

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LUCAS BOZZETTI PIGOZZI
RAFAEL MORAWSKI

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DENTIFRÍCIOS E ENXAGUATÓRIOS BUCAIS
SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Porto Alegre
2016

LUCAS BOZZETTI PIGOZZI
RAFAEL MORAWSKI

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DENTIFRÍCIOS E ENXAGUATÓRIOS BUCAIS
SOBRE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para
obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre
2016

CIP – Catalogação na Publicação

Pigozzi, Lucas Bozzetti

Efeito antimicrobiano de dentifrícios e enxaguatórios bucais sobre bactérias cariogênicas / Lucas Bozzetti Pigozzi, Rafael Morawski – 2016.

46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

Orientador: Rodrigo Alex Arthur

1. Odontologia. 2. Cárie dentária. 3. Antimicrobianos. 4. Dentifrícios. 5. Enxaguatórios. I. Morawski, Rafael. II. Arthur, Rodrigo Alex. III. Título.

Aos nossos pais, namoradas, amigos e familiares, que sempre nos apoiaram nas nossas decisões e nos ajudaram a seguir em frente.

Ao nosso orientador, Rodrigo Alex Arthur, e à nossa Co-Orientadora, Thais de Cássia Negrini, que com muita paciência e dedicação, abrilhantaram nosso trabalho com sua sabedoria e seu dom de ensinar.

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais por terem nos dado a oportunidade de seguir nosso caminho com uma educação de qualidade e fornecido todos os recursos necessários para que isso fosse possível.

Aos nossos amigos e colegas que nos apoiaram com palavras de incentivo e com solidariedade em todos os momentos.

E por fim, aos nossos orientadores que com maestria, compartilharam seu conhecimento, sempre com muita paciência, sabedoria e compreensão, e também pelos todos momentos de descontração que tivemos.

Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.

Mahatma Gandhi

RESUMO

PIGOZZI, Lucas Bozzetti; MORAWSKI, Rafael. **Efeito antimicrobiano de dentifrícios e enxaguatórios bucais sobre bactérias cariogênicas.** 2016. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

A cárie dental é uma doença bucal multifatorial, biofilme-dieta-dependente. Fluorterapia associada ao controle da dieta e controle mecânico do biofilme são estratégias usadas para controle dessa doença. Nesse sentido, o controle químico, baseado no emprego de antimicrobianos, poderia ser usado como auxiliar ao método mecânico no controle do biofilme. Produtos para higiene bucal possuem antimicrobianos em sua composição. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de dentifrícios (D) e enxaguatórios (E) bucais contra *Streptococcus mutans* (SM) e *Lactobacillus casei* (LC), microrganismos sabidamente cariogênicos. Dentifrícios e enxaguatórios bucais das marcas mais comercializadas e que apresentam algum composto antimicrobiano em sua composição foram adquiridos sendo três amostras com mesmo número de lote de cada produto. Como parte do screening do efeito antimicrobiano, inicialmente foi realizado ensaio de “disco-difusão” (DF) em ágar. SM e LC foram individualmente cultivados em placas de meio agar tríplico de soja (TSA) nas quais foram adicionados discos de papel filtro estéreis impregnados com os produtos a serem avaliados. As placas foram incubadas à 37°C, por 48h em microaerofilia e o diâmetro dos halos de inibição foi então medido com paquímetro digital e calculado a razão entre este diâmetro sobre o diâmetro do papel filtro. Em seguida, foi realizado o ensaio de “Time-kill” (TK) com esses produtos. Suspensões padronizadas de SM e LC foram preparadas em meio caldo tríplico de soja (TSB) e expostas individualmente aos produtos a serem avaliados. Imediatamente após a exposição, e após 1, 3 e 5 minutos foram coletadas alíquotas da suspensão microbiana que foram seriadamente diluída e inoculada em meio TSA. As placas de TSA foram incubadas à 37°C, por 48h em microaerofilia e então se determinou as contagens de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC) presentes em cada condição analisada. Para os ensaios, soluções de digluconato de clorexidina 0,12% e solução salina estéril foram usadas como controles positivo (CP) e negativo (CN), respectivamente. Para todos os ensaios se realizou três experimentos distintos. Os resultados foram avaliados considerando limite de significância de 5%. Como resultados gerais, observa-se que no DF para D, todos os produtos testados apresentaram efeito superior ao controle negativo, com exceção o Luminous White Advanced para LC. Para os E, todos apresentaram maior efeito do que o CN com exceção do Malvatricin com Xilitol e do Listerine Zero tanto para SM quanto para LC. Em relação ao TK para D, todos os produtos foram superiores ao CN em todos os tempos, tanto para SM quanto para LC. Já para os E, Malvatricin, Colgate Plax 2-1 e Sensodyne se mostraram semelhantes ao CN após 1 minuto de uso. Com isso, conclui-se que, dentro das limitações desse estudo, os resultados sugerem que os D e a maioria dos E avaliados apresentam efeito antimicrobiano contra SM e LC cultivados na forma planctônica.

Palavras-chave: Odontologia. Cárie dentária. Antimicrobianos. Dentifrícios. Enxaguatórios.

ABSTRACT

Pigozzi, Lucas Bozzetti; MORAWSKI, Rafael. **Antimicrobial effect of dentifrices and mouthwashes against cariogenic bacteria**. 46 p. 2016. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

Dental caries is a multifactorial and biofilm-diet-dependent disease. Use of fluoride associated with dietary counseling and mechanical biofilm removal are strategies adopted for controlling this disease. This way, chemical control of biofilms, based on the use of antimicrobials, could be used as an adjunct of mechanical biofilm removal. Oral hygiene products contain antimicrobials on their composition. Therefore, the present study aims to evaluate the antimicrobial effect of dentifrices (D) and mouthwashes (M) against oral *Streptococcus mutans* (SM) and *Lactobacillus casei* (LC), well-known cariogenic microorganisms. Dentifrice and mouthwashes of the most marketed brands and that had some antimicrobial compound on their composition were obtained being three samples of the same lot number. Antimicrobial effect was first evaluated using "agar disk diffusion" (DF) test. SM and LC were individually cultured in tryptic soy agar plates (TSA) in which sterile filter paper discs impregnated with the product to be evaluated were added. The plates were incubated at 37°C for 48h in microaerophilic condition and the diameter of the inhibition zones were then measured with a digital caliper and the ratio between the diameter and the diameter of the filter paper was calculated. Then, "Time-kill" (TK) test was performed. Suspensions of SM and LC were exposed to the products to be evaluated. Immediately after exposure, and after 1, 3 and 5 minutes aliquots of microbial suspensions were collected, serially diluted and inoculated onto TSA. The TSA plates were incubated at 37°C for 48h in microaerophilic condition and then counts of colony forming units (CFU) was performed at each condition. Solutions of chlorhexidine digluconate 0,12% and sterile saline were used as positive (PC) and negative (NC) controls, respectively. Experiments were carried out in triplicate. The results were evaluated considering a 5% significance threshold. It was observed that all products tested showed an antimicrobial effect superior to the NC on DF for D, except the Luminous White Advanced for LC. Regarding M, all tested products showed greater effect than the NC except Malvatricin with Xylitol and Listerine Zero for SM. Regarding TK, all D were superior to NC at all times for both LC and SM. Regarding M, Malvatricin, Colgate Plax 2-1 and Sensodyne presented similar antimicrobial effect compared with NC after 1 minute of use. Thus, it can be concluded that, despite the limitations of this study, the results suggest that D and almost all M presented antimicrobial effect against SM and LC grown in planktonic form.

Keywords: Dentistry. Dental caries. Antimicrobials. Toothpastes. Rinses.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	FORMAÇÃO DE BIOFILME DENTAL NÃO ASSOCIADA À DOENÇA CÁRIE.....	12
2.2	FORMAÇÃO DO BIOFILME CARIOGÊNICO E DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE DENTAL.....	13
2.3	USO DO FLÚOR NO CONTROLE DA CÁRIE DENTAL.....	16
2.4	USO DE ANTIMICROBIANOS PARA CONTROLE DO BIOFILME DENTAL.....	18
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	22
4	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A cárie dental é considerada uma doença dieta-biofilme dependente, ou seja, para que essa doença ocorra é necessário haver acúmulo de biofilme sobre as superfícies dentais associadas a uma frequente ingestão de carboidratos fermentáveis (SHEIHAM; JAMES, 2015). Embora sua ocorrência esteja diminuindo nos últimos anos, a cárie dental ainda é a doença bucal de maior prevalência no Brasil, segundo o último levantamento da Saúde Bucal no Brasil feito em 2010, realizado pela Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (BRASIL, 2012).

