



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **MICHELLE FRANZ MONTAN**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 024

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AGENTES
CLAREADORES À BASE DE PERÓXIDO DE
CARBAMIDA 10 E 37% SOBRE MICRORGANISMOS
TOTAIS, ESTREPTOCOCOS E ESTREPTOCOCOS
DO GRUPO MUTANS. ESTUDO IN VIVO.**

UNICAMP Trabalho de monografia apresentado
ao programa de graduação da
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba- UNICAMP

Autora: Michelle Franz-Montan

Orientador: Prof.Dr. Pedro Luiz Rosalen

Piracicaba

2003

LISTAS

Tabela 107

Gráfico 112

Gráfico 2.....14

Gráfico 3.....15

SUMÁRIO

Introdução	04
Proposição	07
Material e método	07
Resultados e discussão	13
Conclusões	17
Referências bibliográficas	18

INTRODUÇÃO

A odontologia, nas últimas décadas, passou por várias mudanças, principalmente em relação à correção de fatores estéticos como forma, tamanho e cor dos dentes obtendo-se uma melhor harmonia do sorriso.

Com freqüência, dentes vitais e não vitais se apresentam escurecidos, comprometendo substancialmente a estética (BARATIERE *et al.*, 1994). Como solução para o escurecimento dental existem diversas técnicas, entre elas o clareamento dental (BARATIERE *et al.*, 1994; GOLDSTEIN & GARBER, 1996), considerado como a primeira alternativa de tratamento (BARATIERE *et al.*, 1994; GOLDSTEIN & GARBER, 1996; HAYWOOD & HEYMANN, 1992), pois oferece segurança (GOLDSTEIN & GARBER, 1996; GOLDESTEIN & KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, 1993; HAYWOOD & HEYMANN, 1989; HAYWOOD, 1992), sendo efetivo na maioria dos casos (GOLDESTEIN & KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, 1993), obtendo-se resultados esteticamente satisfatórios (HAYWOOD & HEYMANN, 1989) e efeitos colaterais mínimos (RITTER *et al.*, 2001). Dentre suas vantagens, destacam-se a facilidade técnica e o baixo custo (GOLDSTEIN & GARBER, 1996; HAYWOOD & HEYMANN, 1989) e, quando comparado com outros tratamentos que envolvem aplicação de ácidos ou desgaste do dente, torna-se menos invasivo por preservar uma grande quantidade de estrutura dental sadia (GOLDSTEIN & GARBER, 1996; GOLDESTEIN & KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, 1993; HAYWOOD & HEYMANN, 1989).

O clareamento dental vem sendo realizado desde o final do século XIX, entretanto era baseado em conceitos empíricos em que agentes oxidantes eram aplicados sobre a superfície dental. Em 1989, HAYWOOD & HEYMANN tornaram o

clareamento dental popular após a descrição da técnica de clareamento caseiro utilizando peróxido de carbamida 10%.

Desde então algumas variações foram propostas como o uso de géis com uma maior concentração de peróxido de carbamida (15 a 22%) na técnica caseira ou a aplicação de géis com maior concentração do agente clareador no consultório odontológico (BROOME, 1998). Estas variações são mais indicadas para casos em que os dentes se apresentam muito escurecidos ou com pigmentações por tetraciclina, quando o paciente tem urgência pelo clareamento ou os dentes não respondem ao tratamento caseiro.

HAYWOOD & HEYMANN, em 1989, descreveram o clareamento caseiro baseados nos achados clínicos de Bill Klusmier, um ortodontista que notou que os dentes de seus pacientes tornavam-se cada vez mais claros quando receitava o uso de um antisséptico oral - Gly-oxide - para melhorar a saúde bucal de seus pacientes. Os autores notaram que esse antisséptico era à base de peróxido de carbamida 10% e utilizaram em pacientes um gel com a mesma substância inserida em uma moldeira individual obtendo-se assim, o clareamento dos dentes.

O mecanismo de ação do clareamento dental consiste basicamente em uma reação de oxidação do agente clareador, peróxido de carbamida que, em contato com as enzimas presentes na cavidade oral se transforma em uréia e peróxido de hidrogênio (HAYWOOD, 1992). O peróxido de hidrogênio se difunde através da matriz orgânica do esmalte e dentina liberando radicais livres que quebram anéis de carbono de alto peso molecular, de pigmentação mais escura, convertendo-os em moléculas menores e mais claras (GOLDSTEIN, 1996; GOLDSTEIN & KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, 1993). Entretanto, os subprodutos dos agentes

clareadores também são liberados para o meio bucal, podendo agir sobre tecido mole e até mesmo sobre a microbiota do paciente.

