral, com exceção dos terceiros molares, foram avaliados conforme os seguintes parâmetros:

- a) índice de placa visível (IP), determinado como a porcentagem dada pela razão entre a somatória do número de sítios com presença de placa visível e a somatória do número total de faces examinados de acordo com avaliação dicotômica (Ainamo, Bay, 1975) em quatro faces por dente;
- b) sangramento à sondagem (SS), determinado dicotomicamente como presença ou ausência de sangramento à sondagem em cada um dos seis sítios avaliados por dente;
- c) índice de sangramento gengival (IG), determinado como a porcentagem dada pela razão entre a somatória do número de sítios com sangramento à sondagem (SS) e a somatória do número total de sítios examinados de acordo com avaliação dicotômica (Ainamo, Bay, 1975) em quatro sítios por dente;
- d) profundidade de sondagem (PS), medida como a distância entre o fundo do sulco/bolsa periodontal até a margem gengival, avaliada em seis sítios por dente, em milímetros;

- e) nível de inserção clínica (NIC), determinado como a distância entre o fundo do sulco/bolsa periodontal até a junção esmalte-cimento (JEC), avaliado em seis sítios por dente, em milímetros;
- f) nível margem gengival (MG), determinado como a distância entre a JEC até a margem gengival, avaliada em seis sítios por dente, em milímetros.

Todas as medidas clínicas (IP, IG, BOP, PS, NIC e RG) foram realizadas utilizando sonda periodontal Carolina do Norte (UNC® - Hu-Friedy, Rio de Janeiro). As medidas foram coletadas antes da terapia inicial, antes da terapia periodontal não-cirúrgica (30 dias depois da terapia inicial) e nos acompanhamentos de 3 e 6 meses após o debridamento periodontal. Para cada grupo, ao final dos 3 e 6 meses, foram realizadas análises com os dados clínicos de boca toda. Posteriormente, foram realizadas análises adicionais considerando a estratificação dos sítios de acordo com a profundidade de sondagem no *baseline*, divididos em sítios com  $PS \geq 4\text{mm}$ ,  $PS \geq 5\text{mm}$ ,  $PS = 5$  ou  $6\text{ mm}$  (bolsas moderadas) e  $PS \geq 7\text{ mm}$  (bolsas profundas).

### **3.2.9 Adesão à terapia e consumo das formulações**

Com o intuito de avaliar a adesão à terapia adjunta, os pacientes foram instruídos a não descartarem as embalagens das formulações e solicitados a devolverem essas embalagens (vazias ou ainda contendo amostras não consumidas) ao final do período de administração desses produtos. Essa medida foi adotada em conjunto a um diário de frequência de consumo (Apêndice B) para verificar a adesão do participante à terapia.

### 3.2.10 Percepção do paciente e monitoramento de efeitos adversos

O diário apresentado também foi utilizado para registrar as percepções do paciente e monitorar a possível ocorrência de efeitos adversos associados ao consumo das formulações. Para o controle local, foram realizadas avaliações visuais periódicas em busca de presença de manchas brancas e/ou indicativos de atividade de cárie ou de efeitos orais adversos nos dentes ou cavidade oral. Essa inspeção visual foi repetida aos 7, 30 e 60 dias após a realização do debridamento periodontal e início do consumo das formulações de *gellan gum*.

Para monitorar possíveis efeitos adversos sistêmicos relacionados ao consumo do *gellan gum* - incorporado ou não com *L. paracasei* 28.4 -, além do uso do diário, os participantes responderam a um questionário contendo itens relacionados a efeitos adversos já associados à administração de produtos probióticos (adaptado da avaliação prévia utilizada por Navarro-Rodriguez et al., 2013; Apêndice C), que foi aplicado após 7 e 30 dias de consumo.

### 3.2.11 Análise estatística

A estatística descritiva foi expressa como média e desvio-padrão de cada parâmetro clínico. A distribuição normal foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados demográficos foram analisados pelos Teste de Mann-Whitney e Teste Exato de Fisher. As comparações intragrupo dos parâmetros clínicos IG, IP, PS e NIC foram analisadas usando o teste de variância ANOVA de medidas repetidas, seguido de Teste T ou Teste de Mann-Whitney para comparações múltiplas intergrupo. As informações de adesão à terapia consumido das gomas

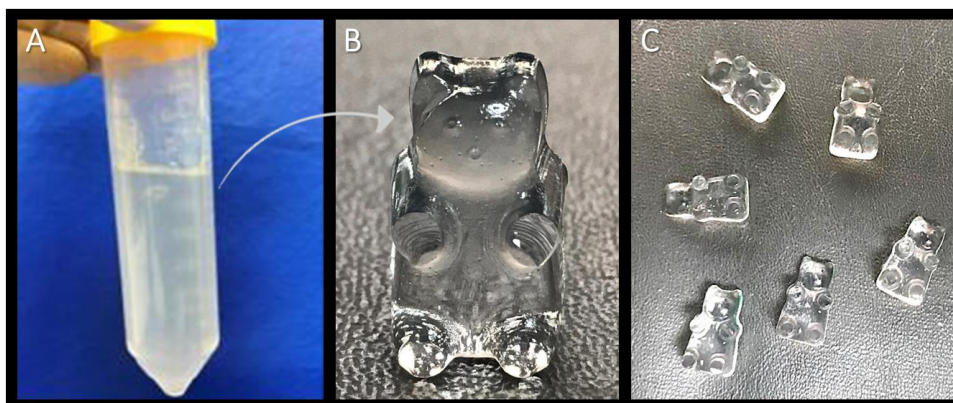
foram expressas como número e porcentagem ou média e desvio padrão, sendo testadas pelos Teste de Mann-Whitney e Teste Exato de Fisher. Por fim, os dados sobre percepção de efeitos adversos foram expressos em quantidade/número total de pacientes e avaliados usando o Teste Exato de Fisher. Nos casos em que os parâmetros não apresentaram distribuição normal pelo Teste de Shapiro-Wilk, testes não paramétricos foram utilizados. Um nível de significância de 0,05 foi adotado.

## 4 RESULTADO

### 4.1 RESULTADO *IN VITRO* (Parte A)

Inicialmente, foi estudada a melhor forma de apresentação da formulação considerando a finalidade clínica. Para isso, foram testadas diferentes concentrações e manipulações até o estabelecimento da metodologia descrita nesse trabalho. A utilização do *gellan gum* na concentração de 2% p/v foi escolhida por apresentar consistência adequada para manuseio e ser confortável para mastigação. Diversas formas de armazenamento e esterilização das embalagens foram avaliadas até estipular a individualização em sacos plásticos esterilizados por meio de radiação ultravioleta e vedados com seladora térmica. A Figura 9 ilustra a diferença entre a formulação utilizada por Ribeiro et al. (2020) e a formulação desenvolvida nesse trabalho.

Figura 9 – Diferença entre as formulações de *gellan gum*



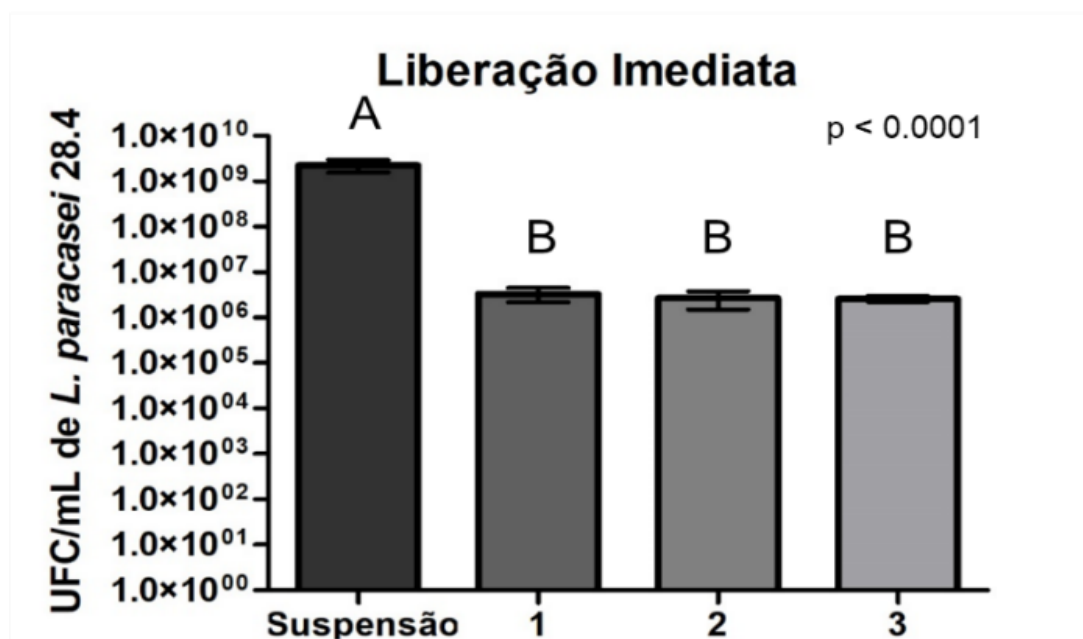
Legenda: a) formulação com *gellan gum* a 1% p/v, usada por Ribeiro et al. (2020); b e c) apresentação final da formulação com *gellan gum* a 2% p/v, desenvolvida nessa pesquisa para consumo pelos participantes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.1 Viabilidade imediata de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação

A capacidade de carreamento do *gellan gum* e liberação de células de *L. paracasei* 28.4 na concentração de 2% p/v foi verificada imediatamente após o preparo da goma probiótica. Os resultados demonstraram que, a partir da incorporação de uma suspensão controle de 9 log UFC/mL de *L. paracasei* 28.4, houve recuperação de 6 log (UFC/ml) de *L. paracasei* 28.4 das amostras de *gellan gum* (Figura 10). Dessa forma, a formulação mostrou liberação compatível com as recomendações para o uso de produtos probióticos ( $10^6$  a  $10^8$  UFC/g de células viáveis ou  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/dia) (Champagne et al., 2011).