O biofilme dental, fator chave para o desenvolvimento da doença cárie, se forma com uma composição heterogênea de microrganismos, em diferentes sítios, como superfícies oclusais, interproximais e superfícies lisas livres. Quando associado a uma dieta rica e de ingestão frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, sucessivas quedas de pH ocorrem nesse biofilme ao longo do dia. Essas quedas de pH promovem um desequilíbrio mineral na interface dente-biofilme acarretando perda de íons fosfato e cálcio da superfície dental com o consequente desenvolvimento da lesão de cárie. Parte dos minerais perdidos pode ser novamente reprecipitados na superfície dental pela saliva, processo que é otimizado quando o flúor está presente na cavidade bucal em baixas concentrações e de forma constante (CURY; TENUTA, 2008; CURY, 2001).

Dentre os microrganismos presentes no biofilme dental, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e o *Lactobacillus* spp. têm sido frequentemente encontrados em maiores proporções em indivíduos cárie ativos e associados ao desenvolvimento da lesão de cárie (DOGAN et al., 2009; LOESCHE, 1986). O *S. mutans* apresenta capacidade de formação de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEC) a partir da metabolização da sacarose, que viabilizam a adesão desses microrganismos à superfície dental. Esses PECs proporcionam uma maior integridade estrutural e adesão seletiva de bactérias, tornam o biofilme mais poroso e com volume aumentado o que facilita a difusão de substratos por toda a sua extensão (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; JENKINSON; LAMONT, 1997; PAES LEME et al., 2006; VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997; XIAO et al., 2012). Além disso, esse microrganismo atua fermentando os carboidratos da dieta, ocasionando quedas de pH no biofilme e levando à desmineralização da estrutura dentária. Esse ambiente de reduzido pH favorece ainda a proliferação de outros microrganismos como o

Lactobacillus spp. que também são cariogênicos na medida que também contribuem para que quedas de pH ocorram no biofilme dental em função da metabolização dos carboidratos da dieta (MARSH, 2003; MARSH; BRADSHAW, 1995).

Frente ao exposto, o cirurgião-dentista deve atuar na prevenção e controle da cárie dental incentivando os pacientes para um adequado controle de acúmulo de biofilme sobre as superfícies dentais por meio de uma correta instrução de higiene bucal, bem como reduzindo a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis (NYVAD; FEJERSKOV, 1997; STECKSEN-BLICKS; GUSTAFSSON, 1986; VAN DER WEIJDEN; HIOE, 2005). Além disso, produtos fluoretados são de grande importância para o controle e prevenção de cárie: os dentifrícios fluoretados são indicados para uso diário para toda a população, enquanto que enxaguatórios, géis e vernizes fluoretados são indicados para indivíduos cárie ativos (BRASIL, 2009; MARINHO et al., 2003; MARINHO et al., 2016).

Considerando a importância de um adequado e eficiente controle do acúmulo de biofilme sobre as superfícies dentais, substâncias antimicrobianas têm sido adicionadas aos produtos para higiene bucal, como dentifrícios e enxaguatórios, no intuito de otimizar a remoção e reduzir formação de biofilme dental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME DENTAL NÃO ASSOCIADA À DOENÇA CÁRIE

A cavidade bucal possui uma microflora natural composta por microrganismos comensais que interagem de maneira harmônica com o hospedeiro em condições compatíveis com saúde. Esses microrganismos estão em grande parte aderidos, na forma de biofilmes, à película adquirida que se forma sob a superfície dental. O biofilme nada mais é do que uma comunidade composta por diversos tipos de microrganismos que estão imersos em uma matriz de seus próprios polímeros e de polímeros salivares. A característica específica de cada biofilme varia de acordo com o sítio dental em que eles colonizam e seu aporte de nutrientes, oxigênio, defesa do hospedeiro, entre outros fatores. Raramente os microrganismos conseguem se aderir diretamente sobre a superfície dental. O que ocorre é a ligação sobre a película adquirida, que é uma fina camada proteica de origem salivar e de produtos microbianos que naturalmente se forma sobre a superfície dental. Esses microrganismos que são capazes de se ligar a essa película e conseqüentemente iniciar a formação do biofilme são chamados de colonizadores primários. Esse grupo é composto predominantemente por espécies como *Neisseria* spp. e por cocos gram-positivos anaeróbios facultativos, especialmente os *Streptococcus* spp., em destaque *S. salivarius*, *S. mitis* e *S. oralis* (LISTGARTEN, 1994; MARSH; BRADSHAW, 1995). A adesão desses microrganismos à película é específica, uma vez que eles possuem receptores de membrana capazes de interagirem com determinados componentes da película salivar (GIBBONS, 1984). Esse é um processo de início rápido, pois imediatamente após a escovação dental, a película salivar adquirida inicia sua formação, e dá-se início à adesão desses microrganismos (HANNIG; HANNIG, 2009).

Os colonizadores primários então fornecem condições para que outros microrganismos, incapazes de se aderirem à película salivar, comecem a colonizar o biofilme dental por meio de um mecanismo de co-agregação bacteriana, que contribui para o aumento da diversidade microbiana do biofilme (MARSH; BRADSHAW, 1995). Na medida em que há o acúmulo de biofilme, a capacidade metabólica das bactérias faz com que ocorram gradientes nutricionais, de pH e de concentração de oxigênio que afetará diretamente a distribuição espacial das

bactérias no interior do biofilme. Além disso, com o espessamento do biofilme e seu amadurecimento, há uma diminuição na concentração de oxigênio, permitindo o crescimento de diversos tipos de espécies anaeróbias que não seriam capazes de sobreviver num ambiente rico em oxigênio (MARSH; BRADSHAW, 1995). Por conseguinte, há uma mudança progressiva nas espécies microbianas, observando-se a transição de microrganismos, principalmente aeróbios e anaeróbios facultativos para microrganismos anaeróbios facultativos e obrigatoriamente anaeróbios, tais como, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Corynebacterium* spp. e *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., respectivamente (MARSH; BRADSHAW, 1995).

Dentre os microrganismos presentes nessa fase de amadurecimento do biofilme, destaca-se o *Fusobacterium* spp., bactéria gram-negativa que apresenta pouca capacidade de adesão à superfície dental. Essa bactéria co-agrega-se aos colonizadores primários e atua como facilitadora e intermediária para a colonização do biofilme por microrganismos tardios, como *Selenomonas* spp., *Eubacterium* spp., dentre outros. Nessa fase o ambiente torna-se favorável principalmente para a colonização pelo *S. mutans* que se adere aos colonizadores intermediários, juntamente com o *L. casei* (ALMEIDA et al., 2002; MARSH; MARTIN, 2005).

Quando formado, o biofilme apresenta capacidade de defesa e resistência a antimicrobianos muito maiores do que as mesmas bactérias na forma planctônica (STEWART; COSTERTON, 2001). Dessa forma, podem causar diversos tipos de doenças bucais, estando entre as principais: a doença cárie e as doenças periodontais.

2.2 FORMAÇÃO DO BIOFILME CARIOGÊNICO E DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE DENTAL

Um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de um biofilme cariogênico é uma dieta rica em açúcares rapidamente fermentáveis, sendo esses considerados fatores necessários para o desenvolvimento da doença (SHEIHAM; JAMES, 2015).

A doença cárie é consequência de um processo dinâmico em que a presença de microrganismos em sítios dentários (na forma de biofilmes), por meio da produção de ácidos, causa a dissolução química da estrutura dentária. A partir do

momento em que ocorre variação nas condições externas ao biofilme, há um processo de mudança ambiental o qual favorece o crescimento ou a permanência de determinadas espécies. Quando ocorre a ingestão de açúcares provenientes da dieta, as bactérias presentes no biofilme, por um processo de fermentação, utilizam esses carboidratos como forma de obtenção de energia para sua sobrevivência. O processo de fermentação promove a produção de ácidos os quais reduzem o pH do meio, tornando o ambiente inóspito para diversos tipos de bactérias. Com isso, ocorre uma mudança ambiental e o favorecimento ecológico de bactérias acidúricas, ou seja, bactérias que são capazes de sobreviver e se multiplicar mantendo seu metabolismo em condições ótimas nesse microambiente. O *S. mutans* e o *L. casei* apresentam essas características, o que confere vantagem ecológica frente à outros microrganismos do biofilme. Além disso, essas bactérias são acidogênicas, produzem ácidos rapidamente após exposição à carboidratos da dieta desempenhando um papel importante no processo de desmineralização dental (FEATHERSTONE, 2000; MARSH, 1994; MARSH; MARTIN, 2005).