Os estreptococos do grupo mutans, particularmente o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, estão normalmente presentes na cavidade bucal e são associados com cárie dentária humana (GIBBONS & VAN-HOUTE, 1975; LOESCHE *et al.*, 1975; DASANAYAKE *et al.*, 1995; BOWDEN, 1996). Juntamente com os *Lactobacillus* ssp., são considerados como odontopatógenos significantes. Devido à associação destes microrganismos com a cárie, uma avaliação do número destes estreptococos no biofilme dentário e na saliva pode ser útil como auxiliar no diagnóstico da atividade da doença. Sendo assim, o controle e a prevenção de cáries têm sido relacionados a uma redução do número de bactérias que colonizam a cavidade oral de um indivíduo (ZICKERT *et al.*, 1982; ZICKERT *et al.*, 1983; GISSELSSON *et al.*, 1988; LINDQUIST *et al.*, 1989; ISOKANGAS *et al.*, 1991; BOWDEN, 1996).

Um dos principais métodos de quantificação destas bactérias é realizado em amostras de saliva estimulada, colhidas de voluntários que se submetem a algum tratamento (DASANAYAKE *et al.*, 1995). Este procedimento é justificado pela relação direta entre o número de estreptococos na saliva e o número de sítios intra-orais colonizados (TOGELIUS *et al.*, 1984; DASANAYAKE *et al.*, 1995).

Desta forma, um controle apropriado do biofilme bacteriano é o fator chave para a prevenção das doenças dentais (LÖDAL *et al.*, 1961; SUOMI *et al.*, 1971; AXELSSON *et al.*, 1991).

PROPOSIÇÃO

Observar o efeito do clareamento dental sobre a microbiota oral total, estreptococos e estreptococos do grupo mutans em voluntários sadios que serão submetidos ao clareamento dental na forma caseira com Peróxido de Carbamida 10%, concomitantemente ao clareamento em consultório com Peróxido de Carbamida 37%.

MATERIAI E MÉTODO

Seleção dos voluntários

Para o presente estudo foram selecionados 32 voluntários, estudantes de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, que demonstraram vontade de clarear seus dentes.

Conforme definido na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (CEP-FOP-UNICAMP) e só foi realizada após sua aprovação.

Cada voluntário recebeu um termo de consentimento no qual constatou todos os detalhes do projeto de pesquisa. Somente após a anuência do voluntário, através da assinatura do termo, sem qualquer espécie de coação e com o esclarecimento de possíveis dúvidas, este foi considerado como participante da pesquisa.

Os voluntários foram previamente examinados, sendo a etiologia da alteração de cor existente determinada. Além disso, foram informados sobre os efeitos colaterais, limitações da técnica e necessidade de substituição de restaurações estéticas existentes.

No total 32 indivíduos participaram da pesquisa. Os voluntários foram selecionados através de anamnese e exame clínico com as seguintes características:

- Estudantes universitários de graduação e pós-graduação;
- Não apresentavam patologias sistêmicas;
- Não podiam ter feito uso de nenhum enxagüatório bucal ou substância antimicrobiana há pelo menos duas semanas antes do início do estudo;
- Com todos os dentes presentes na boca (à exceção dos terceiros molares) e ausência de próteses ou aparelhos ortodônticos;
- Sem histórico de alergia ou outros problemas decorrentes do uso de qualquer um dos componentes de quaisquer das soluções que foram utilizadas;
- Voluntárias não grávidas;
- Voluntários não fumantes;
- Voluntários sem sensibilidade dentinária;
- Voluntários sem abrasão ou erosão radiculares;

Tratamento clareador

Para realização do tratamento clareador os voluntários foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1

Grupos	Tratamento	Abreviatura	n
1.	Consultório – PC 37% + Caseiro – PC 10%	PCPC	8
2.	Consultório – PC 37% + Caseiro – Placebo	PCPL	8
3.	Consultório – Placebo + Caseiro – PC 10%	PLPC	8
4.	Consultório – Placebo + Caseiro – Placebo	PLPL	8

Tabela 1- Grupos experimentais determinados pelo tratamento com os géis clareadores ou placebo.

