

Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica

Funosas ER, Martínez AB, Pignolo M, Maestri L, Aromando RF, Scozzarro SM, Escovich L, Hermida PS

RESUMEN

El té verde ha mostrado un amplio rango de efectos fisiológicos y farmacológicos. En los últimos años se han llevado a cabo estudios sistemáticos principalmente por investigadores japoneses en los cuales se evidenciaron las acciones antimicrobianas útiles y variadas que poseen los extractos de té. El objetivo de este trabajo fue determinar, mediante el uso de registros cuantificables, la efectividad clínica y microbiológica del té verde en el tratamiento de las periodontitis crónicas. Fueron evaluados 50 pacientes de ambos sexos, con diagnóstico de periodontitis crónica y con un mínimo de tres bolsas periodontales por cuadrante con profundidad de sondaje ≥ 5 mm y pérdida de inserción ≥ 2 mm por proximal, que concurren a la Cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Las variables clínicas consideradas fueron Índice Gingival (Loe y Silness, 1963), Sangrado al Sondaje (Val del Verden, 1979), Profundidad de sondaje con sonda milimetrada tipo Marquis y Nivel de inserción epitelial vertical. Para determinar la eficacia microbiológica del tratamiento se extrajeron muestras de placa subgingival con conos de papel estéril del fondo de las bolsas periodontales. Se sembró en medio de Agar Schlaeder – sangre enriquecido con 1% de hemina y vitamina K en atmósfera anaeróbica a 37°C durante 5 días. La tipificación fue realizada con el método comercial semi-automatizado Api 20 A Biomerieux – France. El uso de extracto de té verde asociado a la terapia periodontal mecánica ha sido sensiblemente eficaz en la reversión de estas variables en el tratamiento de la periodontitis crónica, si bien su uso asociado o no al raspaje y alisamiento radicular no mostró diferencias significativas respecto del raspaje y alisamiento como monoterapia para el control de la flora anaeróbica en esta patología.

Palabras clave: té verde – periodontitis crónica- terapia periodontal

ABSTRACT

Green tea has been shown to have a wide range of physiological and pharmacological effects. In recent years, systematic studies performed mainly by Japanese researchers have evidenced the wide range of very useful antimicrobial properties of tea extracts. The aim of the present study was to quantitatively evaluate the clinical and microbiological efficacy of green tea in the treatment of chronic periodontitis. Fifty male and female patients who attended the Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, National University of Rosario, Argentina, and had been diagnosed with chronic periodontitis were included in the study. The selected patients had at least 3 periodontal pockets per quadrant, depth on probing ≥ 5 mm and proximal attachment loss ≥ 2 mm. The clinical endpoints assessed were Gingival Index (Loe y Silness, 1963), Bleeding on Probing (Val del Verden, 1979), Depth on Probing with a Marquis type probe and Level of Vertical Epithelial Attachment. Samples of subgingival plaque were obtained with sterile paper cones from the bottom of the periodontal pockets to evaluate microbiological efficacy. The samples were seeded in Agar Schlaeder medium – blood enriched with 1% hemine and vitamin K in anaerobiosis at 37°C for 5 days. Typification was performed employing the commercial semi-automatic method Api 20 A Biomerieux – France. The use of green tea extract coupled to mechanical periodontal therapy for chronic periodontitis was efficient in controlling these variables. However, when it was used coupled to root scaling and planing it did not significantly improve the control of anaerobic flora as compared to scaling and planing used alone.

Key words: Green tea – Chronic periodontitis – Periodontal therapy

Aceptado para publicación: Octubre 2004.

* Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Funosas ER, Martínez AB, Pignolo M, Maestri L, Aromando RF, Scozzarro SM, Escovich L, Hermida PS. Efectividad del té verde en el tratamiento de periodontitis crónica. *Av. Odontoestomatol* 2005; 21-3:159-166.

INTRODUCCIÓN

El té consiste en las hojas y brotes foliáceos preparados de *Camellia sinensis*, arbusto de hojas alternas persistentes. El té verde se prepara en la China y en el Japón por secado rápido de las hojas recién cosechadas, que se calientan ligeramente en bandejas de cobre. Muchas veces, las hojas se enrollan en la palma de la mano a medida que se secan. El té negro se prepara en Sri Lanka y en la India apilando las hojas frescas hasta que empiezan a fermentar, y luego se secan rápidamente con calor artificial y por medios mecánicos. Se presenta en masas más o menos arrugadas, de color verde intenso o verde negruzco, olor agradable y aromático y sabor placentero, astringente y amargo.