Uma característica comum da dieta em relação à cárie é a mudança do status nutricional no sítio dental, gerando uma perturbação do equilíbrio da microflora em decorrência de um aumento da atividade microbiana devido a metabolização desses carboidratos pelas bactérias. Esse fenômeno ocorre, pois o açúcar é imediatamente metabolizado pelas bactérias e, através da glicólise, há produção de ácidos como o acético e láctico, dentre outros. A partir do momento em que há redução no pH do biofilme dental, inicia-se o processo de desmineralização dental. Essa variação no pH pode ocorrer ao longo do tempo e a frequência de ingestão de carboidratos define as frequentes quedas de pH e conseqüentemente as perdas minerais dos tecidos dentários. As lesões em esmalte iniciam quando ocorre a queda de pH abaixo do pH crítico do esmalte, sendo ele de 5,5 na ausência de flúor e de 4,5 na sua presença (KIDD; FEJERSKOV, 2004; CURY; TENUTA, 2008). A lesão de cárie desenvolve-se a partir de resultados dos processos metabólicos de microrganismos que estão sobre a superfície dental. Esses metabólitos geram flutuações no pH do biofilme causando modificações no equilíbrio mineral da interface biofilme-dente. Com a presença de carboidratos fermentáveis no meio bucal e o pH estando entre 4,5 e 5,5, este torna-se subsaturado em relação à hidroxiapatita (HA), ocorrendo uma precipitação de cálcio e fosfato que a compõem, ocasionando a desmineralização da superfície dental. Por outro lado, torna-se supersaturado em

relação à Flúorhidroxiapatita (FA), ocorrendo deposição desse mineral na estrutura dental. Na ausência de açúcares fermentáveis e o pH estando acima de 5,5, o meio fica supersaturado, tanto em relação à HA quanto pela FA, ocorrendo deposição de ambos os minerais na estrutura dental. (CURY; TENUTA, 2008; NYVAD; FEJERSKOV, 1997; USHA; SATHYANARAYANAN, 2009). Se o processo de demineralização for superior ao processo de remineralização, com o passar do tempo e com a progressão da perda mineral, a lesão torna-se uma cavidade afetando progressivamente esmalte, dentina e polpa (BJORNDAL; MJOR, 1991).

Torna-se claro, portanto, que a queda de pH somente se torna possível com a ingestão de carboidratos fermentáveis. Esses açúcares presentes na dieta apresentam uma classificação de acordo com suas composições, podendo ser divididos em monossacarídeos, quando compostos por apenas um tipo de sacarídeo (exemplos, glicose e frutose), em dissacarídeos, compostos por dois monossacarídeos (sacarose e lactose, dentre outros) ou em polissacarídeos como amido e maltodextrina. Dentre os dissacarídeos normalmente encontrados na dieta, a sacarose é considerada como o mais cariogênico dos carboidratos por ser fermentável e possibilitar a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECs). Esse dissacarídeo é formado por uma molécula de glicose e uma de frutose. Quando essa ligação é rompida pela ação enzimática de glicosiltransferases produzidas por *S. mutans*, há liberação de uma grande quantidade de energia que possibilita a produção de PECs os quais formam a matriz extracelular do biofilme dental (PAES LEME et al., 2006). Esses PECs proporcionam uma maior integridade estrutural e adesão seletiva de bactérias cariogênicas no biofilme dental e também consolidam essa ligação. A matriz extracelular torna o biofilme dental mais poroso e com volume aumentado o que facilita a difusão de substratos por toda a sua extensão (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; JENKINSON; LAMONT, 1997; PAES LEME et al., 2006).

Com isso, é possível observar uma relação direta entre a presença de lesões cáries com elevada contagem de *S. mutans* na saliva (VICENTE et al., 2008). Segundo o estudo de Fragkou e colaboradores (2016) há uma associação entre cárie e presença de *S. mutans* na saliva e no biofilme dental. Nesse estudo, 97 crianças de 3 a 13 anos de idade foram avaliadas, sendo 46 livres de cárie e 51 cárie ativas, e detectou-se a presença de *S. mutans* em 66% das crianças. Houve uma correlação positiva entre níveis de *S. mutans* com a experiência de cárie. Essa

correlação também é observada no trabalho de Nanda e colaboradores (2015), no qual saliva e biofilme dental foram coletados de 60 crianças com idades entre 3 a 8 anos, apresentando ou não atividade de cárie. Os resultados sugerem uma correlação significativa entre contagem de *S. mutans* na saliva e no biofilme dental e atividade de cárie. Além disso, a densidade de *S. mutans*, tanto na saliva quanto no biofilme, pode ser um indicador de risco para doença cárie. Ainda, o estudo de Chokshi e colaboradores (2016) avaliaram 110 voluntários os quais foram divididos em três grupos: pacientes livres de cárie, pacientes cárie ativos na dentição mista e o último grupo formado por pacientes cárie ativos em dentição permanente. Após exame salivar microbiológico, os autores também encontraram uma forte e positiva correlação entre a presença de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. com a patogênese da cárie dental, sendo que quanto maior a concentração desses microrganismos, maior foi a frequência da doença, demonstrando que o exame salivar microbiológico pode ser importante para a prevenção e diagnóstico da doença. Em acréscimo, maior variabilidade e quantidade de *Lactobacillus* spp. foi encontrada em indivíduos que continham a doença cárie quando comparados àqueles livres de cárie, principalmente nos estágios mais avançados da lesão (CAUFIELD et al., 2015; EMILSON, 1983; KOHLER et al., 1981; LINDQUIST; EMILSON; WENNERHOLM, 1989; NANDA et al., 2015). Esses trabalhos, dentre outros, sugerem que *S. mutans* e que *Lactobacillus* spp. são microrganismos potencialmente cariogênicos.

2.3 USO DO FLÚOR NO CONTROLE DA CÁRIE DENTAL

O flúor é um dos principais agentes anticariogênicos sendo responsável pelo controle da cárie dental, quer seja pelo seu uso coletivo com o consumo de água e sal fluoretados, como também por meios de auto uso com a utilização dentífricos e enxaguatórios fluoretados ou por meios de uso profissional de flúor com a aplicação de géis e vernizes fluoretados pelo profissional (PETERSEN; OGAWA, 2016).

Como descrito anteriormente, quando há queda no pH, ocorre a desmineralização da superfície dentária e o desenvolvimento de lesão de cárie. Entretanto, quando o flúor está presente na cavidade bucal, há uma redução do pH crítico para dissolução do esmalte e da dentina em 1 unidade, sendo 4,5 para esmalte e 5,5 para dentina. Nessa condição, todas as vezes em que o pH estiver abaixo desses valores e maior que 4,5 para esmalte e 5,5 para dentina, haverá

subsaturação em relação à hidroxiapatita, porém o meio estará ainda supersaturado em relação à fluorapatita. Esse processo tem como resultado uma redução na quantidade de cálcio e fósforo inorgânico perdido, que então é recuperado pelo esmalte na forma de fluorapatita. O efeito indireto obtido pelo flúor na redução da desmineralização do esmalte quando o pH se reduz é complementado pelo seu efeito sobre a remineralização quando há aumento do pH. Conseqüentemente, com o flúor presente na cavidade oral, o cálcio e fósforo inorgânico perdidos pelo dente durante a queda de pH podem ser recuperados de maneira mais eficaz após esses desafios cariogênicos (CURY; TENUTA, 2008). Para que esse efeito seja significativo e relevante, o flúor deve estar constantemente presente na cavidade bucal e em baixas concentrações (ROSIN-GRGET et al., 2013).