Figura 10 – Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL), recuperadas imediatamente após o preparo da formulação de *gellan gum*



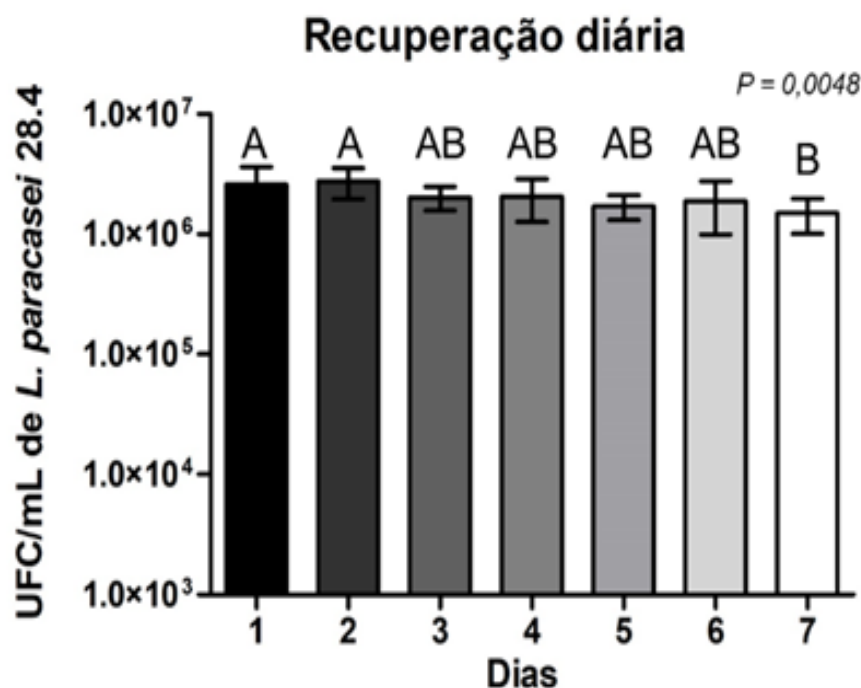
Legenda: 1, 2 e 3 correspondem às amostras da formulação submetidas ao teste. Suspensão controle: suspensão de *L. paracasei* 28.4 não incorporada em *gellan gum*. ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.2 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 após armazenamento em curto e longo prazo

Na avaliação da viabilidade das amostras de *gellan gum* após armazenamento, os resultados demonstraram recuperação de aproximadamente 6 log (UFC) de *L. paracasei* 28.4 diariamente, confirmando a manutenção da viabilidade celular durante um período de 7 dias (Figura 11). Apesar das diferenças estatísticas encontradas com o passar dos dias, a contagem de todos os 7 dias se manteve em aproximadamente  $10^6$ , assemelhando-se ao resultado observado no teste de viabilidade imediata.

Figura 11 – Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL), recuperadas diariamente após armazenamento em refrigeração

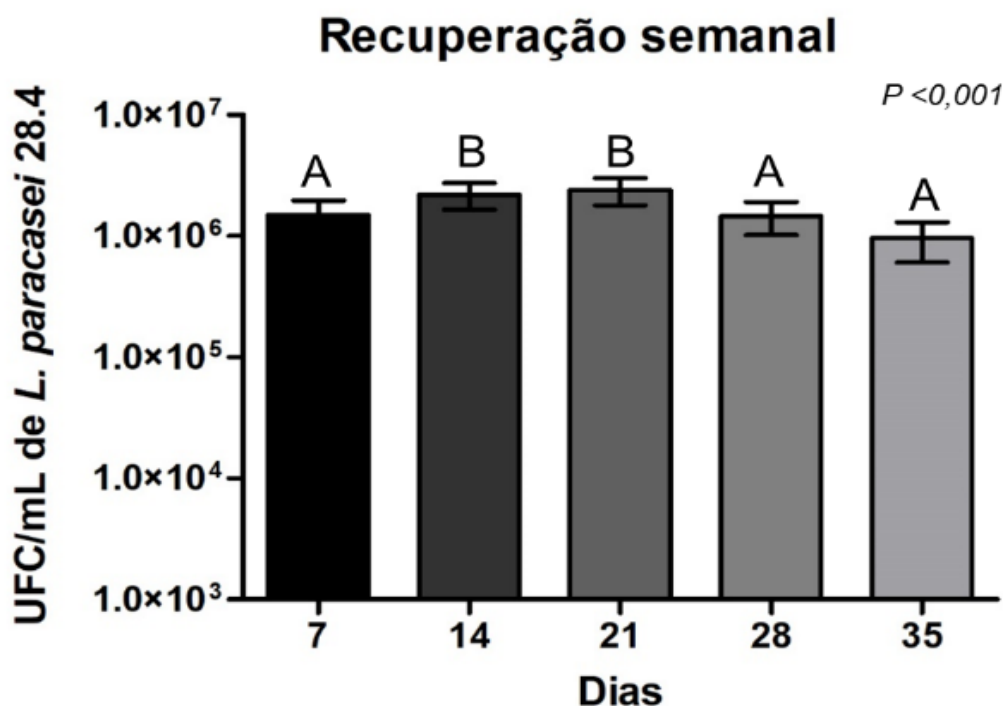


Legenda: ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para monitorar a viabilidade celular por um período maior, a formulação foi testada semanalmente, exibindo recuperação de aproximadamente 6 log durante todas as 5 semanas, totalizando 35 dias de armazenamento (Figura 12). Esses resultados indicaram a aplicabilidade da estocagem por período compatível com o tratamento proposto para a parte B do estudo, cuja duração do consumo estava planejada para 30 dias. Assim como no resultado anterior, embora tenha sido observada diferença estatisticamente significativa nos dias 14 e 21 em relação aos outros tempos, a contagem semanal se manteve semelhante à quantidade de células viáveis observada nos testes de viabilidade imediata e de recuperação diária de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação.

Figura 12 – Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL), recuperadas semanalmente após armazenamento em refrigeração



Legenda: ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

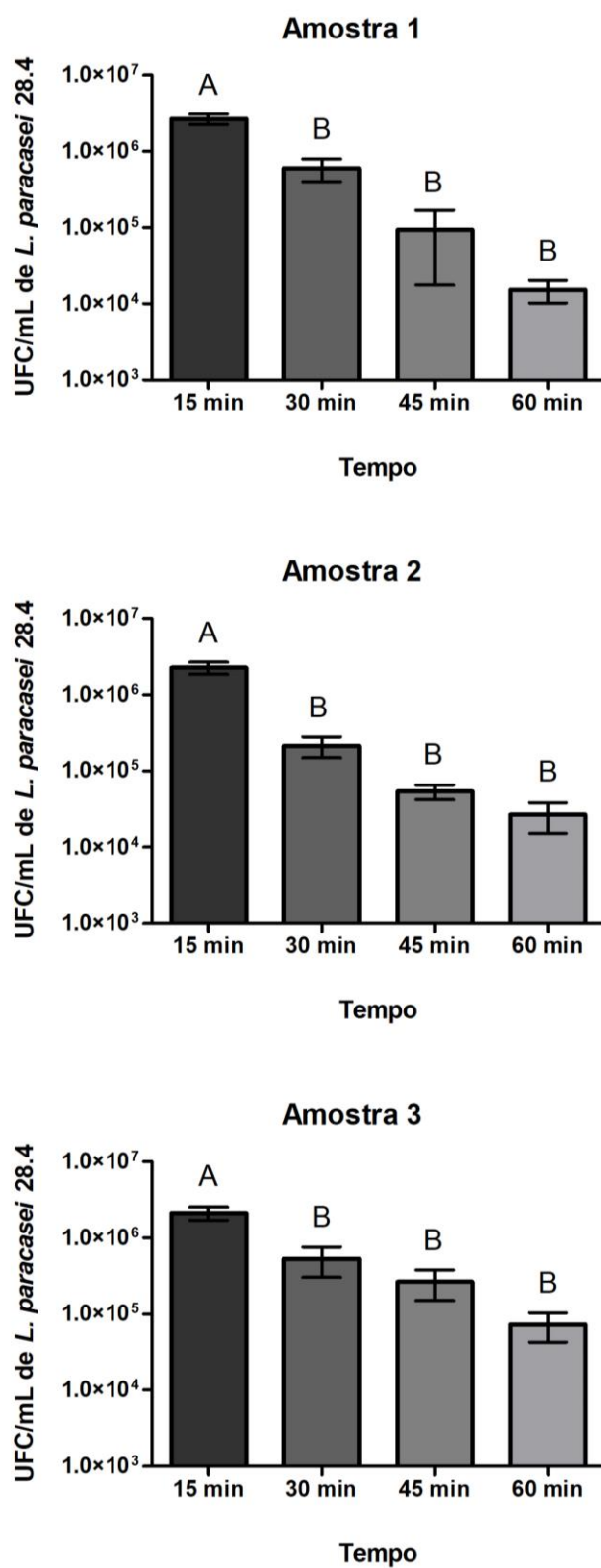
#### **4.1.3 Sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 em PBS**

Além das avaliações de viabilidade e recuperação das células viáveis após armazenamento, também foi realizada a análise da liberação de *L. paracasei* 28.4 ao longo do tempo. Os resultados da análise desse sistema de liberação a partir de três amostras da formulação demonstraram que todas foram capazes de liberar as células de *L. paracasei* 28.4 quando colocadas em PBS por 60 minutos, apresentando redução gradual da liberação durante esse período (Figura 13).

#### **4.1.4 Sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 em saliva artificial**

A análise utilizando saliva artificial também demonstrou liberação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 a partir da formulação de *gellan gum*. Todavia, diferentemente da redução gradual do número de células que foi observada em PBS, a liberação de *L. paracasei* 28.4 em saliva artificial exibiu liberação constante durante todo o período, com contagem de aproximadamente 6 log UFC/ml nos quatro tempos analisados (Figura 14). Sendo assim, os resultados dos sistemas de liberação indicaram que poderia ocorrer liberação de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal mesmo após o período de mastigação, concluindo os testes necessários antes da próxima etapa do estudo.