Os voluntários tiveram suas arcadas moldadas com um material a base de alginato para obtenção de modelos em gesso pedra. Através destes foram confeccionadas moldeiras individuais em uma plastificadora a vácuo[¶], as quais foram acabadas e polidas até a margem gengival dos dentes.

O tratamento foi dividido em dois períodos: “*wash out*”, visando à padronização das condições bucais e “*run in*”, em que foi realizado a aplicação dos géis clareadores ou o placebo.

O período de “*wash out*” foi realizado por 2 semanas, nas quais os voluntários receberam um dentifrício e uma escova padronizados.

O clareamento em consultório o foi feito, após o isolamento absoluto, aplicando-se um gel a base de peróxido de carbamida 37% (grupos PCPC e PCPL) ou um gel placebo (fórmula oficial de gel de carbopol[§]) por uma hora (grupos PLPC e PLPL). Em seguida, o gel foi removido com spray de ar/água e o paciente dispensado.

O clareamento caseiro foi feito durante o período de sono do paciente, o qual utilizou os géis por 6 horas no mínimo. Como agente clareador foi utilizado um gel à base de peróxido de carbamida a 10% (grupos PCPC e PLPC) ou gel placebo (grupos PCPL e PLPL).

Os voluntários retornaram semanalmente para uma nova seção no consultório onde, após o procedimento, foram fornecidos novas seringas com o gel caseiro.

Nessa fase, os voluntários pertencentes ao grupo 4, os quais utilizaram somente géis placebo, receberam géis clareadores para realização do clareamento e caso ainda não estejam satisfeitos com os resultados, os outros voluntários

[¶] Bio-Art Equip. Odontológicos Ltda.

[§] Fórmula oficial, Proderma - Farmácia de manipulação.

puderam optar pela continuação do tratamento clareador do arco superior e realização do clareamento das arcadas inferiores.

Valores basais

Previamente ao início de qualquer tratamento clareador, foi realizada uma colheita de saliva a fim de verificar os valores basais de microbiota total, estreptococos e estreptococos do grupo mutans. Estes valores foram posteriormente utilizados como controle do próprio voluntário para verificação de possíveis reduções causadas pelos agentes clareadores ou placebo.

Meios de cultura

Para a determinação da contagem de microrganismos totais foram utilizadas placas de Petri (5 x 2 cm), contendo 5 mL de ágar base com sangue de carneiro desfibrinado e esterilizado a 5%. Para a contagem total de estreptococos foram utilizadas placas de igual tamanho e mesma quantidade de MSA (ágar Mitis Salivarius com 15% de sacarose e telurito de potássio a 1%), para a contagem parcial de estreptococos do grupo mutans foram utilizadas placas de igual tamanho e mesma quantidade de MSB (ágar Mitis Salivarius com bacitracina 200 U/L, 15% de sacarose e telurito de potássio a 1%), que é o meio seletivo para estreptococos do grupo mutans (GOLD *et al.*, 1973).

Para cada diluição, obtida através das amostras coletadas, foram feitas duplicatas, isto é, cada diluição foi semeada em duas placas de ágar sangue, duas placas contendo MSA e duas contendo MSB.

Quantificação dos microrganismos

Nos dias marcados para a colheita das amostras de saliva, os voluntários receberam 2g de parafina sólida para mastigar durante 2 min, estimulando a formação de saliva (DASANAYAKE *et al.*, 1995). Todos foram orientados a desprezar a saliva assim obtida e, em seguida, aproximadamente 1 mL de saliva de cada voluntário foi colhida em um tubo eppendorf esterilizado. Uma ponteira descartável de 1mL foi utilizada de forma a facilitar a colheita. Os tubos com as amostras foram submetidos à dispersão num sonicador¹ com amplitude a 5% e 6 pulsos com ciclo total de 59 s (9,9 s de pulso e 5 s de intervalo). As amostras foram diluídas 100 e 1000 vezes, com a adição de soro fisiológico esterilizado em tubo tipo *eppendorf*.

As amostras diluídas foram pipetadas e espalhadas com auxílio de alça de *Drigalski* esterilizada (alíquotas de 5 µL), nas duas placas de *Petri* contendo os meios (MSB, MSA e ágar sangue).

Após estes procedimentos, todas as placas foram depositadas em estufa² com atmosfera parcial de 10% de CO₂ e 37°C de temperatura, por 48 horas.