El té ha mostrado un amplio rango de efectos fisiológicos y farmacológicos. Dentro de las acciones no microbiológicas se pueden mencionar: la disminución del catabolismo de las catecolaminas, el efecto antiinflamatorio uniéndose a la efectividad del ácido ascórbico (1,2), el de actuar como antioxidante inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina, la acción hipocolesterolemica, la inhibición el crecimiento de células malignas implantadas (3) y su potencial utilidad en la prevención del cáncer por su acción inhibitoria sobre la carcinogénesis (4). Con respecto a las acciones antimicrobianas uno de los datos más tempranos fue dado por un cirujano dentro del ejército que recomendaba el uso del té en el agua de las cantimploras de los soldados como profiláctico contra la fiebre tifoidea (5). En los últimos años se han llevado a cabo estudios sistemáticos principalmente por investigadores japoneses en los cuales se ha demostrado las acciones antimicrobianas útiles y variadas que poseen los extractos de té.

Toda et al (6-9) encontraron que los extractos de té eran capaces de inhibir y matar cepas de *Staphylococcus aureus*, *epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cholerae*. El mismo grupo en investigaciones posteriores determinó que las concentraciones contenidas en una taza de té eran capaces de inhibir el *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. Los trabajos más importantes para nuestra área fueron los realizados por Tsunoda et al (10) que encontraron una importante actividad inhibitoria sobre los *Streptococcus* cariogénicos que incluyen al *Streptococcus mutans*. Abu et al (11) determinaron la actividad del té contra especies de *Clostridium* y de *Pseudomonas*. Así mismo, Okubo et al (12) concluyeron que la *Candida albicans* no era sensible a la acción inhibitoria del té. Los extractos de té además, son capaces de prevenir las infecciones por rotavirus y enterovirus (13) lo cual no se debería a una acción antiviral directa sino a una adsorción del virus.

Estudios recientes sobre los efectos de polifenoles de té verde (catequinas) sobre caries dental mostraron que los polifenoles disminuyen el riesgo de caries *in vitro* (14,15) e *in vivo* (16,17).

Las enfermedades periodontales producen lesiones inflamatorias y destructivas en los tejidos de inserción. Estas enfermedades son respuesta a las bacterias subgingivales del biofilm. La *Porphyromonas gingivalis* ha sido frecuentemente aislada de bolsas periodontales en pacientes con periodontitis crónica avanzada (18) y tiene varios factores patogénicos tales como proteasas asociadas a membrana, compuestos celulares inmunoactivos y productos metabólicos finales citotóxicos (19,20) (ácido butírico, propiónico y fenilacético entre otros) que penetran

fácilmente en los tejidos periodontales debido a su bajo peso molecular. Varios trabajos demostraron que los polifenoles del té inhiben la actividad de la colagenasa, el crecimiento y la adherencia celular de *P. gingivalis*, conocidos como los factores de virulencia de la enfermedad periodontal (21-23).

OBJETIVOS

- Determinar, mediante el uso de registros cuantificables, la efectividad clínica del té verde en el tratamiento de las periodontitis crónicas.
- Determinar la eficacia del tratamiento en la microbiología clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental que evaluó 50 pacientes de ambos sexos, con diagnóstico de periodontitis crónica y con un mínimo de tres bolsas periodontales por cuadrante con profundidad de sondaje ≥ 5 mm y pérdida de inserción ≥ 2 mm por proximal, que concurren a la Cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Se registraron las siguientes variables clínicas: Índice Gingival (Loe y Silness, 1963), Sangrado al Sondaje (Val del Verden, 1979), Profundidad de sondaje con sonda milimetrada tipo Marquis y Nivel de inserción epitelial vertical desde el límite amelo-cementario. Los pacientes fueron llevados al Estado Basal mediante técnica de higiene bucal y luego tratados de acuerdo al siguiente protocolo por cuadrantes, numerados del 1 al 4 en el sentido de las agujas del reloj:

Cuadrante 1: Raspaje y alisamiento radicular (RyA)

Cuadrante 2: Gel de té verde

Cuadrante 3: RyA + Gel de té verde

Cuadrante 4: RyA + placebo

Para la utilización subgingival, se vehiculizó el té en forma de gel (carboximetilcelulosa 1.5g, extracto de té verde 1g, agua destilada c.s.p. 100 ml) a una con-

centración del 1%. El placebo utilizado fue carboximetilcelulosa 1,5g y agua destilada c.s.p. 100 ml. Ambos fueron aplicados por los investigadores por medio de jeringas con agujas de punta roma.