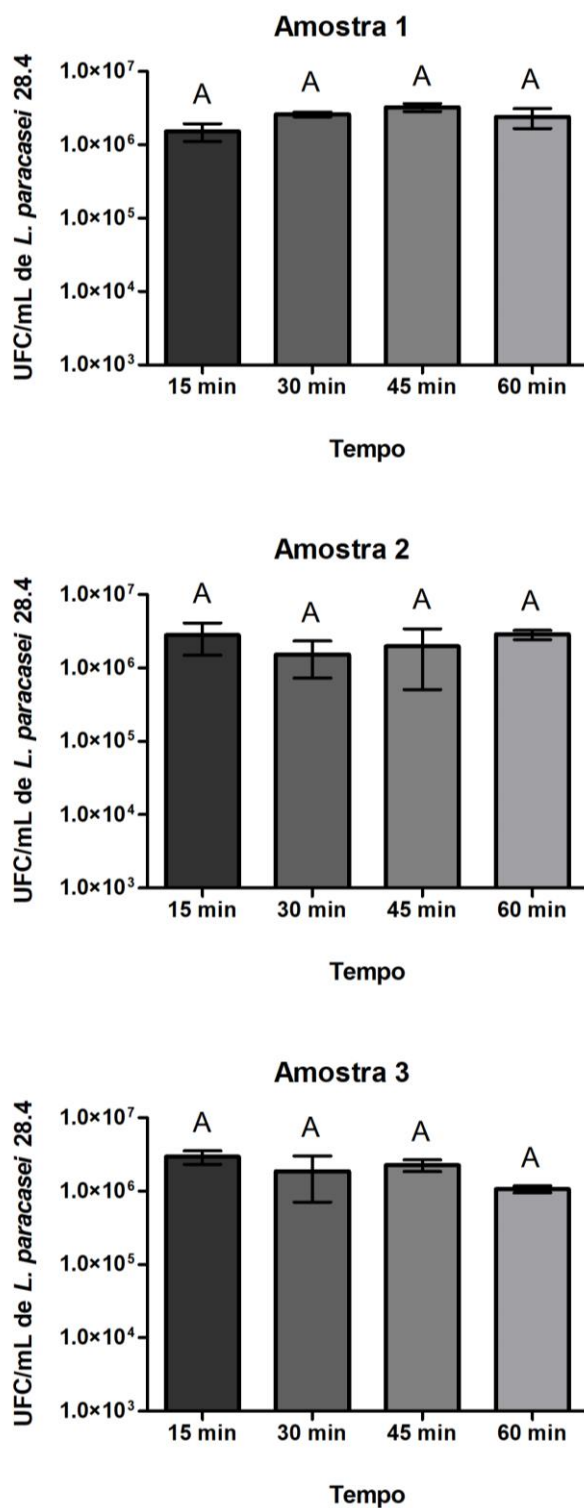
Figura 13 – Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em PBS



Legenda: ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL) liberadas das três amostras testadas durante período de 60 minutos em saliva



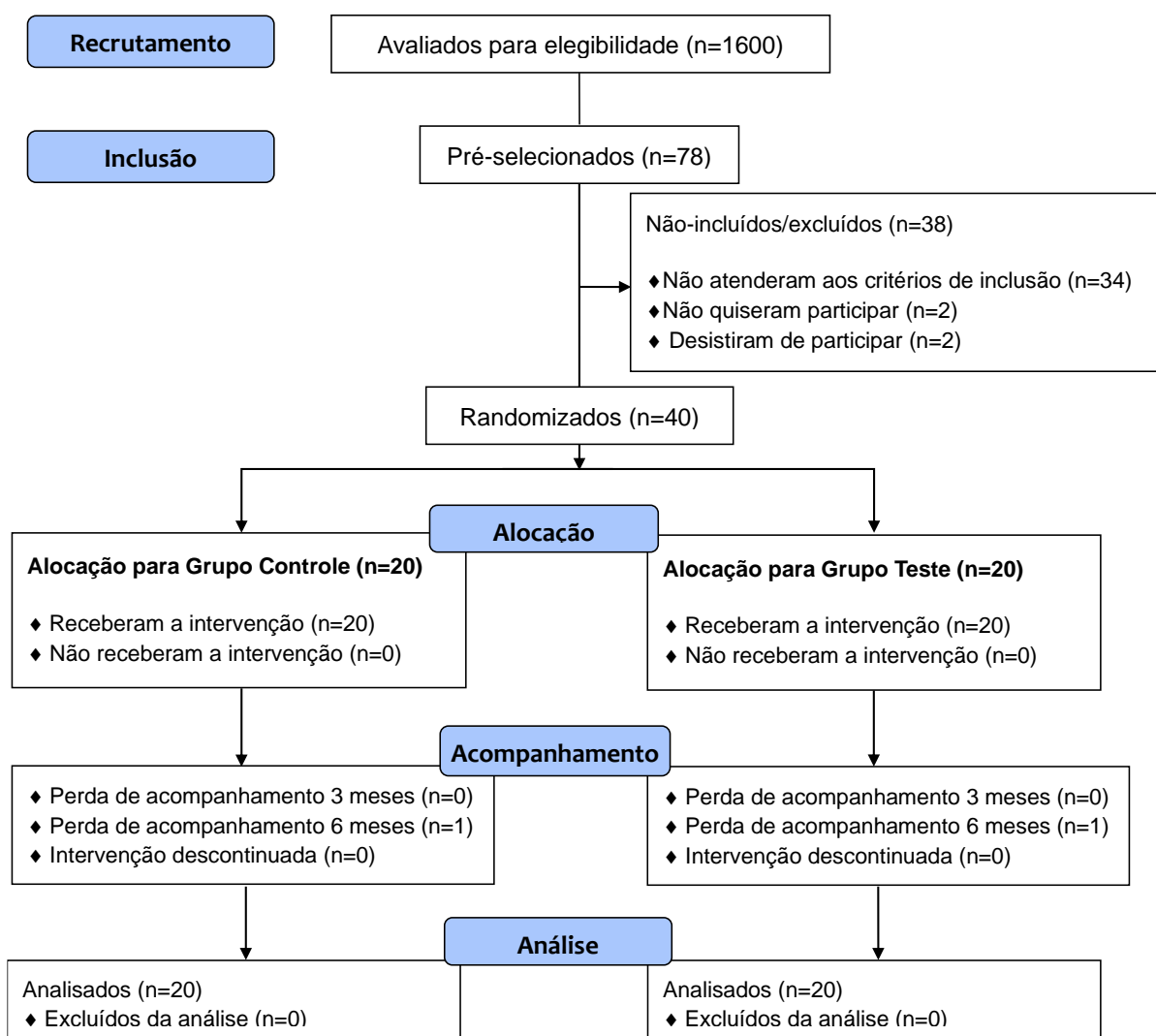
Legenda: ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 RESULTADO CLÍNICO (Parte B)

A amostra desse estudo foi composta por 40 pacientes portadores de Periodontite Estágios III ou IV, Graus B ou C, Generalizada. Os participantes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de tratamento, com 20 pacientes em cada um, conforme demonstrado no fluxograma (Figura 15).

Figura 15 – Fluxograma segundo o CONSORT 2010



Fonte: Elaborada pelo autor.

Participaram desse estudo pacientes de ambos os sexos, sendo 33 mulheres (82,5%) e 7 homens (17,5%), alocados sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os pacientes incluídos tinham idades entre 35 e 70 anos, com média de  $49,20 \pm 10,86$  anos no grupo controle e  $44,75 \pm 5,01$  anos no grupo teste. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nas médias de idade, número de dentes presentes ou na distribuição de acordo com a classificação da doença periodontal. A Tabela 1 reúne os dados demográficos iniciais dos pacientes.

Tabela 1 – Dados demográficos iniciais dos pacientes (n=40)

Parâmetros		Controle (n=20)	Teste (n=20)	p-value
<b>Idade</b>		49,20 ± 10,86	44,75 ± 5,01	0,092*
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	16 (80%)	17 (85%)	1†
	<b>Masculino</b>	4 (20%)	3 (15%)	
<b>Número de dentes</b>		24,42 ± 3,03	25,08 ± 2,78	0,642*
<b>Diagnóstico</b>	<b>III/B</b>	8 (40%)	9 (45%)	0,982†
	<b>III/C</b>	3 (15%)	3 (15%)	
	<b>IV/B</b>	5 (25%)	4 (20%)	
	<b>IV/C</b>	4 (20%)	4 (20%)	

Legenda: Dados de idade (anos) e número de dentes foram relatados como média e desvio padrão [média±DP]. Dados de sexo e diagnóstico foram relatados como frequência numérica e porcentagem [N/(%)]. O diagnóstico foi classificado em Estágio/Grau. Valores de  $p < 0,05$  representam diferença estatisticamente significativa. \*Teste de Mann-Whitney; † Teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores médios dos parâmetros clínicos IG, IP, PS e NIC de boca toda são apresentados na Tabela 2, por meio de média e desvio-padrão dos diferentes tempos de análise (*baseline*, 3 e 6 meses). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dados nas comparações entre

os grupos. Quanto às análises intragrupo, notam-se diferenças significativas em todos os parâmetros aos 3 meses, demonstrando melhora das condições periodontais (IG, IP, PS e NIC) em ambos os grupos após realização da terapia periodontal associada ou não à terapia probiótica. Além disso, é possível observar a manutenção dos resultados aos 6 meses de acompanhamento, visto que a melhora nos parâmetros foi mantida em relação ao *baseline*.

Além das análises dos dados de boca toda, também foram realizadas estratificações das bolsas periodontais (considerando as médias iniciais de PS), a fim de delinear a distribuição dos sítios com bolsas periodontais da população estudada e avaliar possíveis diferenças de resultados obtidos após o tratamento. A Tabela 3 reúne os dados de quantidade, média de PS e média de NIC das bolsas periodontais estratificadas em  $PS \geq 4\text{mm}$  e  $PS \geq 5\text{mm}$ . Já a Tabela 4 apresenta os dados de quantidade, média de PS e média de NIC das bolsas periodontais separadas em moderadas ( $PS = 5$  e  $6\text{mm}$ ) e profundas ( $PS \geq 7\text{ mm}$ ).

Com relação aos dados analisados, é possível perceber que ambas as terapias promoveram redução significativa do número de bolsas periodontais em todos os estratos ( $PS \geq 4\text{mm}$ ,  $PS \geq 5\text{mm}$ ,  $PS = 5$  e  $6\text{mm}$  e  $PS \geq 7\text{mm}$ ) após 3 meses do tratamento periodontal, conforme observado nas análises intragrupo. Além disso, assim como visto nos dados de boca toda, os resultados obtidos foram mantidos aos 6 meses de acompanhamento, demonstrando manutenção da melhora da condição periodontal dos participantes, independentemente da intervenção recebida (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2 - Dados clínicos de boca toda (*baseline*, 3 e 6 meses)