As placas de MSA e MSB foram quantificadas enquanto as placas de ágar sangue permaneceram por mais 24 horas na estufa de cultura³ para, só após este período, serem quantificadas.

¹ Vibra Cell 400w, Sonics & Materials Inc

² IG 150, Jovan

³ 002 CB, Fanem Ltda.

Determinação das diluições e períodos de colheita

Após testes para ajustes nas diluições das amostras de saliva, foi determinado 1:100.00 como sendo a melhor diluição para as contagens em ágar sangue, 1:1.000 para o MSA e 1:10 para o MSB.

Os períodos de colheita da saliva contemplaram:

- 1) um período inicial, antes do início do tratamento clareador (**período BASAL**);
- 2) logo após o clareamento em consultório (**período 0H**);
- 3) após trinta minutos após o tratamento em consultório (**período 30H**);
- 4) na manhã seguinte após o tratamento caseiro (**período 12H**);
- 5) na quarta semana, o tratamento em consultório foi interrompido e uma amostra de saliva foi colhida (**período 4 SEM**);
- 6) na quinta semana, o tratamento clareador caseiro foi interrompido e uma amostra de saliva foi colhida (**período 5 SEM**).

Análise Estatística

Os resultados das contagens de colônias obtidas em cada amostra de saliva foram computados. Para cada grupo experimental foram obtidas médias (ufc/ μ L) de contagem de microrganismos nos meios de cultura MSA (estreptococos), MSB (estreptococos do grupo mutans) e ágar sangue (microrganismos totais).

Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5% (Software Bioestat for Windows, versão 2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 32 voluntários selecionados para a triagem, dentro dos critérios necessários descritos no projeto inicial, vinte e quatro foram escolhidos para os procedimentos da pesquisa na primeira etapa do estudo. Destes, 18 cumpriram todas as etapas, sendo seis voluntários excluídos devido ao uso de algum tipo de antimicrobiano durante o estudo. Para a segunda etapa do experimento foram selecionados mais 14 voluntários. Todos os voluntários, mesmo os excluídos, receberam o tratamento clareador proposto inicialmente.

Os gráficos a seguir indicam a média (\pm erro padrão) do crescimento bacteriano dos quatro grupos experimentais nos meios de cultura MSA (estreptococos), MSB (estreptococos do grupo mutans) e ágar sangue (microrganismos totais).

O gráfico 1 mostra o crescimento das cepas de estreptococos no MSA.

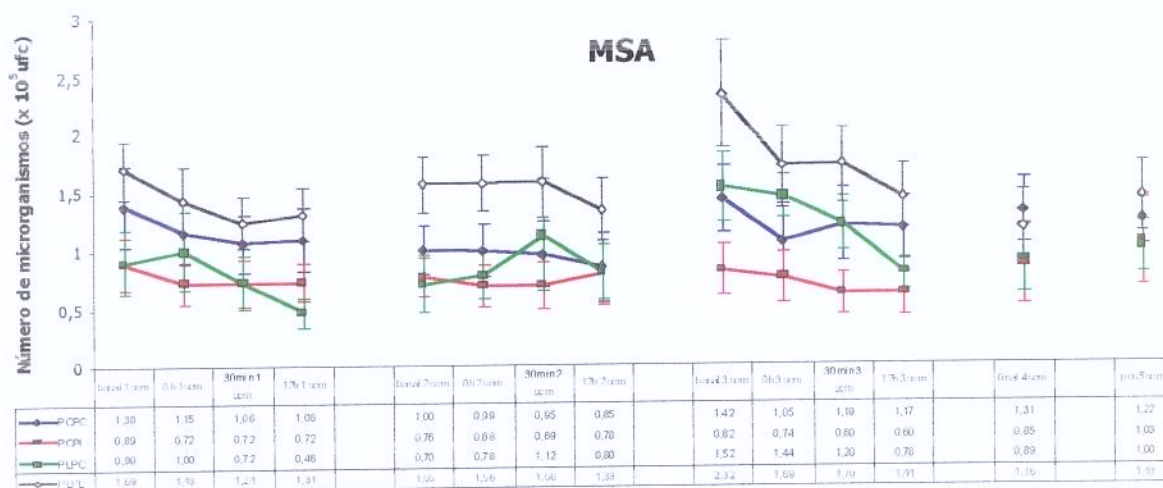


Gráfico 1 - Crescimento das cepas de estreptococos no MSA nos diferentes períodos de tempo e tratamento.