Para determinar la eficacia microbiológica del tratamiento se extrajeron muestras de placa subgingival con conos de papel estéril del fondo de las bolsas periodontales. Se sembró en medio de Agar Schlaeder – sangre enriquecido con 1% de hemina y vitamina K en atmósfera anaeróbica a 37°C durante 5 días. La tipificación fue realizada con el método comercial semi-automatizado Api 20 A Biomerieux – France.

El tratamiento periodontal de los cuatro cuadrantes fue realizado en una sola sesión por investigadores previamente entrenados para estandarizar el tratamiento. Los intervalos de evaluación clínica y microbiológica se realizaron al momento del Estado Basal y a los 30 días por un examinador entrenado que desconocía el protocolo de tratamiento. Los pacientes que recibieron antimicrobianos sistémicos y/o locales, desde 60 días previos al Estado Basal o durante la vigencia del estudio fueron excluidos del presente trabajo.

El estudio fue realizado obteniendo el consentimiento escrito de los pacientes para participar del mismo y adecuado a las normas del Comité de Bioética de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

El valor de la p se fijó con un error menor a 0.05. Para comprobar la significación estadística de las variables clínicas se utilizó el test de diferencia de media para muestras pareadas y para las variables microbiológicas ANOVA.

RESULTADOS

De los 50 pacientes que ingresaron al estudio, 34 (68%) fueron mujeres y 16 (32%) hombres (Tabla 1). Al analizar las variables clínicas, el índice gingival para el cuadrante 1 redujo de 1.78 ± 0.43 a 0.87 ± 0.07 , para el cuadrante 2 de 1.78 ± 0.55 a 1.63 ± 0.45 , para el cuadrante 3 de 1.85 ± 0.33 a 0.75 ± 0.04 , para el cuadrante 4 de 1.67 ± 0.41 a

TABLA 1.- DISTRIBUCIÓN DEL GRUPO SEGÚN SEXO

	<i>Frec. Absoluta</i>	<i>Frec. Relativa</i>	<i>Frec. Proporcional</i>
Mujeres	34	0.68	68
Hombres	16	0.32	32
Total	50	1	100

0.97±0.05 (Gráfico 1). El índice de hemorragia para el cuadrante 1 mostró una variación de 0.58±0.28 a 0.26±0.12, para el cuadrante 2 de 0.54±0.33 a 0.47±0.28, para el cuadrante 3 de 0.61±0.22 a 0.15±0.10, para el cuadrante 4 de 0.52±0.34 a 0.27±0.19 (Gráfico 2). La profundidad de sondaje para el cuadrante 1 mostró una variación de 5.76±0.76 a 4.20±0.97, para el cuadrante 2 de 5.76±0.87 a 5.71±0.88, para el cuadrante 3 de 5.43±0.69 a 3.59±0.87 y para el cuadrante 4 de 5.35±0.55 a 4.06±0.61 (Gráfico 3). La pérdida de inserción para el cuadrante 1 varió de 2.99±1.25 a 2.91±1.20, para el cuadrante 2 de 2.89±0.62 a 2.87±0.61, para el cuadrante 3 de 2.51±0.76 a 2.05±0.93 y para el cuadrante 4 de 3.11±1.12 a 3.06±1.11 (Gráfico 4). Al considerar las variables microbiológicas, pudieron aislarse *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp*, *Bacteroides spp*, *Propionibacterium ssp* y *Actinomyces spp*, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para los distintos cuadrantes de tratamiento (Tabla 2).