Parâmetro	Período	Controle (n=20)		Teste (n=20)		<i>p-value</i>
		Média	Varição ( $\Delta$ 0–3m/0–6m)	Média	Varição ( $\Delta$ 0–3m/0–6m)	p/ $\Delta$
IG (%)	<i>Baseline</i>	62,10 $\pm$ 20,75 Aa	-	59,07 $\pm$ 23,31 Aa	-	-
	3 meses	34,32 $\pm$ 16,24 Ba	27,79 $\pm$ 16,74	32,49 $\pm$ 15,10 Ba	26,58 $\pm$ 24,27	0,856*
	6 meses	30,45 $\pm$ 14,88 Ba	31,65 $\pm$ 16,76	32,59 $\pm$ 10,29 Ba	26,48 $\pm$ 24,03	0,434*
IP (%)	<i>Baseline</i>	72,92 $\pm$ 18,81 Aa	-	67,61 $\pm$ 21,68 Aa	-	-
	3 meses	29,53 $\pm$ 22,08 Ba	43,39 $\pm$ 28,23	25,91 $\pm$ 20,32 Ba	41,69 $\pm$ 24,86	0,841*
	6 meses	27,12 $\pm$ 18,45 Ba	45,81 $\pm$ 26,10	22,66 $\pm$ 16,80 Ba	44,95 $\pm$ 26,57	0,919*
PS (mm)	<i>Baseline</i>	3,52 $\pm$ 0,53 Aa	-	3,47 $\pm$ 0,43 Aa	-	-
	3 meses	2,88 $\pm$ 0,39 Ba	0,63 $\pm$ 0,32	2,79 $\pm$ 0,26 Ba	0,68 $\pm$ 0,41	0,946†
	6 meses	2,82 $\pm$ 0,38 Ba	0,69 $\pm$ 0,34	2,78 $\pm$ 0,32 Ba	0,69 $\pm$ 0,48	0,588†
NIC (mm)	<i>Baseline</i>	3,86 $\pm$ 0,82 Aa	-	3,72 $\pm$ 0,54 Aa	-	-
	3 meses	3,30 $\pm$ 0,77 Ba	0,55 $\pm$ 0,31	3,09 $\pm$ 0,48 Ba	0,63 $\pm$ 0,43	1,000†
	6 meses	3,31 $\pm$ 0,78 Ba	0,55 $\pm$ 0,31	3,09 $\pm$ 0,47 Ba	0,63 $\pm$ 0,49	0,787†

Legenda: IG, índice de sangramento gengival; IP, índice de placa visível; PS, profundidade de sondagem; NIC, nível de inserção clínica;  $\Delta$  diferença entre valores de *baseline* e 3 meses ou *baseline* e 6 meses. Dados expressos como média e desvio padrão [média $\pm$ DP]. Letras maiúsculas distintas representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação das médias intragrupo (na vertical – Teste ANOVA de medidas repetidas). Letras minúsculas distintas representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação das médias intergrupo (na horizontal – Teste ANOVA de medidas repetidas e Teste de Tukey). Valores de  $p < 0,05$  representam diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo dos valores de  $\Delta$  (na horizontal – \*Teste T; † Teste de Mann-Whitney).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Estratificação das bolsas periodontais com PS  $\geq 4$ mm e PS  $\geq 5$ mm no *baseline*

Bolsas periodontais	Parâmetro	Período	Controle (n=20)		Teste (n=20)		<i>p-value</i> p/ $\Delta$
			Média	Varição ( $\Delta$ )	Média	Varição ( $\Delta$ )	
PS $\geq 4$ mm	Quantidade	<i>Baseline</i>	58,55 $\pm$ 13,57 Aa	-	64,00 $\pm$ 19,83 Aa	-	-
		3 meses	28,15 $\pm$ 12,80 Ba	30,40 $\pm$ 8,51	28,55 $\pm$ 12,75 Ba	35,45 $\pm$ 17,80	0,892†
		6 meses	26,80 $\pm$ 12,57 Ba	31,75 $\pm$ 9,01	28,80 $\pm$ 14,57 Ba	35,20 $\pm$ 17,05	0,715†
	PS (mm)	<i>Baseline</i>	5,21 $\pm$ 0,44 Aa	-	5,03 $\pm$ 0,37 Aa	-	-
		3 meses	3,73 $\pm$ 0,46 Ba	1,48 $\pm$ 0,50	3,63 $\pm$ 0,40 Ba	1,40 $\pm$ 0,48	0,646†
		6 meses	3,63 $\pm$ 0,42 Ba	1,58 $\pm$ 0,47	3,58 $\pm$ 0,50 Ba	1,44 $\pm$ 0,49	0,370*
	NIC (mm)	<i>Baseline</i>	5,57 $\pm$ 0,77 Aa	-	5,20 $\pm$ 0,53 Aa	-	-
		3 meses	4,19 $\pm$ 0,83 Ba	1,38 $\pm$ 0,49	3,90 $\pm$ 0,58 Ba	1,30 $\pm$ 0,54	0,618*
		6 meses	4,16 $\pm$ 0,86 Ba	1,41 $\pm$ 0,44	3,87 $\pm$ 0,60 Ba	1,33 $\pm$ 0,54	0,465†
PS $\geq 5$ mm	Quantidade	<i>Baseline</i>	35,35 $\pm$ 12,27 Aa	-	38,05 $\pm$ 16,99 Aa	-	-
		3 meses	13,40 $\pm$ 7,82 Ba	21,95 $\pm$ 8,27	12,00 $\pm$ 7,45 Ba	26,05 $\pm$ 14,43	0,755†
		6 meses	12,75 $\pm$ 7,81 Ba	22,60 $\pm$ 9,57	12,55 $\pm$ 9,32 Ba	25,50 $\pm$ 13,41	0,725†
	PS (mm)	<i>Baseline</i>	6,01 $\pm$ 0,50 Aa	-	5,74 $\pm$ 0,41 Aa	-	-
		3 meses	4,11 $\pm$ 0,55 Ba	1,90 $\pm$ 0,62	3,96 $\pm$ 0,52 Ba	1,79 $\pm$ 0,58	0,554*
		6 meses	3,99 $\pm$ 0,51 Ba	2,02 $\pm$ 0,62	3,89 $\pm$ 0,57 Ba	1,86 $\pm$ 0,66	0,424*
	NIC (mm)	<i>Baseline</i>	6,40 $\pm$ 0,89 Aa	-	5,88 $\pm$ 0,56 Ab	-	-
		3 meses	4,60 $\pm$ 0,95 Ba	1,79 $\pm$ 0,61	4,24 $\pm$ 0,67 Ba	1,64 $\pm$ 0,69	0,456*
		6 meses	4,58 $\pm$ 0,94 Ba	1,82 $\pm$ 0,53	4,20 $\pm$ 0,68 Ba	1,68 $\pm$ 0,71	0,486*

Legenda: PS, profundidade de sondagem; NIC, nível de inserção clínica;  $\Delta$  diferença entre valores de *baseline* e 3 meses ou *baseline* e 6 meses. Dados expressos em média e desvio padrão [média $\pm$ DP]. Letras distintas representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação das médias intragrupo (maiúsculas, na vertical – Teste ANOVA de medidas repetidas) ou intergrupo (minúsculas, na horizontal – teste ANOVA de medidas repetidas). Valores de  $p < 0,05$  representam diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo dos valores de  $\Delta$  (na horizontal – † Teste de Mann-Whitney; \* Teste T).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Estratificação das bolsas periodontais moderadas (PS =5-6mm) e profundas (PS ≥ 7mm) no *baseline*

Bolsas periodontais	Parâmetro	Período	Controle (n=20)		Teste (n=20)		<i>p-value</i> p/ Δ	
			Média	Varição (Δ)	Média	Varição (Δ)		
Moderadas PS =5-6mm	Quantidade	<i>Baseline</i>	26,60±10,03 Aa	-	31,05±14,41 Aa	-	-	
		3 meses	7,65±5,98 Ba	18,95±6,82	8,35±5,97 Ba	22,70±12,42	0,765†	
		6 meses	7,80±6,43 Ba	18,80±8,00	9,30±7,21 Ba	21,75±11,60	0,489†	
	PS (mm)	<i>Baseline</i>	5,36±0,12 Aa	-	5,33±0,10 Aa	-	-	
		3 meses	3,80±0,53 Ba	1,57±0,54	3,82±0,49 Ba	1,51±0,48	0,717*	
		6 meses	3,72±0,45 Ba	1,64±0,45	3,80±0,55 Ba	1,53±0,56	0,273†	
	NIC (mm)	<i>Baseline</i>	5,68±0,48 Aa	-	5,49±0,48 Aa	-	-	
		3 meses	4,21±0,77 Ba	1,47±0,61	4,12±0,71 Ba	1,37±0,64	0,627*	
		6 meses	4,21±0,75 Ba	1,48±0,51	4,13±0,77 Ba	1,35±0,71	0,449†	
	Profundas PS ≥ 7mm	Quantidade	<i>Baseline</i>	8,75±6,93 Aa	-	8,24±5,60 Aa	-	-
			3 meses	2,05±2,82 Ba	6,70±4,59	0,71±0,68 Ba	7,53±5,29	0,668†
			6 meses	1,60±2,30 Ba	7,15±5,49	0,65±0,76 Ba	7,59±5,43	0,691†
PS (mm)		<i>Baseline</i>	7,88±0,62 Aa	-	7,59±2,85 Aa	-	-	
		3 meses	5,02±0,93 Ba	2,85±0,81	4,74±1,89 Ba	2,84±1,43	0,980*	
		6 meses	4,87±0,99 Ba	3,01±1,02	4,46±1,90 Ba	3,12±1,61	0,753*	
NIC (mm)		<i>Baseline</i>	8,54±1,15 Aa	-	7,56±2,85 Ab	-	-	
		3 meses	5,92±1,35 Ba	2,62±1,05	5,02±2,02 Bb	2,54±1,50	0,826*	
		6 meses	5,88±1,52 Ba	2,66±1,00	4,72±1,99 Bb	2,84±1,53	0,630*	

Legenda: PS, profundidade de sondagem; NIC, nível de inserção clínica; Δ diferença entre valores de *baseline* e 3 meses ou *baseline* e 6 meses. Dados expressos em média e desvio padrão [média±DP]. Letras distintas representam diferença estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) na comparação das médias intragrupo (maiúsculas, na vertical – Teste ANOVA de medidas repetidas) ou intergrupo (minúsculas, na horizontal – teste ANOVA de medidas repetidas). Valores de  $p<0,05$  representam diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo dos valores de Δ (na horizontal – † Teste de Mann-Whitney; \* Teste T).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ademais, os dados da Tabela 3 demonstram que os sítios periodontais estavam distribuídos de forma bastante homogênea em termos de quantidade de bolsas e valores médios de PS e NIC na análise das bolsas com  $PS \geq 4\text{mm}$ , não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos tempos observados ( $p > 0,05$ ). Em relação às bolsas com PS inicial  $\geq 5\text{mm}$ , somente foi observada diferença significativa ( $p = 0,045$ ) na comparação entre o NIC dos grupos controle ( $6,40 \pm 0,89\text{mm}$ ) e teste ( $5,88 \pm 0,56\text{mm}$ ) no *baseline*. Em todos os outros parâmetros, não houve diferença intergrupo estatisticamente significativa em qualquer outro tempo analisados.