De maneira geral pode-se observar que no grupo 1 (PCPC), tratamento clareador consultório e caseiro, provocou uma diminuição inicial no número de estreptococos porém voltando a aumentar na terceira semana de tratamento. Já no grupo 2 (PCPL), onde o gel ativo era o de consultório, praticamente, não foram observadas

mudanças na contagem na microbiota dos indivíduos, comparando-se as semanas de tratamento. O tratamento placebo de consultório e tratamento clareador caseiro, grupo 3 (PLPC), provocou aumento na quantidade dos microrganismos. No grupo 4, composto apenas por placebo (PLPL), também não foi observada alteração.

Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$), provavelmente devido aos altos desvios padrão verificados. Esta observação é válida para a comparação entre todos os grupos e tempos de estudo.

Estes resultados podem ser explicados pelo conhecida habilidade de sobrevivência na presença de peróxido de hidrogênio e mesmo da produção desta substância por algumas cepas de estreptococos, particularmente aqueles do grupo *viridans*.

A produção de H_2O_2 pelo grupo *viridans* (especialmente o *S. gordonii*) é condicionada pela presença de sacarose ou glucose e é inibida pela presença de metais pesados (Barnard & Stinson, 1999).

Além disso, o biofilme bacteriano é constituído por uma gama enorme de microrganismos que, diferentes maneiras, podem se relacionar com o peróxido de hidrogênio. Ryan & Kleinberg (1995) observaram que o peróxido de hidrogênio produzido por cepas de *S. sanguis* I, *S. sanguis* II e *S. mitior* pode ser metabolizado e utilizado por cepas de *Neisseria sicca*, *Haemophilus segnis*, *H. parainfluenzae*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus epidermidis*. Além disso, verificaram que a habilidade das bactérias no biofilme dental em degradar o peróxido foi consideravelmente alta e rápida, indicando que o biofilme é constituído por mais bactérias que degradam o peróxido do que por aquelas que o sintetizam.

Desta forma, os resultados observados são coerentes com os relatados em outros estudos (Bentley *et al.*, 2000).

O gráfico 2 mostra o crescimento de cepas de estreptococos do grupo *mutans*.

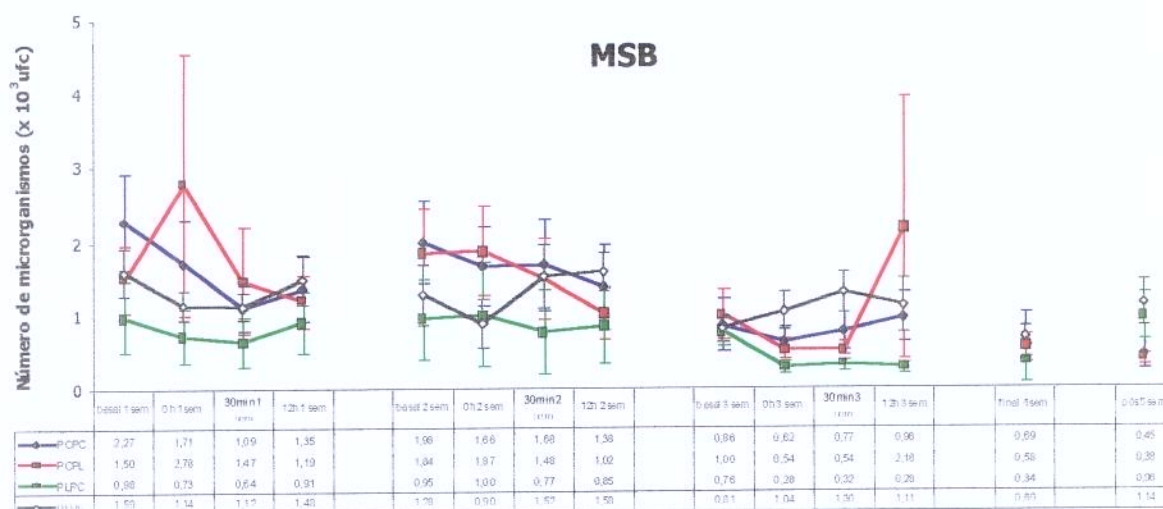


Gráfico 2 – Crescimento das cepas de estreptococos do grupo *mutans* no MSB nos diferentes períodos e tempos de tratamento.