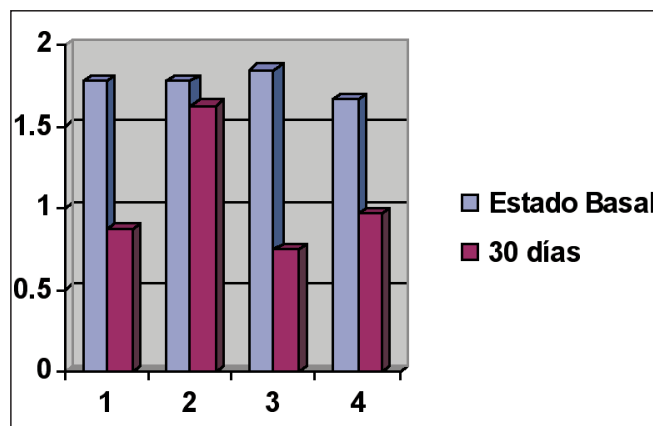


Gráfico 1. Índice Gingival (expresado por cuadrantes).

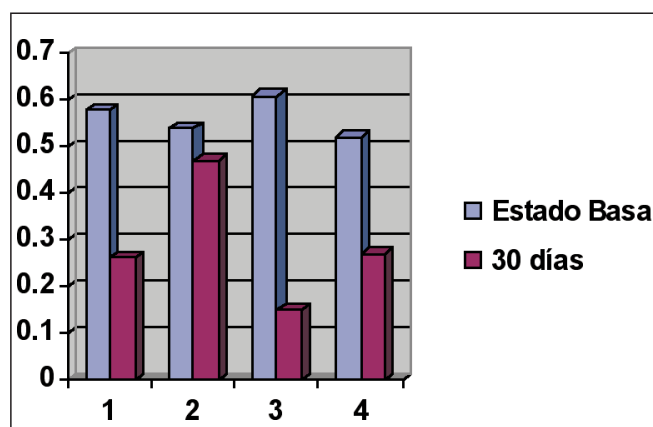


Gráfico 2. Índice de Hemorragia (expresado por cuadrantes).

TABLA 2.- ANÁLISIS DE LAS VARIABLES MICROBIOLÓGICAS

		<i>Prevotella spp</i>	<i>Porphyromonas spp</i>	<i>Bacteroides spp spp</i>	<i>Propionibacterium spp</i>	<i>Actinomyces spp</i>
R y A	E. Basal	++	++	+	+	+
	30 días	-	-	-	-	-
Té Verde	E. Basal	++	++	+	+	+
	30 días	-	+	-	-	-
RyA + Té Verde	E. Basal	++	++	+	+	+
	30 días	-	-	-	-	-
RyA + Placebo	E. Basal	++	++	+	+	+
	30 días	-	-	-	-	-

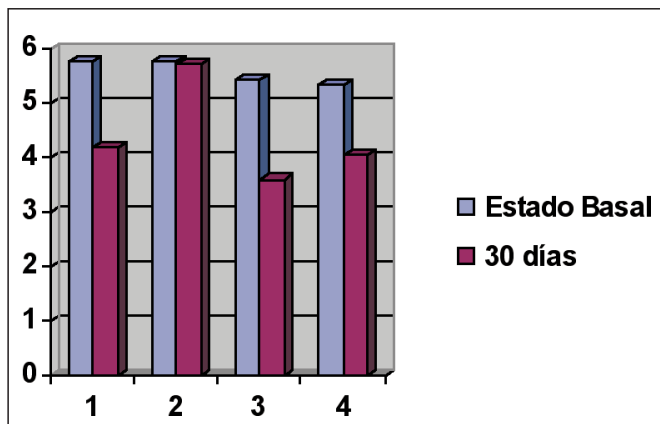


Gráfico 3. Profundidad de sondaje (expresada por cuadrantes).

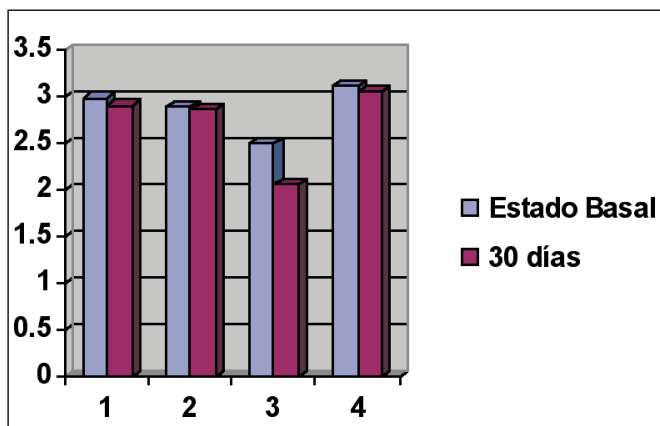


Gráfico 4. Pérdida de inserción (expresada por cuadrantes).