Na análise da Tabela 4 é possível notar que a distribuição das bolsas moderadas ( $PS = 5-6\text{mm}$ ) apresentou-se homogênea entre os grupos em relação aos parâmetros de quantidade, média de PS e média de NIC. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa intergrupo nos resultados obtidos nos acompanhamentos de 3 e 6 meses após o tratamento ( $p > 0,05$ ). Em relação às bolsas profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ), o único parâmetro que apresentou diferença significativa na avaliação intergrupo foi a média de NIC, cuja diferença observada no *baseline* (controle =  $8,54 \pm 1,15\text{mm}$ , teste =  $7,56 \pm 2,85\text{mm}$ ;  $p = 0,014$ ) foi observada também nos acompanhamentos de 3 e 6 meses ( $p = 0,024$  e  $p = 0,004$ , respectivamente), não podendo ser interpretada como resultado das diferentes abordagens terapêuticas. Já os parâmetros de quantidade e média de PS das bolsas profundas não apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Apesar da melhora em termos de redução de quantidade de bolsas, média de PS e média de NIC que foi observada em todos os estratos, não foram encontradas diferenças relevantes na comparação entre os grupos controle e teste após 3 e 6 meses da terapia periodontal não cirúrgica associada ao consumo das formulações (probiótica/placebo).

A adesão à terapia e consumo das gomas foi avaliada através do diário

de frequência e contabilização das formulações restantes que foram devolvidas pelos pacientes. No total, 4 participantes (20%) do grupo controle e 5 participantes do grupo teste (25%) realizaram o consumo de todas as 60 gomas, caracterizando adesão total de 100%. Os outros pacientes (controle, n=16; teste, n=15) consumiram entre 47 e 59 gomas, correspondendo à adesão parcial de 78 a 98% da terapia proposta. Dessa forma, a quantidade média de formulações consumidas foi de  $57,30 \pm 2,66$  no grupo controle e de  $55,30 \pm 6,15$  no grupo teste, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,671$ ). Os dados referentes à adesão a terapia e consumo realizado pelos pacientes estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Adesão e consumo das formulações pelos pacientes

<b>Consumo</b>	<b>Controle (n=20)</b>	<b>Teste (n=20)</b>	<b>p-value</b>
<b>Adesão total (100%)</b>	4 (20%)	5 (25%)	1*
<b>Adesão parcial (78-98%)</b>	16 (80%)	15 (75%)	
<b>Quantidade média consumida</b>	$57,30 \pm 2,66$	$55,30 \pm 6,15$	0,671†
<b>Porcentagem média consumida</b>	$95,50 \pm 4,43\%$	$92,17 \pm 10,25\%$	0,671†

Legenda: Dados de adesão total e parcial expressos como número de pacientes e porcentagem [N/(%)]; dados de quantidade média e porcentagem média de gomas consumidas expressos como média  $\pm$  desvio padrão [média $\pm$ DP]. Valores de  $p < 0,05$  representam diferença intergrupo estatisticamente significativa - \*Teste Exato de Fisher e †Teste U de Mann-Whitney.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além das avaliações dos parâmetros periodontais, exames orais periódicos foram realizados para verificar a ocorrência de efeitos adversos locais

decorrentes do uso das formulações. Durante todo o período de acompanhamento, não foram observadas manchas brancas ou alterações locais indicativas de efeitos adversos em nenhum dos pacientes, tanto no grupo teste quanto no grupo controle.

Em relação aos efeitos adversos sistêmicos, todos os participantes preencheram o diário de consumo e responderam aos questionários aplicados após 7 e 30 dias do debridamento periodontal e administração das formulações adjuntas. Os participantes foram instruídos a registrar todas as percepções tidas durante o período de avaliação, independentemente da certeza de ter ou não associação ao consumo das gomas. Além disso, foram orientados a anotar observações que julgassem importantes para cada dia (ex.: ocorrência de dor de cabeça após ser exposto a uma situação de muito estresse ou febre após vacinação). A tabela 6 reúne a frequência relatada em cada uma dessas avaliações.

Tabela 6 – Percepção de sintomas e efeitos adversos

<b>Avaliação</b>	<b>Controle (n=20)</b>	<b>Teste (n=20)</b>	<b><i>p-value</i></b>
<b>Diário de consumo</b>	5/20	4/20	1,000
<b>Questionário 7 dias</b>	7/20	5/20	0,731
<b>Questionário 30 dias</b>	5/20	5/20	1,000

Legenda: Dados relatados como número de pacientes que relataram efeitos adversos/número total de pacientes. Valores de  $p < 0,05$  representam diferença intergrupo estatisticamente significativa - Teste Exato de Fisher.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise dos diários de consumo, 31 participantes (77,5%; controle, n=15; teste, n=16) não registraram quaisquer anotações relacionadas à percepção

de efeitos adversos. Em contrapartida, os outros 9 pacientes (22,5%; controle, n=5; teste, n=4) escreveram anotações relacionadas à dor de cabeça, azia, diarreia, aumento de gases ou gosto estranho na boca. No entanto, 7 desses participantes indicaram causas possivelmente relacionados a esses sintomas, como por exemplo: terem passado concomitantemente por episódio de gripe, alteração na alimentação e dieta ou intolerância à lactose.

Nas avaliações dos questionários aplicados após uma semana e um mês de consumo, foram observadas respostas semelhantes (dor de cabeça, azia, diarreia, aumento de gases), além de registros de episódios pontuais de vômito, náusea, refluxo e tontura durante o período avaliado. Todavia, todas essas respostas foram acompanhadas de justificativas que indicavam relação a eventos externos e não ao consumo das formulações. Fora esses sintomas, 4 pacientes relataram ter percebido melhora da motilidade intestinal durante o período da investigação.

Apesar da subjetividade desses resultados, a comparação das respostas obtidas demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e teste em termos de percepções e sintomas registrados. Além disso, nenhum paciente precisou interromper o uso das formulações por causa de efeitos adversos. Portanto, os resultados demonstraram ausência de efeitos adversos relevantes de ordem local ou sistêmica decorrentes do uso da formulação desenvolvida.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da administração probiótica de *L. paracasei* 28.4 como terapia adjuvante ao tratamento da periodontite. Para isso, conforme delineado na metodologia, o trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira o desenvolvimento de uma formulação passível de ser utilizada na abordagem clínica, e a segunda a execução de um estudo clínico randomizado para analisar os impactos do uso dessa formulação probiótica no tratamento proposto.

Para o desenvolvimento da formulação, o hidrogel do tipo *gellan gum* foi utilizado como material carreador do micro-organismo, fundamentado nos resultados favoráveis obtidos por Ribeiro et al. (2020) quando do desenvolvimento de formulações para uso *in vitro* e em camundongos. De acordo com Wescomble et al. (2012), a forma de entrega do hidrogel é uma condição importante e que precisa ser personalizada para a indicação a que se destina. No caso do *gellan gum*, suas propriedades mecânicas podem ser alteradas através de modificações no tipo e grau de suas ligações cruzadas, além da utilização de íons catiônicos para melhorar a sua reticulação e estabilidade (Abalymov et al., 2022; Douglas et al., 2018; Lopez-Heredia et al., 2018). Sendo assim, os veículos à base de *gellan gum* podem variar entre apresentações sólidas, semi-sólidas e líquidas, conforme a necessidade.

A formulação apresentada nesse trabalho foi desenvolvida inspirada na metodologia descrita por Ribeiro et al. (2020), que apontaram o *gellan gum* como um sistema promissor de carreamento de *L. paracasei* 28.4. Todavia, as formulações testadas por Ribeiro et al. (2020), utilizadas a princípio em testes *in vitro* e em animais, não se mostraram opções viáveis para o consumo caseiro por parte dos pacientes, visto a sua maior fluidez (*gellan gum* à 0,6 a 1% p/v) e

dificuldade de fracionamento da dosagem de micro-organismos. Por esta razão, diversos experimentos foram realizados a fim de encontrar uma composição de *gellan gum* mais consistente e que permitisse mastigação e armazenamento fracionado. Além de proporcionar maior controle da quantidade de *L. paracasei* 28.4 que seria consumida pelos pacientes, era necessário que a formulação desenvolvida fosse também viável para consumo e possível de ser reproduzida durante todo o período do ensaio clínico. Após o período de avaliação de diversas concentrações e formatos, a apresentação escolhida foi a de gomas feitas a partir de *gellan gum* na concentração de 2% p/v, imersas em  $\text{CaCl}_2$  (2mM) e individualizadas em forma de silicone, conforme foi descrito na metodologia desse trabalho.

Um dos desafios encontrados nessa fase de testes foi a necessidade de criar uma formulação que apresentasse fluidez adequada para ser vertida nas formas de silicone e que, ao mesmo tempo, fosse consistente ao ponto de permitir manipulação pelos pacientes sem o risco de ser esmagada ou de perder suas propriedades. A solução encontrada foi a adaptação da metodologia original (que associava *gellan gum* e  $\text{CaCl}_2$  no mesmo frasco) para uma imersão tardia do *gellan gum* na solução de  $\text{CaCl}_2$ . Desse modo, a alteração do grau das ligações cruzadas e aumento das reticulações por meio do  $\text{CaCl}_2$  só foi estabelecida após a formulação já ter sido vertida nas formas de silicone.

Esse protocolo de imersão em  $\text{CaCl}_2$  dentro de estufa agitadora foi inspirado nos estudos de Abalymov et al. (2022) e Xioaxi et al. (2020) a fim de promover maior estabilidade e, conseqüentemente, aumentar a resistência das gomas por meio da modificação do grau de reticulações do *gellan gum*. Por consequência, a formulação apresentou consistência favorável para a mastigação, possibilidade de armazenamento individualizado e melhor controle contra possíveis contaminações ao longo do tempo. Apesar dos estudos prévios realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT-Unesp terem

demonstrado resultados favoráveis em termos de viabilidade e liberação de *L. paracasei* 28.4 incorporado em *gellan gum* (Ribeiro et al., 2020), novos testes *in vitro* foram realizados para avaliar a manutenção dessas propriedades a partir da nova formulação desenvolvida.

Em relação à padronização da suspensão de *L. paracasei* 28.4, embora não exista um nível de contagem de células exato para garantir efeitos na saúde, é possível encontrar algumas recomendações de agências reguladoras para a comercialização de produtos probióticos (Champagne et al., 2011; Reid, 2008). Pensando nisso, o número de células de *L. paracasei* 28.4 da suspensão utilizada foi ajustado para obter uma concentração de  $10^9$  células/ml, compatível com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) e da Agência Canadense de Inspeção de Alimentos (CFIA, 2009) para produtos probióticos, também condizente com a maior parte dos produtos disponíveis no mercado (entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC). Em relação à liberação de micro-organismos, os produtos comercializados não costumam apresentar estudos que comprovem qual é a concentração liberada durante o consumo. No entanto, é sabido que a concentração liberada é sempre menor do que a descrita na embalagem comercializada. De acordo com a literatura, é necessário que o produto probiótico libere uma quantidade mínima de aproximadamente  $10^6$  células viáveis/ml para ter eficácia (Champagne et al., 2011).