Dentre os meios individuais de uso do flúor, o dentifrício fluoretado é considerado como um dos mais importantes para prevenção e controle da cárie dental, pois ao mesmo tempo em que há uma desorganização mecânica do biofilme pela escovação, há também a disponibilização de flúor pela utilização do dentifrício fluoretado (TENUTA; CURY, 2010). Dessa forma, o uso de dentifrício fluoretado tem sido considerado como uma das principais causas de redução na prevalência de cárie dental no mundo (ROSIN-GRGET et al., 2013). Em comparação a dentifrícios que não apresentam flúor na sua composição, quando o mesmo encontra-se presente há uma diminuição na perda de minerais o que demonstra o importante papel desempenhado por esse composto na prevenção da desmineralização dental e conseqüente diminuição da experiência de cárie (DAMLE et al., 2016; LIMA et al., 2016). Para que o real efeito anti-cárie esteja presente nos dentifrícios fluoretados, a concentração de flúor solúvel deve ser de pelo menos 1000 ppm de flúor, valor esse encontrado na grande maioria dos cremes dentais comercializados no Brasil que, normalmente, variam entre 1000 à 1500ppm (CURY; CALDARELLI; TENUTA, 2015). De acordo com as normas do Ministério da Saúde, os dentifrícios fluoretados devem ser usados diariamente por toda a população (BRASIL, 2009).

Em casos nos quais os indivíduos não conseguem controlar o desenvolvimento de cárie apenas com a utilização de dentifrício fluoretado, enxaguatórios fluoretados (contendo 0,05% de NaF) podem ser indicados como adjuntos ao processo de controle de doença. Há relatos de que o uso de enxaguatório fluoretado é capaz de controlar o desenvolvimento de cárie dental mesmo em regiões onde há amplo uso de dentifrício fluoretado (MATSUYAMA et al.,

2016). Em acréscimo, revisão sistemática também sugere que o uso de enxaguatório fluoretado é eficaz na prevenção e controle de cárie dental (POULSEN, 2009).

2.4 USO DE ANTIMICROBIANOS PARA CONTROLE DO BIOFILME DENTAL

O controle do acúmulo do biofilme dental, para que se obtenha uma condição compatível com saúde bucal, pode ser realizado através do meio mecânico, químico ou associação de ambos. O controle mecânico, que representa a remoção de biofilme com a escova dental e/ou fio dental, é o principal e mais eficaz método de escolha para controlar o acúmulo de biofilme (SCHEIE; PETERSEN, 1995). Porém, faz-se necessário uma correta técnica de escovação para que a desorganização do biofilme seja efetiva. Para isso, a utilização de hábitos adequados e uma correta instrução de higiene capaz de corrigir maneiras errôneas de escovação do paciente são de suma importância (WESTFELT, 1996). Em acréscimo, com o objetivo de otimizar o controle do acúmulo de biofilme, antimicrobianos têm sido agregados aos produtos para higiene oral.

Dentre os antimicrobianos comumente usados na odontologia, em produtos para higiene bucal, há as moléculas orgânicas catiônicas (clorexidina, sais de amônio quaternário, alcaloides vegetais), sais metálicos (fluoreto estanhoso, citrato de zinco, sulfato de cobre), compostos fenólicos sem carga (triclosan e óleos essenciais), agentes oxigenantes (peróxido de hidrogênio), detergentes (lauril sulfato de sódio (LSS)) e outros possíveis agentes (enzimas, agentes modificadores de superfície, frutas e ervas medicinais).

Dentre todos os antimicrobianos conhecidos, o padrão ouro é a clorexidina (CHX), uma bis-guanidina, disponível nas formas de gluconato, digluconato, acetato e cloridrato, de amplo espectro antimicrobiano e alta substantividade. A CHX atua em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus, sendo os microrganismos Gram-positivos mais sensíveis que os Gram-negativos. Em altas concentrações é considerada bactericida e em baixas concentrações é considerada bacteriostática (JONES, 1997). Os *S. mutans*, por exemplo, apresentam sensibilidade mais acentuada a esse composto quando comparado com outros microrganismos Gram-positivos (EMILSON, 1977; JONES, 1997; TORRES et al., 2000). A ação antimicrobiana da CHX ocorre por meio de interações desse

composto com partes hidrofóbicas presentes na membrana celular das bactérias acarretando em lise e conseqüente morte celular. Por outro lado, existem diversos efeitos colaterais desse composto, tais como: alteração na cor dos dentes, mudança de paladar e sensação de queimação da mucosa bucal, irritação da mucosa bucal, edema da parótida, aumento da precipitação de proteínas salivares e conseqüente formação de cálculo supragengival (CURY, 1997; TORRES et al., 2000). Para tanto, seu uso é restrito e/ou por um curto período de tempo, sendo indicado para pacientes que apresentam necessidades especiais (dificuldades motoras que limitem a escovação mecânica por condições físicas e/ou mentais) e para pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos (TORRES et al., 2000; VLCEK; RAZAVI; KUTTENBERGER, 2015).

Já os compostos quaternários de amônia, como o cloreto de cetilpiridínio e o cloreto de benzalcônio são detergentes catiônicos, cujo método de ação é similar à clorexidina, entretanto esses compostos são removidos mais rapidamente da cavidade bucal tendo, por essa razão, uma baixa substantividade. Com isso, torna-se necessária a utilização desses compostos várias vezes ao dia para que o efeito antimicrobiano seja duradouro. Cabe ressaltar que esses compostos atuam causando o rompimento da parede celular bacteriana, o que provoca a lise celular e conseqüente morte da bactéria. Trabalhos sugerem que esses antimicrobianos são capazes de reduzir o acúmulo de biofilme de maneira significativa (TORRES et al., 2000; SIMÕES et al., 2011). Suas desvantagens abrangem a baixa substantividade e seu uso prolongado pode levar a sensação de queimação, descoloração dos dentes, manchamento da língua, ulcerações na mucosa e aumento dos depósitos de cálculo dental (JENKINS; ADDY; NEWCOMBE, 1994).

Em relação aos estudos sobre sais metálicos, como o zinco e estanho, é possível observar efeitos positivos no controle do biofilme e na saúde gengival. Suas formulações são encontradas como fluoreto estanoso, citrato de zinco e sulfato de cobre. O fluoreto estanoso pode ser encontrado em dentifrícios e apresenta como desvantagem uma baixa estabilidade, além de poder causar manchamento dos dentes. Entretanto, exibe capacidade para controlar biofilme quando utilizado como coadjuvante ao controle mecânico, impedindo a agregação bacteriana no biofilme além de atuar no seu metabolismo. O citrato de zinco, quando encontrado isoladamente, não apresenta resultados eficazes no controle do biofilme, sendo necessária sua associação com o triclosan, para que juntamente com o controle

mecânico, mostre resultados satisfatórios. Já o sulfato de cobre mostra-se tão eficaz quanto à CHX no controle do biofilme e da gengivite, porém, também apresenta indicações e efeitos colaterais semelhantes (BRADSHAW et al., 1993; DAVIES; SCULLY; PRESTON, 2010; HENZ; HILGERT, 2012; TORRES et al., 2000).

Os alcaloides vegetais também são um subgrupo de ervas medicinais muito utilizados na odontologia, sendo seus principais representantes o extrato de malva e a sanguinarina. A malva, por sua vez, apresenta características calmantes, expectorantes, anti-inflamatórias e emolientes, sendo encontrada comercialmente no enxaguatório Malvatricin. Já a sanguinarina é um agente catiônico que gera alteração da superfície celular, atuando na agregação e adesão das bactérias (TORRES et al., 2000).

O triclosan é um composto do tipo fenol sintético, não iônico, com baixa toxicidade e com amplo espectro antimicrobiano. Além disso, apresenta propriedades anti-inflamatórias analgésicas, atuando sobre a gengivite, podendo ser utilizado como adjunto ao controle do biofilme. Sua atuação recai sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, micobactérias e bactérias anaeróbias. Esse composto causa a ruptura da membrana citoplasmática bacteriana o que ocasiona uma desorganização da sua estrutura e conseqüente morte da bactéria. Além disso, inibe determinadas enzimas microbianas. O triclosan pode apresentar ação mais eficaz quando combinado com citrato de zinco, conforme relatado anteriormente. Uma outra combinação é efetuada com o copolímero de Gantrez, o qual é o responsável pelo aumento da substantividade do agente. Além de dentifrícios, o triclosan também pode ser encontrado em enxaguatórios (BRADSHAW et al., 1993; SIMÕES et al., 2011; TORRES et al., 2000).