DISCUSION

La etiología de las caries dentales y la enfermedad periodontal es infecciosa a partir de bacterias orales. Los *Streptococcus mutans* están asociados con la etiología de las caries dentales (24). *Actinomyces* spp se encontraron asociadas con las caries radiculares (25), *Porphyromonas gingivalis* (26,27) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (28-30) son considerados bacterias etiológicas en casos de periodontitis en humanos. *Fusobacterium nucleatum* (31), *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* ssp (30) y *Eikenella corrodens* (32) se las encuentra asociadas a la enfermedad periodontal en humanos.

El extracto de té verde es capaz de inhibir y matar cepas de *Staphilococcus aureus*, *epidermidis*, *Salmonella tphi* *Shigella dysenteriae* y *Vibrio cho-*

lereae (6-9) y tiene una importante actividad inhibitoria sobre los *Streptococcus* cariogénicos que incluyen al *Streptococcus mutans* (10), disminuyendo el riesgo de caries in vitro (14,15) e in vivo (16,17). Varios trabajos demostraron que los polifenoles del té inhiben la actividad de la colagenasa, crecimiento y adherencia celular de *Porphyromona gingivalis*, conocidos como los factores de virulencia de la enfermedad periodontal (21-23).

Nuestros resultados con respecto a la reversión de las variables clínicas inflamatorias han sido coincidentes con el estudio de Krahwinkel (2000) (33). No hemos encontrado publicaciones que evalúen resultados microbiológicos en estudios clínicos periodontales utilizando té verde, pero si comparan nuestros resultados con otros estudios realizados con antisépticos de actividad antimicrobiana reconocida como la clorhexidina después de la aplicación subgingival mediante diferentes técnicas (gel, irrigación) y concentraciones realizada por un profesional se observan pocos cambios en la flora subgingival (34-39). Después de la aplicación subgingival de gel de clorhexidina al 1% o al 2% se han observado cambios microbiológicos mínimos (40-42).

CONCLUSION

El uso de extracto de té verde asociado a la terapia periodontal mecánica ha sido sensiblemente eficaz en la reversión de las variables clínicas en el tratamiento de la periodontitis crónica, si bien su uso asociado o no al raspaje y alisamiento radicular no mostró diferencias significativas respecto del raspaje y alisamiento como monoterapia para el control de la flora anaeróbica en esta patología.

Quizás nuestras limitaciones para el aislamiento y cultivo de especies de patógenos obtenidos de las muestras de placa subgingival haya influido en la interpretación de los resultados.

Los antisépticos subgingivales tienen ciertos beneficios, especialmente cuando la aplicación se combina con una irrigación por parte del paciente. Debido a que estos fármacos no son caros, su uso es relativamente sencillo y entrañan riesgos mínimos, se jus-

tifica su utilización cuando se asocian en combinación con un desbridamiento mecánico, mejorando los resultados clínicos.