O processo de encapsulamento do micro-organismo em hidrogéis geralmente está associado à diminuição da viabilidade celular das cepas incorporadas (Santivarangkna et al., 2008; Yucel-Falco et al., 2017). A partir da análise de viabilidade imediata após o preparo das gomas, confirmou-se que a formulação desenvolvida foi capaz de incorporar *L. paracasei* 28.4 e manter a viabilidade das células probióticas, com recuperação de  $6 \log_{10}$  UFC/ml de *L. paracasei* 28.4 de cada amostra, o que corresponde a concentração de  $10^6$  células/ml. Esse resultado é semelhante ao relatado por Yucel-Falco et al.

(2017), que observaram redução de aproximadamente 3 log na quantidade de células viáveis probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LA5) incorporados em hidrogel (quitosana dextrano sulfato). Além de atestar a capacidade de carreamento do novo sistema, esse resultado demonstrou recuperação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 compatível com a quantidade mínima de células viáveis que um produto probiótico costuma ter para apresentar eficácia (estimado na faixa de  $10^6$  e  $10^8$  UFC/ml), conforme destacado por Champagne et al. (2011).

Depois de preparadas e acondicionadas individualmente em embalagens estéreis, as amostras foram armazenadas em geladeira seguindo aos achados de Ribeiro et al. (2020), que verificaram maior preservação da viabilidade celular quando o *gellan gum* (não-lioofilizado) foi mantido sob refrigeração (4°C). Considerando que a formulação seria posteriormente administrada aos pacientes, foram realizados testes para estimar se a proporção de recuperação celular continuaria próxima à  $10^6$  durante período de armazenamento. Como resultado, as amostras testadas revelaram recuperação de cerca de 6 log de *L. paracasei* 28.4 tanto na avaliação diária quanto na avaliação semanal. Esses resultados foram importantes para validar a aplicabilidade do armazenamento por período compatível com o tratamento proposto para a parte B do estudo (30 dias). Além disso, a estabilidade da contagem de células viáveis recuperadas durante as 7 semanas avaliadas (35 dias) foi considerada favorável para a melhor colaboração dos pacientes, visto que a quantidade total de gomas a serem consumidas poderia ser entregue de uma única vez aos participantes e estes não precisariam se deslocar até a Instituição em dias extras para buscar mais amostras da formulação.

Outra análise realizada foi a quantificação de células de *L. paracasei* 28.4 liberadas ao longo do tempo, por meio da adaptação do experimento descrito previamente na literatura com utilização de sacos de biópsia (Ribeiro et

al., 2020). O objetivo dessa avaliação foi estimar o comportamento do sistema carreador na primeira hora após o consumo da formulação. As amostras foram maceradas para simular o processo de mastigação e, em seguida, deixadas em repouso em meio líquido (PBS) por períodos de 15 minutos, até completar 1 hora. Após a avaliação de cada um dos quatro tempos, foi observada redução gradual da liberação das células de *L. paracasei* 28.4 ao longo do experimento, sugerindo que poderia ocorrer liberação gradual de *L. paracasei* 28.4 mesmo após o período imediato do consumo.

Segundo Gbassi e Vandamme (2012), quando cepas probióticas são encapsuladas é interessante garantir que elas sejam liberadas em meios que simulam fluidos biológicos. Dessa forma, o experimento anterior foi repetido com alteração do meio líquido para saliva artificial, na tentativa de obter resultados mais próximos do que aconteceria em boca. Diferentemente do observado no ensaio anterior, a liberação de *L. paracasei* 28.4 em saliva mostrou-se constante ao longo de todo o experimento, com liberação de aproximadamente 6 log UFC/ml durante os 60 minutos. Esse resultado corroborou com o estudo de Ribeiro et al. (2020), que observaram maior taxa de liberação de células viáveis quando as formulações de *gellan gum* foram expostas à saliva artificial. Possivelmente, esses achados resultaram da interação entre os componentes da saliva artificial e o *gellan gum*, sugerindo que a liberação de *L. paracasei* 28.4 poderia ser facilitada na cavidade bucal devido a presença da saliva.

Diante da conclusão da etapa laboratorial e tendo em vista a literatura disponível a respeito do uso de lactobacilos no controle de periodontopatógenos, deu-se início à segunda parte desse trabalho. O presente estudo randomizado avaliou os efeitos clínicos da administração de *L. paracasei* 28.4 no tratamento não cirúrgico de indivíduos com periodontite estágios III/IV, grau B/C generalizada. Como esse é o primeiro estudo avaliando os efeitos clínicos da

administração de *L. paracasei* 28.4 em humanos, não é possível, até o momento, encontrar informações comparativas na literatura de estudos prévios envolvendo a administração dessa cepa no tratamento de pacientes portadores de doença periodontal. Embora a falta de dados prévios limite comparações mais detalhadas, o fato deste ser o primeiro estudo sobre o tema justifica a relevância e inovação do presente estudo.

No que concerne à variável primária desse ensaio clínico, os dois grupos de tratamento demonstraram ganho estatisticamente significativo de NIC nos acompanhamentos de 3 e 6 meses. Adicionalmente, foram observadas melhoras significativas também em todos os outros parâmetros avaliados, como IG, IP e ganho de PS, indicando considerável melhora da condição periodontal em relação ao *baseline* nos dois grupos. A hipótese de que a administração de *L. paracasei* 28.4 promoveria benefícios ao tratamento periodontal, no entanto, não foi confirmada, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo teste e o grupo controle em nenhuma das avaliações realizadas. Resultados semelhantes aos observados nos parâmetros de boca toda foram observados também nas análises por estratificações das bolsas periodontais, demonstrando melhora nos parâmetros, porém sem diferença entre os grupos.

Sendo assim, as avaliações clínicas demonstraram que a formulação desenvolvida foi segura e passível de ser administrada em humanos, porém sem proporcionar benefícios adicionais dentro da prescrição estabelecida. Esses resultados discordam de estudos prévios que relataram efeitos clínicos adicionais ao tratamento periodontal associado à terapia adjunta com lactobacilos (cepas de *Lactobacillus reuteri*) (Soares et al., 2019; Teughels et al., 2013; Theodoro et al., 2019). Em contrapartida, a ausência de efeitos clínicos significativos corrobora com estudos como o de Morales et al. (2016), que demonstraram que a terapia de raspagem periodontal associada à administração oral de *L. rhamnosus* SP1 promoveu efeitos clínicos semelhantes à raspagem

periodontal isolada. Ramos et al. (2022), por exemplo, também não encontraram benefícios adicionais quando a raspagem periodontal foi associada à probioticoterapia com *L. reuteri*.

Apesar de não ter sido observado efeito adicional à terapia mecânica, os resultados aqui apresentados não são suficientes para excluir a possibilidade do uso adjunto de *L. paracasei* 28.4 ser favorável para o tratamento periodontal. De acordo com a literatura, existe uma grande heterogeneidade entre os regimes de dosagem, frequência de uso e duração de tratamento relatados nos estudos envolvendo probióticos e tratamento periodontal (Dhingra, 2012; Teughels et al., 2011). Além disso, em relação à administração para controle de infecções bucais, existe ainda a necessidade de formulações específicas que promovam um sistema de liberação celular com tempos de retenção e exposição adequados para que as bactérias possam colonizar e influenciar a microbiota residente (Devine et al., 2015; Wescombe et al., 2012). Essas variações dificultam o estabelecimento de protocolos de uso dos produtos probióticos, de forma que pesquisas futuras considerando alterações de dosagem, frequência de uso ou até mesmo do veículo de administração de *L. paracasei* 28.4 são necessárias para ratificar os efeitos dessa cepa no tratamento da periodontite.

Em relação ao desenho do estudo, foi desenvolvido um ensaio clínico placebo-controlado, pautado no conhecimento de que a utilização do placebo é uma ferramenta essencial em pesquisas clínicas envolvendo tratamentos experimentais, por reduzir os efeitos contextuais e psicológicos de cura e assim isolar os efeitos específicos da abordagem terapêutica avaliada (Bishop et al., 2012). Outrossim, por se tratar de um produto experimental, resultante da combinação de um hidrogel e bactérias probióticas, o uso do placebo foi fundamental para avaliar se o *gellan gum* isoladamente seria responsável por provocar algum efeito colateral.

Nesse sentido, as investigações não demonstraram diferenças

significativas entre as percepções dos pacientes do grupo teste e do grupo controle relatadas no diário de consumo e nos questionários aplicados. Visto que a formulação tinha caráter experimental, a ausência de efeitos adversos sistêmicos significativos foi bastante favorável, demonstrando que ela foi segura para uso humano, podendo ser empregada novamente em pesquisas futuras. Além disso, a incidência de sintomas relatados (22,5%) foi menor do que a encontrada por Navarro-Rodriguez et al. (2013) no estudo que inspirou o questionário utilizado. Outro ponto observado nesse monitoramento foi a subjetividade da percepção dos pacientes e dificuldade em excluir vieses e outras condições que poderiam ser confundidas com efeitos adversos. Um exemplo disso foi o número de pacientes que relataram ter percebido algum sintoma ter sido maior no grupo controle do que no grupo teste. Contudo, apesar dessa limitação, a função principal de monitoramento dos pacientes foi cumprida e nenhum participante precisou interromper o consumo das formulações em decorrência de efeitos adversos sistêmicos, o que é considerado um fator de sucesso em relação à administração da formulação.

Embora o foco da investigação estivesse voltado para os efeitos no periodonto, a modificação da microbiota oral poderia gerar repercussão também em outros tecidos. Por esse motivo, os pacientes foram submetidos a exames periódicos da cavidade oral em busca de sinais de desequilíbrio da microbiota. Sabe-se que as espécies de lactobacilos se destacam pela capacidade de produzir ácido lático, substância bastante relacionada ao processo de desmineralização dos tecidos dentários e desenvolvimento da cárie (Tannock, 2004). Por isso, alguns autores sugerem que o consumo diário de lactobacilos probióticos é capaz de gerar a um risco potencial à saúde bucal (Teughels et al., 2008). Ademais, o veículo pelo qual os probióticos são ingeridos ou liberados na cavidade oral podem influenciar o seu potencial cariogênico (Teughels et al., 2008). Felizmente, essa teoria não foi validada durante os acompanhamentos dos

pacientes, de forma que não foram encontradas manchas brancas ou sinais sugestivos de aumento da atividade cariogênica. Além disso, o consumo das formulações também não foi relacionado a qualquer outro tipo de reação ou efeito adverso local, independente do grupo.