Outro grupo de antimicrobiano frequentemente usado em produtos para higiene bucal são os agentes fenólicos, como os óleos essenciais, sendo mais comumente encontrados o fenol, timol, eucaliptol, mentol e o metilsalicilato. Esses óleos destroem a parede celular microbiana e inibem o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Outra ação benéfica desses compostos é a de impedir a agregação de colonizadores primários, diminuindo a multiplicação desses microrganismos. Entretanto, esses agentes podem apresentar, como efeito adverso, sensação de queimação e gosto desagradável devido ao alto teor de álcool, além de possuírem baixa substantividade (MONFRIN; RIBEIRO, 2000; SIMÕES et al., 2011; TORRES et al., 2000).

Já os agentes oxigenantes, como o peróxido de hidrogênio, liberam oxigênio no meio sendo letal para bactérias anaeróbias, porém estudos sugerem que esses compostos não devem ser utilizados para o controle do biofilme supragengival por ser, aparentemente, ineficazes, quando utilizados isoladamente (HENZ; HILGERT, 2012; WOLFF et al., 1989).

Os detergentes são os responsáveis por facilitar a limpeza mecânica dos dentes devido a uma possível desagregação do biofilme, sendo o lauril sulfato de sódio (LSS) e o dodecil sulfato de sódio (DSS) os mais comuns (CURY, 2002; MARTINS et al., 2012). Essas substâncias também podem apresentar efeito antimicrobiano e mecanismo de atuação semelhante ao triclosan (JENKINS; ADDY; NEWCOME, 1991). Cabe-se ressaltar que podem ser encontrados tanto em dentifrícios quanto em enxaguatórios (GUSMÃO et al., 2003).

Existem também diversos tipos de enxaguatórios a base de plantas medicinais, como a romã. Há estudos mostrando que a sua utilização ocasiona um aumento do pH salivar e uma diminuição na contagem de *S. mutans*. Suas propriedades benéficas são devido aos flavonoides polifenólicos, como as punicalaginas e o ácido elágico, os quais apresentam características anti-inflamatórias e antioxidantes, além de dificultar a aderência do biofilme à estrutura dental (DEGÁSPARI; DUTRA, 2011; UMAR et al., 2016).

Além dessa substância natural, existe uma gama de outros agentes como o tomilho que apresenta óleos essenciais como o cimol e o timol na sua composição, apresentando ação semelhante, com a destruição da parede celular microbiana e inibindo o desenvolvimento das bactérias. Outra é a sálvia, planta medicinal, que auxilia no tratamento da gengivite e periodontite (TORRES et al., 2000). A própolis, também derivado de plantas medicinais, é mais um antimicrobiano utilizado em dentifrícios e enxaguatórios que vêm sendo estudado nos últimos anos por apresentar efeito antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, sendo mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*. Esse efeito ocorre devido a sua capacidade de desintegrar a membrana citoplasmática e a parede celular bacteriana e inibir a produção de determinadas proteínas essenciais para a sobrevivência das bactérias (AKCA et al., 2016; MOLINA et al., 2008).

Portanto, frente a essa gama de produtos contendo diversos tipos de antimicrobianos nas suas formulações, o objetivo do presente estudo foi avaliar se

esses compostos seriam capazes de desempenhar efeito antimicrobiano contra bactérias cariogênicas, como o *S. mutans* e o *L. casei*.

ARTIGO CIENTÍFICO

“Antimicrobial effects of dentifrices and mouthwashes against cariogenic bacteria – an *in vitro* study”

ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial and biofilm-diet-dependent disease. Use of fluoride associated with dietary counseling and mechanical biofilm removal are strategies adopted for controlling this disease. This way, chemical control of biofilms, based on the use of antimicrobials, could be used as an adjunct of mechanical biofilm removal. Oral hygiene products contain antimicrobials on their composition. Therefore, the present study aims to evaluate the antimicrobial effect of dentifrices (D) and mouthwashes (M) against oral *Streptococcus mutans* (SM) and *Lactobacillus casei* (LC), well-known cariogenic microorganisms. Dentifrice and mouthwashes of the most marketed brands and that had some antimicrobial compound on their composition were obtained being three samples of the same lot number. Antimicrobial effect was first evaluated using "agar disk diffusion" (DF) test. SM and LC were individually cultured in tryptic soy agar plates (TSA) in which sterile filter paper discs impregnated with the product to be evaluated were added. The plates were incubated at 37°C for 48h in microaerophilic condition and the diameter of the inhibition zones were then measured with a digital caliper and the ratio between the diameter and the diameter of the filter paper was calculated. Then, "Time-kill" (TK) test was performed. Suspensions of SM and LC were exposed to the products to be evaluated. Immediately after exposure, and after 1, 3 and 5 minutes aliquots of microbial suspensions were collected, serially diluted and inoculated onto TSA. The TSA plates were incubated at 37°C for 48h in microaerophilic condition and then counts of colony forming units (CFU) was performed at each condition. Solutions of chlorhexidine digluconate 0,12% and sterile saline were used as positive (PC) and negative (NC) controls, respectively. Experiments were carried out in triplicate. The results were evaluated considering a 5% significance threshold. It was observed that all products tested showed an antimicrobial effect superior to the NC on DF for D, except the Luminous White Advanced for LC. Regarding M, all tested products showed greater effect than the NC except Malvatricin with Xylitol and Listerine Zero for SM. Regarding TK, all D were superior to NC at all times for both LC and SM. Regarding M, Malvatricin, Colgate Plax 2-1 and Sensodyne presented similar antimicrobial effect compared with NC after 1 minute of use. Thus, it can be concluded that, despite the limitations of this study, the results suggest that D and almost all M presented antimicrobial effect against SM and LC grown in planktonic form.

Keywords: Dentistry. Dental caries. Antimicrobials. Toothpastes. Rinses.

INTRODUCTION

Dental caries is a dietary-related disease induced due to frequent consumption of dietary carbohydrates (SHEIHAM; JAMES, 2015). After intake of rich and rapidly fermentable sugars, acids produced by dental biofilm induce microbial shifts, in a way that lower pH enhances the growth of acid-tolerant bacteria, such as *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp., and inhibits the growth of acid-sensitive ones (MARSH, 2003). The more frequent the episodes of biofilm acid production followed by pH fall, the faster will be the development of the carious lesion. In this context, several studies have suggested a positive correlation between caries activity and the presence of *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. in both saliva and dental biofilm (EMILSON, 1983; KOHLER; PETTERSEN; BRATTHALL, 1981; LINDQUIST; EMILSON; NANDA et al., 2015; WENNERHOLM, 1989).

In this context, fluoride has been claimed as the most important anticaries agent due to its ability to reduce demineralization when the pH of dental biofilm decreases and activate the remineralization when the pH of dental biofilm increases, therefore reducing the tooth net mineral loss (CURY; TENUTA, 2008; 2014; PETERSEN; OGAWA, 2016). Within fluoridated products, fluoridated dentifrices use has been considered as the most important strategy for dental caries control and prevention, since it provides fluoride to oral cavity at the same time that biofilm is mechanically disrupted by toothbrushing, which enhances the anticaries effect of fluoride (CURY; TENUTA, 2008; 2014). On the other hand, in addition to fluoridated dentifrice use fluoridated mouthwashes may also be prescribed for caries active subjects, with the aim of increasing the amount of available fluoride on oral cavity that will contribute for lesions arrestment (POLSEN, 2009).

Considering the importance of an efficient control of biofilm accumulation of tooth surfaces in terms of caries prevention, both fluoridated dentifrices and mouthwashes contain antimicrobials on their composition. Thus, these antimicrobial substances may act as adjunct on mechanical biofilm removal. It is not clear though whether these antimicrobials present any effect on cariogenic bacteria. Therefore, this study aimed to assess the antimicrobial effect of commonly used fluoridated dentifrices and mouthwashes against *S. mutans* and *L. casei*.

MATERIALS AND METHODS

Selection of test products

Previously to the selection of the test products, a search was done in markets of the central area of Porto Alegre/Brazil with the aim to identify the most frequent sold dentifrices and mouthwashes that contained antimicrobial on their composition. Based on these search, eight types of dentifrices and nine types of mouthwashes (3 products from the same lot number) were selected for this study according to the table below:

Table 1. Dentifrices and antimicrobial components.