Pode-se observar uma diminuição de estreptococos do grupo *mutans* em todos os grupos em experimento. A maior diminuição ocorreu no grupo 1 (PCPC) e a menor no grupo 4 (PLPL). Novamente, os resultados não exibiram diferenças estatisticamente significantes.

Resultados semelhantes com relação a estes microrganismos, foram observados previamente por Bentley *et al.* (2000). Estes investigaram o efeito antibacteriano de 3 produtos a base de peróxido de carbamida (Nitewhite, Opalescence, and Proxigel) e uma solução do mesmo composto a 10% (Proxigel) em níveis salivares de *S. mutans* e lactobacilos. Nenhum efeito sobre estreptococos do grupo *mutans* foram verificados ($p > 0,05$) embora o peróxido tenha causado redução significativa de lactobacilos.

O gráfico 3 mostra o crescimento de cepas de microrganismos totais.

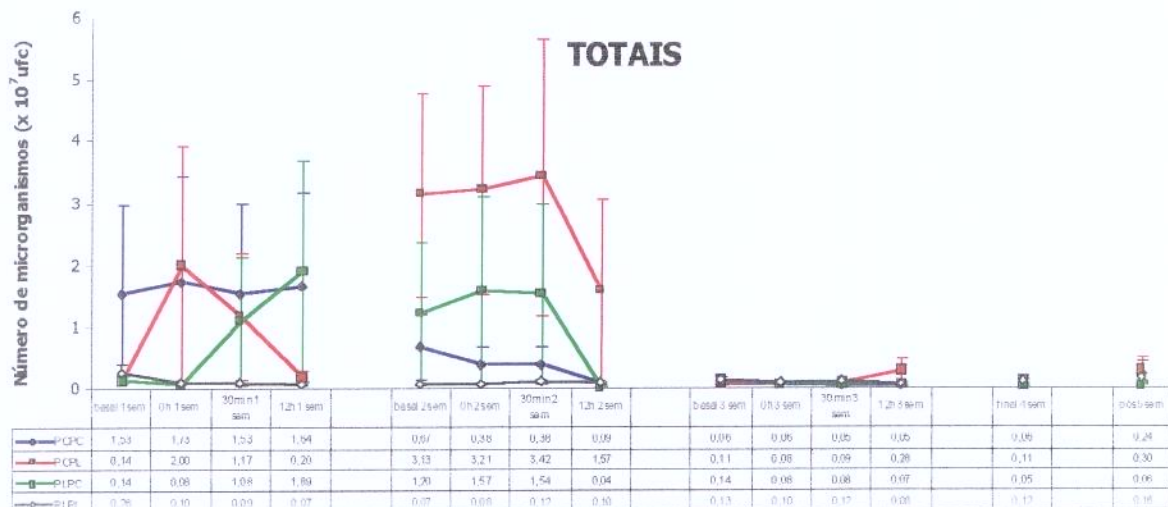


Gráfico 3 – Crescimento das cepas de microrganismos totais no Ágar Sangue nos diferentes períodos e tempos de tratamento.

Nos grupos experimentais 1 (PCPC), 3 (PLPC) e 4 (PLPL) foram observadas reduções nas contagens microbianas, porém nenhuma das reduções foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A maior redução observada foi novamente no grupo 1. No grupo 2, no entanto, houve um aumento na contagem.

Após análise estatística dos resultados não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos e/ou dentro do mesmo grupo ao longo das semanas de tratamento. Este achado, embora a concentração do gel testado tenha sido de 37%, confirma o relatado por BENTLEY et al (2000), que testando os efeitos do peróxido de carbamida a 10% em bactérias cariogênicas, estreptococos mutans e lactobacilos, in vitro e clinicamente, verificaram redução apenas nos testes in vitro, não observando redução estatisticamente significativa durante a fase clínica do experimento. Pitten & Kramer (1999) observaram um efeito pequeno e temporário do H_2O_2 na microbiota salivar após 1 hora da aplicação da mesma. Pitten & Kramer (1999) observaram um efeito pequeno e temporário do H_2O_2 na microbiota salivar após 1 hora da aplicação da mesma.