Serían necesarios continuar los estudios clínicos para determinar los beneficios del té verde en el tratamiento complementario de la enfermedad periodontal, ya sea mediante aplicaciones subgingivales, irrigaciones, colutorios u otras formas de liberación tales como podría ser su incorporación en de gomas de mascar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stugg GV, Millin DJ. The nutritional and therapeutic value of a tea-a review. *J Scie Food Agric* 1975; 26: 1439-59.
2. Min Z, Peigen X. Quantitative analisis of the active constituents in green tea. *Phytother Res* 1991; 5: 239-40.
3. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan syntesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 717-20.
4. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee M. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* 2000; 130: 472-8.
5. Anonymous. Using tea to light typhoid. *Tea Coffee J* 1923; July p.129.
6. Toda M, Okubo S, Ikigai H, Suzuki T, Suzuki Y, Hara Y, Shinamura T. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio Cholerae*. *J Microbiol Inmunol* 1992; 36: 999-1001.
7. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shinamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8: 123-5.
8. Toda M, Okubo S, Ohnishi R, Shinamura T. Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green teal. *Jpn J Bacterior* 1989; 44: 669-72.
9. Toda M, Okubo S, Hara Y, Shinamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Jpn J Bacteriol* 1991; 46: 839-45.
10. Tsunoda T, Yamazaki T, Mukai I. Oral preparations containing catechins for periodontitis and halitosis control. Japanese patent 1991 JP 03218320.
11. Abu YJ, Sakanaka S, Kim M, Kawamura T, Fujisawa T, Mitsuoka T. Effects of green tea extracts on growth of intestinal bacteria. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 335-8.
12. Okubo S, Toda M, Hara Y, Shimnamura T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin. *Jpn J Bacteriol* 1991; 46: 509-14.
13. Mukoyama A, Ushijima H, Nishimura S, Koike H, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Inhibitios of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Jpn J Med Sci Biol* 1991; 44: 181-6.
14. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem* 1989; 53: 2307-11.
15. Sakanaka S, Sato T, Kim M, Yamamoto T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic streptococci. *Agric Biol Chem* 1990; 54: 2925-29.
16. Sakanaka S, Shimura N, Aizawa M, Kim M, Yamamoto T. Preventive effect of green tea polyphenols against dental caries in conventional rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56: 592-4.
17. Otake S, Makimura M, J}Kuroki T, Nishiara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 1991; 25: 438-43.
18. Tañer A, Maiden MF, Macuch PJ, Murria L, Kent R Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 85-98

19. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco C. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999; 20: 168-238.
20. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanism of *Porphyromonas gingivales*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1244-63.
21. Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 5666-71.
22. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 1225-9.
23. Sakanaka S, Okada Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 1668-92.
24. Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980; 44: 331-84.
25. Jordan HV, Hammond BF. Filamentous bacteria isolated from human root surface caries. *Arc oral Biol* 1972; 17: 1333-42.
26. Okuda K, Takazoe I. The role of *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. *Adv Dent Res* 1988; 2: 260-8.
27. Tonzetich J, McBride BC. Characterization of volatile sulfur production by pathogenic and non-pathogenic strains of *Bacteroides*. *Arc oral Biol* 1981; 26: 963-9.
28. Newman M, Socransky SS, Savitt ED et al. Studies on the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* 1976; 47: 373-9.
29. Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1984; 84: 1-10.
30. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factor in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984; 63: 412-21.
31. Nygren HG, Dahlen D, Nilsson LA. Human complement activation by lipopolysaccharides from *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella parvula*. *Infect Immun* 1979; 26: 391-6.
32. Tanner AC, Haffer C, Bratthall RA et al. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6: 278-307.
33. Krahwinkel T, Willershausen B. The effect of sugar-free green tea chew candies on the degree of inflammation of the gingiva. *Eur J Med Res* 2000; 11: 463-7.
34. Krust KS, Drisko CL, Gross K et al. The effects of subgingival irrigation with chlorhexidine and stannous fluoride. A preliminary investigation. *J Dent Hyg* 1991; 65: 289-95.
35. Shiloah J, Patters MR. DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing and intra-pocket irrigation. *J Periodontol* 1994; 64: 568-75.
36. Schlagenhauf U, Stellwag P, Fiedler A. Subgingival irrigation in the maintenance phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 650-3.
37. Southard SR, Drisko CL, Killoy WJ et al. The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroides gingivalis* in periodontal pockets. *J Periodontol* 1989; 60: 302-9.
38. Tseng PW, Newcomb GM. The effect of a single episode of chlorhexidine irrigation on the gingival response to scaling and root planing. *J Clin Dent* 1991; 2: 83-6

39. Wennstrom JL, Heijil L, Dahlén G et al. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets. I. Clinical observations. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 541-50.
40. MacAlpine R, Magnusson I, Kieger R et al. Antimicrobial irrigation of deep pockets to supplement oral hygiene instruction and root debridement. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 568-77.
41. Oosterwaal PJ, Mikx FH, van 't Hof MA et al. Short-term bactericidal activity of chlorhexidine gel, stannous fluoride gel and amine fluoride gel tested in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 97-100.
42. Oosterwaal PJ, Mikx FH, van 't Hof MA et al. Comparison of the antimicrobial effect of the application of chlorhexidine gel, amine fluoride gel and stannous fluoride gel in debrided periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 245-51.