Dentifrices	Antimicrobial Components
Colgate® Máxima Proteção Anticáries (lot. 5281BR121J, expiration 10/18)	Sodium Lauryl Sulfate (SLS)
Colgate® Total 12 Clean Mint (lot. 5222BR121B, expiration 08/18)	SLS, Triclosan 0,3%
Colgate® Luminous White Advanced (lot 5069MX1134, expiration 09/16)	SLS, hydrogen peroxide 1%
Colgate® Neutraçucar Fresh Mint (lot 5278BR122C, expiration 10/18)	SLS, Arginine 1.5%
Colgate® Sensitive Pro-Alívio (lot 4143BR122C, expiration 05/18)	SLS, Arginine 8%
Close-Up® Fire-Freeze Intense (lot 30321/ expiration 09/17)	SLS, Zinc Sulfate
Sorriso® Triple Vitamins Extra Fresh (lot 5166BR121H, expiration 06/16)	SLS
Parodontax® Fluoride (lot PAsdsa0J0117Y, expiration 07/17)	<i>Echinacea Purpurea</i> Extract, <i>Commiphora Myrrha</i> Resin Extract, <i>ChamRecutita</i> (Matricaria), Flower Extract, <i>Salvia Officinalis</i> (Sage), Leaf Extract (Tincture Sage 1,2)

Table 2. Mouthwashes and antimicrobial components.

Mouthwashes	Antimicrobial Components
Listerine® Zero (lot 1905B08, expiration 07/2017)	Thymol, Menthol, methyl salicylate, Eucaliptol
Colgate® Plax 2-1 - Cool Mint (lot 5204BR121AH05: 46, expiration 07/2017)	Cetylpyridinium chloride 0.05%
Colgate® Periogard with alcohol (lot 5150BR121A, expiration 05/2018)	Chlorhexidine digluconate 0.12%
Colgate® Periogard without alcohol (lot 5245BR121A, expiration 09/2017)	Chlorhexidine digluconate 0.12%
Colgate® Plax Fresh Mint Zero alcohol (lot 5188BR8512, expiration 07/2018)	Cetylpyridinium chloride 0.05%, Triclosan 0.03%
Malvatricin® with Xilitol (lot 150689/ expiration 10/17)	Triclosan, Malva extract, Xylitol, Tirotricin, Quinosol
Cepacol® Mint (lot 537908, expiration 07/2019)	Cetylpyridinium chloride 0.500 mg
Oral-B® Complete alcohol (lot 52170435P1, expiration 07/2018)	Monohydrated Cetylpyridinium chloride 0.05%
Sensodyne (lot 1512400005, expiration 04/2017)	Cetylpyridinium chloride 0.05%

Growth of Microorganisms

Streptococcus mutans (UA 159) and *Lactobacillus casei* (ATCC 4646) were reactivated from frozen stocks on Tryptic Soy Agar plates (TSA) (Himedia Laboratories PVT®, India) at 37°C for 48 hours under microaerophilic environment. Colony-forming units (CFU) were individually transferred from TSA plates to tubes containing Tryptic Soy Broth (TSB) (Himedia Laboratories PVT®, India) supplemented with 1% sucrose that were incubated for additional 24 hours at 37°C. Tubes were then centrifuged at 3.042 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in sterile 0.9% saline solution to obtain an optical density of 0.5 MacFarland (Probac Brazil, Nefelobac, lot NEFE050510), which corresponds, to approximately 10⁸ CFU/mL (NEGRINI et al., 2015).

Disc-Diffusion Test

About 100 μ L of each microbial suspension was evenly seed on TSA plates. In order to evaluate the antimicrobial effect of dentifrices, a 1:3 dilution (w/v) was prepared: 3 grams of each tested dentifrice was added to 9 mL of sterile 0.9% saline solution in a 15 mL sterile conical tube and vigorously homogenized. Three sterile filter papers discs (8 mm diameter) were impregnated with the suspension of the dentifrices or with the tested mouthwashes and placed on the surface of previously prepared TSA plates containing either *S. mutans* or *L. casei* and incubated at 37°C for 48 hours under microaerophilic environment. Sterile 0.9% saline solution and 0.12% chlorhexidine digluconate (Periogard without alcohol) were used as controls. The diameters of inhibition halos were measured in millimeter with the aid of a digital caliper (Digimess, Shinko Precision Ganging LTD.). The measures were determined from two opposite point located in the outer limits of inhibition halo formed around each disk, including the paper size. The diameter of inhibitory halo was divided by the diameter of the filter paper (8 mm) and results were expressed as ratio of inhibitory halo. Tests were performed in triplicate (NEGRINI et al., 2015).

Time-Kill Test

After adjusting the optical density of each strain, tubes were centrifuged at 3.042 rpm for 10 minutes and the supernatant was discarded. Pellets were resuspended in the tested mouthwashes or in the 1:3 suspensions of dentifrices (as described above). Immediately after resuspension (T0) and after 1, 3 and 5 minutes (T1, T3 and T5), aliquots of microbial suspension were collected, serially diluted in 0.9% sterile saline and plated on TSA plates which were incubated at 37°C for 48 hours. Sterile 0.9% saline solution was used as control. Following plates incubation, counts of CFU of viable cells were determined under a stereomicroscope and results expressed as CFU/mL. Tests were performed in triplicate.

Statistical analysis

The mean and standard deviation of each outcome (ratio of inhibitory halo of tested products and cell viability of *S. mutans* and *L. casei* at T0, T1, T3 and T5) were calculated for each tested condition. The assumptions of equality of variance and normal distribution of errors were checked for all response variables. When no

growth was detected on Time Kill assay, counts of viable cells were considered as equal to 1 and data were log transformed. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effect of the tested products on response variables. Tukey's test was used when ANOVA indicated statistical differences. For non-parametric data, Kruskal-Wallis followed by Dunn's test was used. The response variables of each tested product were also independently compared with the tested controls by T-test or Mann-Whitney test. The level of significance was set as 5%. Analyzes were performed on SigmaPlot 13.0 Software (Systat Software Inc. 2014).

RESULTS

Regarding dentifrices, the ratio of inhibitory halo against *S. mutans* for Colgate Total 12 was statistically higher than Colgate Máxima Proteção Anticáries, Luminous White and Parodontax, but they were not different compared with the other tested dentifrices. For *L. casei*, the inhibitory halo induced by Colgate Total 12 was statistically higher than Luminous White Advanced and Parodontax Fluoride, but no difference was found between Colgate Total 12 and the other tested dentifrices. In all the other tested conditions, with the exception of Luminous White Advanced for *L. casei*, the inhibitory halo induced by the dentifrices was statistically higher than those of negative control (Table 3). The ratio of inhibitory halo of chlorhexidine 0.12% against *S. mutans* and *L. casei* were 2.26 ± 0.09 and 2.16 ± 0.11 , respectively. In relation to cell viability of *S. mutans* and *L. casei*, no difference was found on counts of viable cells at each time point among the tested dentifrices. In all tested conditions, cell viability for both *S. mutans* and *L. casei* for all tested dentifrices were statistically lower than those found on negative control (Table 4 and 5). The mean counts of viable cells (Log (CFU/mL)) of *S. mutans* exposed to the tested dentifrices at T0, T1, T3 and T5 were 3.19 ± 1.36 , 2.55 ± 1.11 , 2.24 ± 0.62 and 1.6 ± 0.0 , respectively. The mean counts of viable cells (Log (CFU/mL)) of *L. casei* exposed to the tested dentifrices at T0, T1, T3 and T5 were 1.89 ± 0.51 , 1.74 ± 0.33 , 1.6 ± 0.0 and 1.6 ± 0.0 , respectively. Additionally, counts of viable cells of *S. mutans* and *L. casei* (Log (CFU/mL)) in the presence of chlorhexidine 0.12% at T0 was 4.51 ± 3.25 and 2.60 ± 1.17 , respectively, and no growth was observed for both strains at T1, T3 and T5.

In relation to mouthwashes, ratio of inhibitory halo against both *S. mutans* and *L. casei* induced by Malvatricin with xylitol and Listerine zero was lower than those induced by the other tested mouthwashes, which did not differ among them. Additionally, the ratio of inhibitory halo induced by Malvatricin with xylitol, Listerine zero and Sensodyne were not statistically different compared with negative control for *S. mutans*. Moreover, the ratio of inhibitory halo induced by Malvatricin with xylitol and Listerine zero were not statistically different compared with negative control for *L. casei* (Table 6). As far as cell viability of *S. mutans*, lower counts at T0 for Colgate Plax Fresh Mint (without alcohol) and Cepacol mint were found compared with Malvatricin with xylitol and Sensodyne, but they were not statistically different compared with the other tested mouthwashes, which were similar among them.