A relação entre bactérias orais e o peróxido de hidrogênio ainda não está bem estabelecida. Entretanto, alguns fatos importantes despertam para a necessidade de maiores pesquisas a respeito do tema. Sabe-se, por exemplo, que o peróxido de hidrogênio aumenta as propriedades de aderência da bactéria *P. gingivalis*, entretanto inibe a coagregação desta ao *S. oralis* e *S. gordonii*, mesmo em concentrações abaixo das clinicamente utilizadas. Além disso, a capacidade de produção da substância pode ser útil. Uehara et al. (2001) mostraram que os estreptococos *viridans* podem prevenir a colonização de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) na cavidade oral de recém-nascidos. A inibição aconteceria pela produção de uma substância tipo bacteriocina presente em muitas cepas de *S. viridans*, as quais são capazes de matar MRSA, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. A substância seria induzida pela secreção de peróxido de hidrogênio.

Por fim, embora não tenha se apresentado efetividade no modelo empregado neste estudo, o peróxido poderia se associado a outras substâncias exercer efeitos antimicrobianos sobre a microbiota oral, como demonstrado por Steinberg et al. (1999). Estes observaram efeitos sinérgicos entre a clorexidina e o H₂O₂, sendo que provavelmente este fenômeno ocorreria pela maior penetração do segundo pela alteração na superfície celular causada pela primeira.

CONCLUSÕES

No modelo de estudo empregado neste estudo não foi possível observar efeitos antibacterianos sobre a microbiota salivar do peróxido de carbamida a 37% ou a 10%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AXELSSON, P. Current role of pharmaceuticals in prevention of caries and periodontal disease. **Int Dent J**, Guiedford, v.43, p.473-482, 1993.
- 2 BARATIERI, *et al.* *Clareamento dental*. **Quintessence books**, Ed. Santos, 1994.
- 3 BOWDEN, G.H. Mutans streptococci caries and chlorhexidine. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v.62, n.9, p.700, Sep. 1996.
- 4 BROOME, J.C. At-home use of 35% carbamide peroxide bleaching gel: A case report. **Compendium**, v.19, p.824-828, 1998.
- 5 DASANAYAKE, E. *et al.* Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. **Archs Oral Biol**,_Oxford, v.40, n.4, p.345-351, 1995.
- 6 GIBSONS, R. J, VAN HOUTE, J.V. Dental caries. **Annu Ver Med**, v.26, p.121-135, 1975.
- 7 GISSELSSON, H., BIRKHED, D., BJORN, A.L. Effect of professional flossing with chlorexidine gel on aproximal caries in 12- to 15- year-old schoolchildren. **Caries Res**, Basel, v.22, p.187-192, 1988.
- 8 GOLDSTEIN, R. E.; GARBER, D. A. Complete dental bleaching. **Quintessence Books**, 1996.
- 9 GOLDSTEIN, GR, KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L. Bleaching is it safe and effective? **J Prosthet Dent**, v.69, p.325-328, 1993.
- 10 HAYWOOD VB, HEYMANN HO. Nightguard vital bleaching. **Quintessence Int**, v.20, p.173-176, 1989.
- 11 HAYWOOD V. B. History, safety, and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int**, v.23, p.471-488, 1992.

- 12 ISOKANGAS, P. *et al.* Dental caries and mutans streptococci in the proximal areas of molars affected by the habitual use of xylitol chewing gum. **Caries Res**, Basel, v.25, p.444-448, 1991
- 13 LINDQUIST, B. *et al.* Effect of different caries preventive measures in children highly infected with mutans streptococci. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.97, p.330-337, 1989.
- 14 LOESCH, W. J. *et.al.* Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. **Infect Immun**, Washington, v.11, p.1252-1260. 1975.
- 15 LÖVDAL, A. *et al.* Combined effect of subgingival scaling and controlled oral hygiene on the incidence of gingivitis. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.19, p.537-555, 1961.
- 16 RITTER, A.V.; LEONARD, R.H.; GEORGES, S.T.; CAPLAN, D.J. Ten years post-treatment safety and stability of nightguarg vital bleaching. **J dent Res**, v.20, p.246, 2001 [1685].
- 17 SUOMI, J. D. *et al.* The effect of controlled oral hygiene procedures on the progression of periodontal disease in adults after third and final year. **J. Periodontol**, Chicago, v. 42, p.152-160, 1971.
- 18 TOGELIUS, J. *et al.* *Streptococcus mutans* in saliva: intra-individual variations and relation to the number of colonized sites. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.42, p.157-163, 1984.
- 19 ZIRCKET, I.,EMILSON, C.G., KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. **Infect Immun**, Washington, v.39, p.982-985, 1983.
- 20 ZIRCKET, I.,EMILSON, C.G., KRASSE, B. Effects of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.27, p.861-868, 1982.