Nesse sentido, mesmo não tendo demonstrado efeito adjunto considerável no controle da doença periodontal, o desenvolvimento e administração dessa formulação apresentaram resultados pertinentes. Até onde temos conhecimento, esse é o primeiro estudo avaliando o efeito da cepa *L. paracasei* 28.4 em humanos e no periodonto. Além disso, esse trabalho corrobora com a estratégia indicada por Wescombe et al. (2012) de priorizar micro-organismos isolados de seu habitat oral natural – e não derivados do intestino – para manter ou promover melhorias na saúde bucal, trazendo informações relevantes para investigações futuras. Isso porque, segundo a literatura, as bactérias comumente comercializadas para esse fim não apresentam permanência na cavidade oral e, portanto, os benefícios associados a cavidade oral parecem transitórios e atribuíveis somente a modulação da resposta imune (Hansei, 1994; Stamatova, Meurman, 2009). Para ser indicado pela sua atividade probiótica, é fundamental que o lactobacilo sobreviva às condições ambientais e aos mecanismos de defesa, sem oferecer riscos ao hospedeiro. Para tal, é necessário um tempo de contato adequado com os tecidos do hospedeiro que permita a fixação e colonização da cepa. Logo, a utilização de um probiótico oral nesse trabalho teve como intenção promover colonização por maior tempo na cavidade bucal.

Seguindo essa perspectiva, análises microbiológicas e imunológicas de sítios submetidos ao tratamento devem ser realizadas para investigar a presença de *L. paracasei* 28.4 e colonização desse micro-organismo durante e após o período de administração da terapia probiótica. A partir dos resultados observados nesse estudo, uma nova hipótese pode ser apontada: Será que uma

única cepa é capaz de gerar efeitos benéficos em uma doença tão completa como a periodontite? Será que seria o caso de apostar em formulações probióticas multiespécies? Para investigar esses aspectos amostras de material micro e imunológico foram coletadas de todos os participantes durante a execução desse ensaio clínico e, assim, espera-se que os resultados dessas análises possam contribuir futuramente para elucidar essa questão.

Diante do exposto, algumas considerações sobre esse estudo precisam ser pontuadas: apesar de não ter demonstrado benefícios quando usada no tratamento da periodontite generalizada (estágios III/IV e graus B/C), a proposta de desenvolver uma formulação adaptada para a prática clínica foi cumprida com sucesso. Além disso, o material utilizado apresentou segurança para uso, sem promoção de efeitos adversos significativos de ordem local ou sistêmica, assegurando a possibilidade de repetição dessa metodologia para outras investigações de controle de infecção bucal. Conforme mencionado, novos estudos são necessários para avaliar diferentes prescrições de consumo dessa e de outras formulações carreadoras de *L. paracasei* 28.4, de modo que dispositivos de liberação lenta podem ser úteis para favorecer a permanência dos micro-organismos na cavidade oral. Ademais, avaliações microbiológicas e imunológicas de fluidos gengivais e saliva dos pacientes tratados se fazem necessárias para entender os efeitos dessa formulação. Por fim, estudos envolvendo a administração de *L. paracasei* 28.4 em populações com diferentes diagnósticos periodontais (ex.: saúde, gengivite e periodontite de estágios e graus mais brandos) devem ser considerados para compreender as diferentes respostas à terapia adjunta administrada.

## 6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo, a formulação probiótica proposta foi desenvolvida com sucesso, sendo possível de ser usada na prática clínica e armazenada pelos pacientes, sem apresentar associação a efeitos adversos significativos locais ou sistêmicos. Clinicamente, a administração dessa formulação como terapia adjuvante ao tratamento periodontal não promoveu efeitos adicionais em pacientes com Periodontite Generalizada Estágios III e IV e Graus B e C. Análises microbiológicas e imunológicas são necessárias para investigar os efeitos da terapia probiótica na microbiota periodontal e na modulação da resposta imune do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS\*

Abalymov A, Lengert E, Van der Meeren L, Saveleva M, Ivanova A, Douglas TEL, et al. The influence of Ca/Mg ratio on autogelation of hydrogel biomaterials with bioceramic compounds. *Biomater Adv.* 2022;133:112632. doi: 10.1016/j.msec.2021.112632. PMID: 35034815.

Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent.* 2014;9(2):251-67. PMID: 24765632.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229–35. PMID: 1058834.

Araujo CF, Andere NMRB, Castro Dos Santos NC, Mathias-Santamaria IF, Reis AA, de Oliveira LD, et al. Two different antibiotic protocols as adjuncts to one-stage full-mouth ultrasonic debridement to treat generalized aggressive periodontitis: A pilot randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2019. doi: 10.1002/JPER.18-0399. PMID: 31257591.

Ardila CM, Granada MI, Guzman IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2010;45(4):557–63. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01274.x. PMID: 20546113.

de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, Fugisaki LR de O, Fuchs BB, Mylonakis E, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog.* 2018;117:80–7. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.019. PMID: 29432910.

Bechara Andere NMR, dos Santos NCC, Araujo CF, Mathias IF, Rossato A, de Marco AC, et al. Evaluation of the local effect of nonsurgical periodontal treatment with and without systemic antibiotic and photodynamic therapy in generalized aggressive periodontitis. A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:115–20. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.09.002.

Bishop FL, Jacobson EE, Shaw JR, Kaptchuk TJ. Scientific tools, fake treatments, or triggers for psychological healing: how clinical trial participants conceptualise placebos. *Soc Sci Med.* 2012;74(5):767-74. doi: 10.1016/j.socscimed.2011.11.020. PMID: 22285289.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*. 2011;476(7361):393–4. doi: 10.1038/476393a. PMID: 21866137.
- Broekaert IJ, Walker WA. Probiotics and chronic disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):270–4. doi: 10.1097/00004836-200603000-00021.
- Casarin RC V, Peloso Ribeiro E Del, Sallum EA, Nociti FHJ, Goncalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. *J Periodontol*. 2012;83(8):988–98. doi: 10.1902/jop.2012.110513. PMID: 22288485.
- Castro dos Santos NC, Andere NMRB, Araujo CF, Marco AC, Kantarci A, Van Dyke TE, et al. Omega-3 PUFA and aspirin as adjuncts to periodontal debridement in patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus: Randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2020. doi: 10.1002/jper.19-0613. PMID: 32103495.
- Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol*. 2011;149(3):185-93. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005. PMID: 21803436.
- Chan A, Tetzlaff JM, Altman DG, Laupacis A, Gøtzsche PC, Krleža-Jerić K, et al. SPIRIT 2013 Statement: Defining standard protocol items for clinical trials. *Ann Intern Med*. 2013;158:200-7. doi:10.7326/0003-4819-158-3-201302050-00583. PMID: 23295957.
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Clin. Periodontol*. 2018. Jun; Suppl 20:S68–S77 . doi: 10.1111/jcpe.12940. PMID: 29926499.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol*. 2014;117(2):518–27. doi: 10.1111/jam.12544. PMID: 24836638.

- Coutinho DF, Sant S V., Shin H, Oliveira JT, Gomes ME, Neves NM, et al. Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. *Biomaterials*. 2010;31(29):7494–502. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.06.035. PMID: 20663552.
- D'Arrigo G, Navarro G, Di Meo C, Matricardi P, Torchilin V. Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: A multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87(1):208–16. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.11.001.
- Dhingra K. Methodological issues in randomized trials assessing probiotics for periodontal treatment. *J. Periodontal Res*. 2012;47(1):15-26. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01399.x. PMID: 21777405.
- Douglas TEL, Schietse J, Zima A, Gorodzha S, Parakhonskiy BV, KhaleNkow D, et al. Novel self-gelling injectable hydrogel/alpha-tricalcium phosphate composites for bone regeneration: Physiochemical and microcomputer tomographical characterization. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(3):822-8. doi: 10.1002/jbm.a.36277. PMID: 29057619.
- Feres M, Retamal-Valdes B, Faveri M, Duarte P, Shibli J, Soares GMS, et al. Proposal of a clinical endpoint for periodontal trials: the treat-to-target approach. *J Int Acad Periodontol*. 2020;22(2):41–53. PMID: 32224549.
- Gatej SM, Marino V, Bright R, Fitzsimmons TR, Gully N, Zilm P, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents alveolar bone loss in a mouse model of experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(2):204-212. doi:10.1111/jcpe.12838.
- Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149-63. doi: 10.3390/pharmaceutics4010149. PMID: 24300185.
- Gupta S. Intention-to-treat concept: A review. *Perspect Clin Res*. 2011;2(3):109. doi: 10.4103/2229-3485.83221.
- Hansen JN. Nisin as a model food preservative. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1994;34(1):69-93. doi:10.1080/10408399409527650.
- Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: Evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14(5):326–30. doi: 10.1034/j.1399-302X.1999.140510.x.

Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC Oral Health*. 2010;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18. PMID: 20598145.

Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathog*. 2013;5(1):27. doi: 10.1186/1757-4749-5-27. PMID: 24063519.

Huang J, Zhu S, Li C, Zhang C, Ji Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* using corn steep liquor. *Prep Biochem Biotechnol*. 2020;50(2):191-7. doi:10.1080/10826068.2019.1692215.

Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76 Suppl 1:2168–74. doi: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2168. PMID: 29539044.

Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045–53. doi: 10.1177/0022034514552491. PMID: 25261053.

Keestra JAJ, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol Res*. 2015;50(6):689–706. doi: 10.1111/jre.12252. PMID: 25522248.

Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(6):354-361. doi:10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x

Kuru BE, Laleman I, Yalınzoğlu T, Kuru L, Teughels W. The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial . *J Periodontol*. 2017;88(11):1115–23. doi: 10.1902/jop.2017.170213.

Laleman I, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. A dual-strain *Lactobacilli reuteri* probiotic improves the treatment of residual pockets: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2020;47(1):43–53. doi: 10.1111/jcpe.13198.

Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol.* 2018;89:S9–16. doi: 10.1002/JPER.16-0517. PMID: 29926938.

Lin CC, Anseth KS. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res.* 2009;26(3):631-43. doi:10.1007/s11095-008-9801-2.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man: Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986;13(5):431–40. doi: 10.1111/j.1600-051X.1986.tb01487.x. PMID: 3487557.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963;21(6):533–51. doi: 10.3109/00016356309011240. PMID: 14121956.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36(3):177–87. doi: 10.1902/jop.1965.36.3.177. PMID: 14296927.

Lopez-Heredia MA, Łapa A, Reczyńska K, Pietryga K, Balcaen L, Mendes AC, et al. Mineralization of gellan gum hydrogels with calcium and magnesium carbonates by alternate soaking in solutions of calcium/magnesium and carbonate ion solutions. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(8):1825-34. doi: 10.1002/term.2675. PMID: 29701014.

Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(6):506–13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01392.x.

Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: Contributions to oral health. *Oral Dis.* 2007;13(5):443–51. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x.

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, et al. CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ.* 2010;340. doi: 10.1136/bmj.c869. PMID: 20332511.

Morales A, Carvajal P, Silva N, Hernandez M, Godoy C, Rodriguez G, et al. Clinical effects of *Lactobacillus rhamnosus* in non-surgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled trial with 1-year follow-up. *J Periodontol*. 2016;87(8):944-52. doi:10.1902/jop.2016.150665.

Mundula T, Ricci F, Barbeta B, Baccini M, Amedei A. Effect of probiotics on oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2019;11(10). doi: 10.3390/nu11102449. PMID: 26944407.

Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89:S17–27. doi: 10.1002/JPER.17-0095.

Muthukumar T, Song JE, Khang G. Biological role of gellan gum in improving scaffold drug delivery, cell adhesion properties for tissue engineering applications. *Molecules*. 2019;24(24):4514. doi:10.3390/molecules24244514.

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*. 2001;35(6):412–20. doi: 10.1159/000047484. PMID: 11799281.

Navarro-Rodriguez T, Silva FM, Barbuti RC, Mattar R, Moraes-Filho JP, de Oliveira MN, et al. Association of a probiotic to a *Helicobacter pylori* eradication regimen does not increase efficacy or decreases the adverse effects of the treatment: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Gastroenterol*. 2013;13(1). doi: 10.1186/1471-230X-13-56. PMID: 23530767.

Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol*. 2004;95(2):219–23. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.006.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: Summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14(1):216–48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00199.x. PMID: 9567973.

Pangsomboon K, Kaewnopparat S, Pitakpornpreecha T, Srichana T. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. 2006;51(9):784-793. doi:10.1016/j.archoralbio.2006.03.008

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45 Suppl 2:S162–70. doi: 10.1111/jcpe.12946. PMID: 29926490.

Rabelo CC, Feres M, Goncalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Tu Y-K, et al. Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(7):647–57. doi: 10.1111/jcpe.12427. PMID: 26087839.

Ramos TCS, Boas MLV, Nunes CMM, Ferreira CL, Pannuti CM, Santamaria MP, et al. Effect of systemic antibiotic and probiotic therapies as adjuvant treatments of subgingival instrumentation for periodontitis: a randomized controlled clinical study. *J Appl Oral Sci*. 2022;30:e20210583. doi: 10.1590/1678-7757-2021-0583. PMID: 35319669.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol*. 2014;85(1):160–9. doi: 10.1902/jop.2013.130142. PMID: 23688097.

Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1182–91. doi: 10.1111/jcpe.12782.

Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):658–72. doi: 10.1128/cmr.16.4.658-672.2003. PMID: 14557292.

Reid G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. *Int. Dairy J*. 2008;18(10-11):969-75.

Ribeiro F de C, Junqueira JC, dos Santos JD, de Barros PP, Rossoni RD, Shukla S, et al. Development of probiotic formulations for oral candidiasis prevention: Gellan Gum as a Carrier to Deliver *Lactobacillus paracasei* 28.4. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(6). doi: 10.1128/AAC.02323-19. PMID: 32253208.

- Rossoni RD, Velloso MDS, de Barros PP, de Alvarenga JA, Santos JD Dos, Santos Prado ACC Dos, et al. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microb Pathog*. 2018;123:361–7. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.032. PMID: 30053602.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol*. 2008;105(1):1-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x. PMID: 18266696.
- Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Ånerud Å, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis: I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30(10):887–901. doi: 10.1034/j.1600-051X.2003.00414.x.
- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):897-905. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01306.x
- Shukla S, Shukla A. Tunable antibiotic delivery from gellan hydrogels. *J Mater Chem B*. 2018;6(40):6444–58. doi: 10.1039/C8TB00980E. PMID: 32254652.
- Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964;22(1):121–35. doi: 10.3109/00016356408993968. PMID: 14158464.
- Slawik S, Staufenbiel I, Schilke R, Nicksch S, Weinspach K, Stiesch M, et al. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(7):857–63. doi: 10.1038/ejcn.2011.45. PMID: 21448219.
- Soares LG, Carvalho EB, Tinoco EMB. Clinical effect of *Lactobacillus* on the treatment of severe periodontitis and halitosis: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2019;32(1):9-13.
- Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol*. 2001;90(2):172-179. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01229.x

Stamatova I, Meurman JH. Probiotics and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2009;51:141–51. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00305.x. PMID: 19878473.

Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3189-94. doi: 10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004. PMID: 15184111; PMCID: PMC427720.

Teanpaisan R, Piwat S, Dahlén G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53(4):452-9. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03132.x. PMID: 21801186.

Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(11):1025–35. doi: 10.1111/jcpe.12155. PMID: 24164569.

Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011;38(Suppl. 11):159-77. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01665.x. PMID: 21323712.

Teughels W, Newman MG, Coucke W, Haffajee AD, Van Der Mei HC, Haake SK, et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. *J Dent Res*. 2007;86(11):1078–82. doi: 10.1177/154405910708601111. PMID: 17959900.

Theodoro LH, Cláudio MM, Nuernberg MAA, Miessi DMJ, Batista JA, Duque C, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri* as an adjunct to the treatment of periodontitis in smokers: randomised clinical trial. *Benef Microbes*. 2019;10(4):375-84. doi:10.3920/BM2018.0150

Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, van der Velden U, Armitage G, et al. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2015;42 Suppl 1:S5-11. doi: 10.1111/jcpe.12368. PMID: 25639948.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018a;45:S149–61. doi: 10.1111/jcpe.12945.

Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(1):S46–73. doi: 10.1002/JPER.17-0576. PMID: 29926936.

Wennstrom JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E. Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):851–9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00776.x. PMID: 15998268.

Yli-Knuutila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(2):129–31. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00258.x.

Yucel Falco C, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated  $\beta$ -glucan. *J Colloid Interface Sci.* 2017; 1;487:97-106. doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.019. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27756004.

Zhu L, Ao J, Li P. A novel in situ gel base of deacetylase gellan gum for sustained ophthalmic drug delivery of ketotifen: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3943. doi: 10.2147/DDDT.S87368.

## APÊNDICE A – Instruções de consumo e armazenamento das formulações



---

### DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA

Para:

#### USO INTERNO - VIA ORAL

#### • FORMULAÇÃO (PROBIÓTICA OU PLACEBO)

##### **Instruções de consumo:**

1. Mastigue 1 goma, 2 vezes ao dia (uma de manhã e uma à noite, com intervalos de  $\pm 12/12$  h) durante 30 dias.
2. A goma deverá ser mastigada por pelo menos 1 minuto antes de engolir.
3. O consumo deverá ser feito após já ter realizado as refeições e higiene bucal adequada.
4. Não consuma alimentos ou bebidas (incluindo água) por pelo menos 1 hora após o consumo das gomas.
5. Não enxague o local após o uso.
6. Por favor, preencha o questionário todos os dias.

##### **Instruções de armazenamento:**

1. Armazenar as gomas em geladeira.
2. Abrir a embalagens somente no momento do uso.
3. Tomar cuidado para que não haja contaminação das gomas. Caso perceba qualquer alteração durante o armazenamento, entre em contato.

##### **Observação:**

1. Evitar o consumo de alimentos/suplementos probióticos e fármacos anti-inflamatórios e antibióticos durante o período da pesquisa.
2. Por gentileza, nos comunique se fizer uso dessas medicações.

Em caso de dúvidas ou se sentir algum desconforto, entre em contato conosco pelos números (00)000000-0000 ou (12) 3947-9000.

## APÊNDICE B - Diário de frequência de consumo e efeitos adversos

### DIÁRIO DE CONSUMO E EFEITOS ADVERSOS

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

#### Instruções:

1. Esse questionário irá nos ajudar a monitorar a frequência de consumo das "gomas" e percepção de possíveis efeitos adversos. Por favor responda esse questionário todos os dias, com bastante atenção às perguntas e com sinceridade, independente de qual for a resposta.
2. Essa avaliação é muito importante para nós, por isso guarde com cuidado esse questionário e tome cuidado para não rasgar, molhar, sujar ou perder essa folha.
3. Em caso de dúvidas ou se sentir algum desconforto contínuo, entre em contato com o pesquisador responsável pelos números (11) 3347-6347 ou (12) 3947-9000.

DIA	DATA	Consumiu a goma no período da:		Sentiu efeitos adversos? Quais?
		Manhã?	Noite?	
1	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
2	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
3	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
4	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
5	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
6	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
7	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
8	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
9	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
10	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
11	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
12	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
13	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
14	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
15	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
16	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
17	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
18	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
19	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
20	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
20	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
21	/ /	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não

## APÊNDICE C - Questionário de avaliação dos efeitos adversos

### QUESTIONÁRIO EFEITOS ADVERSOS

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Esse questionário irá nos ajudar a avaliar a ocorrência de efeitos adversos relacionados ao uso das gomas. Por favor responda atentamente e com sinceridade, independente de qual for a resposta.




#### Instruções:

1. Faça um X correspondente em cada linha, de acordo com a percepção que você teve considerando os últimos \_\_\_\_\_ dias.
2. Considere o sintoma como:
  - Ausente: Se você não percebeu o sintoma
  - Leve: Se você percebeu, mas o sintoma não interferiu nas suas atividades do dia a dia.
  - Moderado: O sintoma interferiu pouco nas suas atividades do dia a dia (menos que 50%).
  - Severo: O sintoma interferiu bastante nas suas atividades do dia a dia (>50%).

Sintoma	Ausente	Leve	Moderado	Severo
Azia				
Queimação no estômago				
Regurgitação/refluxo				
Náusea/enjoo				
Vômito				
Diarreia				
Dor abdominal				
Gosto estranho na boca				
Flatulência/gases				
Dor de cabeça				
Tontura				
Outro				

Outro(s): \_\_\_\_\_

## ANEXO A – Certificado de aprovação Comitê de Ética

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA							
<p>Título da Pesquisa: Administração de Lactobacillus paracasei 28.4 como terapia adjuvante no tratamento da periodontite.            Pesquisador Responsável: LAIS FERNANDA FERREIRA FERRAZ            Área Temática:            Versão: 3            CAAE: 35900620.6.0000.0077            Submetido em: 13/07/2021            Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP            Situação da Versão do Projeto: Aprovado            Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável            Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>							
							
						 PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1791829 Comprovante de Recepção:	
+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA							
- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO							
Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
E1	LAIS FERNANDA FERREIRA FERRAZ	3	13/07/2021	16/08/2021	Aprovado	Sim	   
PO	LAIS FERNANDA FERREIRA FERRAZ	2	29/08/2020	13/09/2020	Aprovado	Não	