Colgate Plax Fresh Mint (without alcohol) and Cepacol at T0 were statistically different compared with negative control. No difference was found on counts of viable cells of *S. mutans* at T1 among the tested products, and with exception of Colgate Plax 2/1, Malvatricin and Sensodyne, counts were lower than those found on the negative control. At T3, no difference was found on counts of viable cells of *S. mutans* among the tested products and with exception of Sensodyne counts were lower than those found on the negative control. At T5, all products showed lower counts of viable cells and they were statistically different compared with negative control (Table 7). Regarding cell viability of *L. casei*, for all the tested mouthwashes, counts were statistically lower than the negative control and no difference was found among the tested products irrespective to the tested conditions (Table 8). The mean counts of viable cells (Log (CFU/mL)) of *S. mutans* exposed to the tested mouthwashes at T0, T1, T3 and T5 were 3.44 ± 1.53 , 2.88 ± 1.44 , 2.28 ± 0.98 and 1.73 ± 0.23 , respectively. The mean counts of viable cells (Log (CFU/mL)) of *L. casei* exposed to the tested mouthwashes at T0, T1, T3 and T5 were 2.35 ± 1.72 , 2.95 ± 2.09 , 2.26 ± 1.45 and 2.21 ± 1.32 , respectively.

Table 3. Ratio of inhibitory halo induced by the dentifrice slurries against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* on disc diffusion assay (mean \pm sd):

Product	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
1- Colgate Máxima Proteção Anticáries	1.73 ± 0.19 Bb	2.46 ± 0.94 ABb
2 - Colgate Total 12	3.03 ± 0.93 Ab	2.93 ± 0.76 Ab
3 – Luminous White Advanced	1.51 ± 0.18 Bb	1.01 ± 0.02 Ba
4 – Neutraçúcar Mint Refreshing	2.00 ± 0.18 ABb	1.27 ± 0.11 ABb
5 – Sensitive Pró-Alívio	1.91 ± 0.03 ABb	1.41 ± 0.19 ABb
6 – Fire-Freeze Intense	1.90 ± 0.52 ABb	1.88 ± 0.19 ABb
7 – Triple Vitamine (Extra Fresh)	1.89 ± 0.50 ABb	1.50 ± 0.31 ABb
8 – Parodontax Fluoride	1.69 ± 0.46 Bb	1.74 ± 0.25 Bb
0.9% saline (negative control)	1.00 ± 1.00 a	1.00 ± 1.00 a

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested dentifrices by ANOVA followed by Tukey test for *S. mutans* and by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for *L. casei* ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested dentifrices and negative control (saline) by t-test ($p < 0.01$);

Table 4. Cell viability of *Streptococcus mutans* at time zero (T0), and at 1 (T1), 3 (T3) and 5 (T5) minutes after resuspension of bacteria suspension on dentifrice slurries (Log(CFU/mL); mean \pm sd):

Product	Time of incubation (min)			
	T0	T1	T3	T5
1- Colgate Máxima Proteção Anticáries	2.44 \pm 1.46Aa	1.58 \pm 0.03Aa	1.93 \pm 0.77Aa	1.60 \pm 1.60Aa
2 - Colgate Total 12	2.20 \pm 1.03Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.93 \pm 0.57Aa	1.60 \pm 1.60Aa
3 – Luminous White Advanced	4.76 \pm 1.44Aa	3.42 \pm 0.76Aa	3.19 \pm 0.42Aa	1.60 \pm 1.60Aa
4 – Neutraçúcar Mint Refreshing	4.39 \pm 0.75Aa	2.84 \pm 1.01Aa	1.98 \pm 0.66Aa	1.60 \pm 1.60Aa
5 – Sensitive Pró-Alívio	4.53 \pm 2.54Aa	4.25 \pm 2.29Aa	2.90 \pm 1.73Aa	1.66 \pm 1.70Aa
6 – Fire-Freeze Intense	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
7 – Triple Vitamine (Extra Fresh)	1.58 \pm 0.03Aa	1.50 \pm 0.17Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
8 – Parodontax Fluoride	4.06 \pm 2.13Aa	3.63 \pm 1.77Aa	2.83 \pm 2.12Aa	1.60 \pm 1.60Aa
0.9% saline (negative control)	7.45 \pm 0.38b	7.44 \pm 0.38b	7.68 \pm 0.36b	7.65 \pm 0.45b

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested dentifrices ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested dentifrices and negative control (saline) by t-test ($p < 0.05$). T0- Anova followed by Tukey test; T1- Kruskal-Wallis followed by Dunn's test; T3 and T5- Kruskal-Wallis test;

Table 5. Cell viability of *Lactobacillus casei* at time zero (T0), and at 1 (T1), 3 (T3) and 5 (T5) minutes after resuspension of bacteria suspension on dentifrice slurries (Log(CFU/mL); mean \pm sd):

Product	Time of incubation (min)			
	T0	T1	T3	T5
1- Colgate Máxima Proteção Anticáries	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
2 - Colgate Total 12	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
3 – Luminous White Advanced	1.73 \pm 0.51Aa	1.83 \pm 0.40Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
4 – Neutraçúcar Mint Refreshing	2.55 \pm 1.00Aa*	1.66 \pm 0.11Aa	1.66 \pm 0.11Aa	1.60 \pm 1.60Aa
5 – Sensitive Pró-Alívio	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.50 \pm 0.17Aa
6 – Fire-Freeze Intense	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
7 – Triple Vitamine (Extra Fresh)	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
8 – Parodontax Fluoride	2.87 \pm 2.20Aa	2.55 \pm 1.65Aa	1.60 \pm 1.60Aa	1.60 \pm 1.60Aa
0.9% saline (negative control)	8.37 \pm 0.10b	8.35 \pm 0.10b	8.31 \pm 0.03b	8.35 \pm 0.11b

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested dentifrices ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested dentifrices and negative control (saline) by t-test ($p < 0.05$); T0-T5: Kruskal-Wallis test; *Mann-Whitney test in relation to saline.

Table 6. Ratio of inhibitory halo induced by tested mouthwashes against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei* on disc diffusion assay (mean \pm sd):

Product	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
1 – Colgate Plax 2/1 – cool mint	2.29 \pm 0.25 Ab	2.16 \pm 0.54 Ab
2 – Colgate Periogard without alcohol	2.41 \pm 0.12 Ab	2.33 \pm 0.35 Ab
3 – Colgate Periogard with alcohol	2.54 \pm 0.49 Ab	2.28 \pm 0.22 Ab
4 – Colgate Plax Fresh Mint without alcohol	2.23 \pm 0.37 Ab	2.03 \pm 0.9 Ab
5 – Malvatricin with xylitol	1.00 \pm 1.00 Ba*	1.27 \pm 0.47 Ba
6 – Listerine Zero	1.59 \pm 0.66 Ba	1.00 \pm 1.00 Ba*
7 – Cepacol Mint	1.70 \pm 0.28 Ab	1.47 \pm 0.24 Ab
8 – Oral-B Complete without alcohol	2.20 \pm 0.74 Ab	1.98 \pm 0.60 Ab
9 – Sensodyne	1.81 \pm 0.13 Aa	2.17 \pm 0.63 Ab
0.9% saline (negative control)	1.00 \pm 1.00 a	1.00 \pm 1.00 a

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested mouthwashes by ANOVA followed by Tukey test ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested mouthwashes and negative control (saline) by t-test ($p < 0.01$); *Mann-Whitney test in relation to saline.

Table 7. Cell viability of *Streptococcus mutans* at time zero (T0), and at 1 (T1), 3 (T3) and 5 (T5) minutes after resuspension of bacteria suspension on mouthwashes (Log(CFU/mL); mean \pm sd):

Product	Time of incubation (min)			
	T0	T1	T3	T5
1 – Colgate Plax 2/1 – cool mint	3.58 \pm 0.92 ACa	2.38 \pm 1.06 Aa	2.46 \pm 1.48 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
2 – Colgate Periogard without alcohol	4.64 \pm 1.29 ACa	3.82 \pm 2.20 Ab	1.50 \pm 0.17 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
3 – Colgate Periogard with alcohol	2.47 \pm 0.44 BCa	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
4 – Colgate Plax Fresh Mint without alcohol	1.73 \pm 0.11Cb	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
5 – Malvatricin with xylitol	5.84 \pm 0.96 Aa	5.08 \pm 1.41 Aa	3.69 \pm 1.95 Ab	2.23 \pm 0.92 Ab
6 – Listerine Zero	2.93 \pm 2.31 ACa*	2.64 \pm 1.80 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
7 – Cepacol Mint	1.60 \pm 1.60 Cb	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
8 – Oral-B Complete without alcohol	2.81 \pm 1.15 ACa	2.11 \pm 0.88 Ab	2.31 \pm 1.24 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
9 – Sensodyne	5.39 \pm 1.34 ABa	5.16 \pm 1.35 Aa	4.14 \pm 1.13 Aa	2.16 \pm 0.98 Ab
0.9% saline (negative control)	5.24 \pm 2.07 a	5.68 \pm 1.89 a	5.81 \pm 1.63 a	5.97 \pm 1.98 a

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested mouthwashes ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested mouthwashes and negative control (saline) by t-test ($p < 0.05$). T0-T1: - Anova followed by Tukey test; T3: Kruskal-Wallis test; T5- Kruskal-Wallis test; *Mann-Whitney test in relation to saline.

Table 8. Cell viability of *Lactobacillus casei* at time zero (T0), and at 1 (T1), 3 (T3) and 5 (T5) minutes after resuspension of bacteria suspension on mouthwashes (Log(CFU/mL); mean \pm sd):

Product	Time of incubation (min)			
	T0	T1	T3	T5
1 – Colgate Plax 2/1 – cool mint	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
2 – Colgate Periogard without alcohol	1.60 \pm 1.60 Ab	2.04 \pm 0.83 Ab	1.50 \pm 0.17 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
3 – Colgate Periogard with alcohol	1.60 \pm 1.60 Ab	1.83 \pm 0.40 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
4 – Colgate Plax Fresh Mint without alcohol	1.60 \pm 1.60 Ab	1.66 \pm 0.11 Ab	1.66 \pm 0.11 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
5 – Malvatricin with xylitol	3.29 \pm 0.49 Ab	1.50 \pm 0.17 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
6 – Listerine Zero	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.83 \pm 0.40 Ab
7 – Cepacol Mint	1.60 \pm 1.60 Ab	1.50 \pm 0.17 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
8 – Oral-B Complete without alcohol	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab	1.60 \pm 1.60 Ab
9 – Sensodyne	6.71 \pm 0.15 Ab	6.36 \pm 0.47 Ab	5.85 \pm 0.73 Ab	5.43 \pm 0.82 Ab
0.9% saline (negative control)	8.29 \pm 0.08 a	8.41 \pm 0.12 a	8.30 \pm 0.08 a	8.41 \pm 0.13 a

Means followed by distinct upper case letters differ statistically amongst the tested mouthwashes by Kruskal-Wallis followed by Dun's test ($p < 0.05$). Means followed by distinct lower case letters differ statistically between the tested mouthwashes and negative control (saline) by t-test ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Overall, most of the tested products presented antimicrobial effect against the tested cariogenic bacteria. Dentifrices and mouthwashes were able to decrease the cell viability of *S. mutans* and *L. casei* in planktonic conditions. It is interesting to discuss that clinical studies have shown a positive correlation between counts of *S. mutans* in saliva and the number of dental surfaces colonized by these microorganisms (EMILSON, 1983; KOHLER; PETTERSEN; BRATTHALL, 1981; LINDQUIST; EMILSON; WENNERHOLM, 1989). We hypothesize that planktonic bacteria might represent those microorganisms found on saliva. In this context, a reduction on bacteria viability on planktonic conditions could represent lower levels of salivary microorganisms capable of colonizing the dental surfaces. This way, these antimicrobial components could contribute to the mechanical control of biofilms on tooth surfaces.

The present data do not show difference on antimicrobial effect in the comparison between the tested mouthwashes (containing essential oils, triclosan and cetylpyridinium chloride) and those containing chlorhexidine, unlike shown by previous studies (ALBUQUERQUE et al., 2004; PIRES et al., 2006; ANDRE et al., 2011). Conversely, other studies were not able to show differences on antimicrobial effect of chlorhexidine in comparison to other antimicrobial agents (WATANABE et al., 2015; SILVA et al., 2011). Additionally, previous studies have shown better antimicrobial effect of triclosan containing products against salivary bacteria than products containing cetylpyridinium chloride (SIMÕES et al., 2011). Direct comparison of our data with those studies is difficult since experimental conditions are different. Most of the studies used a minimum inhibition dilution assay to evaluate antimicrobial effect of mouthwashes (ALBUQUERQUE et al., 2004; ANDRE et al., 2011; WATANABE et al., 2015), but we chose to use the tested products on its ready-to-use form to better simulate its clinical use. This may be the reason these data are conflicting. Nonetheless, our data show that most of the tested products were effective on the reduction of cell viability being statistically different compared with negative control.

It has been claimed that *Lactobacillus* are less sensitive to chlorhexidine than *S. mutans*. Previous studies have shown that the use of chlorhexidine mouthwash in

orthodontic patients with fixed appliances is able to reduce salivary counts of *S. mutans*, but not *Lactobacillus* (LUNDSTROM; KRASSE, 1987; SARI; BIRINCI, 2007). However, our data showed the viability of *L. casei* decreased faster in the presence of chlorhexidine than the viability of *S. mutans* (Tables 7 and 8), which could be related to the inherent susceptibility of the tested laboratorial strain. Moreover, it seems that the antimicrobial effect of the tested products was more pronounced against *L. casei* since their counts rapidly reduced over the time in the presence of all mouthwashes.

Within the tested conditions, most of the mouthwashes and dentifrices presented an antimicrobial effect within the first minute of use. Studies have also shown that the use of mouthwashes containing antimicrobials in its composition and used by one minute have the capacity to reduce the bacteria count, especially *S. mutans* in the oral cavity (DEHGHANI, 2015; MOREIRA et al., 2008; ZANELA, 2002). However, Malvatricin, Colgate Plax 2/1 and Sensodyne did not exert any antimicrobial effect against *S. mutans* within this period of time. Reduction on *S. mutans* cell viability in comparison to negative control occurred only after 3 minutes for Colgate Plax 2/1 and Malvatricin and after 5 minutes for Sensodyne (Table 7). We think believe that this limits the use of this mouthwashes in clinical experience. Xylitol has been claimed as an antimicrobial substance due to the fact that it inhibits bacterial growth by the fact that it cannot be metabolized by oral microorganisms (HAGHGOO, 2015; MIYASAWA-HORI, 2006). However, its incorporation into mouthwash may not confer any benefit in terms of decreasing cell viability since none effect was found after 1 minute of exposure to Malvatricin. The antimicrobial effect of Malvatricin is conflicting among previous studies. Several studies have shown that Malvatricin presents antimicrobial effect against several microbial species (MOREIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2004; SARMENTO et al., 2013), while no antimicrobial effect against *S. mutans* was found by others (MOREIRA et al., 2009). In order clarify the antimicrobial effect of malva-extract containing products, Moreira et al (2012) verified that hydroxyquinoline, a compound found on Malvatricin, was the responsible one for the antimicrobial effect and not the malva extract *per se*. The difference between our data and those of Moreira et al. (2012) could be related to the fact that the tested strains were different between them. Additionally, triclosan has also been claimed as a good antimicrobial (FORBES et al., 2016; SENTILA, 2013) but its

incorporation into Malvatricin does not enhance the antimicrobial effect of that mouthwash which could be related to its lower concentration in comparison to Colgate Plax Fresh Mint that also contains triclosan and showed a stronger and rapid antimicrobial effect (Table 7). Considering thus this negative result of these mouthwashes under planktonic condition, whether an antimicrobial effect might occur on biofilms is doubtful.

Our data also showed that there is not difference on the antimicrobial effect between mouthwashes with chlorhexidine with and without alcohol in their composition. This is in agreement with studies that showed the presence of alcohol on mouthwashes does not enhance their antimicrobial effects (BORRAJO et al., 2002; ELDRIDGE et al., 1998; QUIRYNEN et al., 2001; VAN STRYDONCK et al., 2005).

Although the inhibitory halo of the dentifrice Luminous White for *L. casei* and mouthwashes Malvatricin and Listerine Zero for both *S. mutans* and *L. casei* had not been different compared with negative control (Tables 3 and 6), these products presented antimicrobial effect against the tested strains on the Time-Kill assay (Tables 4, 5, 7 and 8), suggesting that disc diffusion assay presents limitations on the assessment of the antimicrobial effect of substances. It is important to discuss that the diameter of the inhibitory halo may be more related to the ability of the tested compound be diffused into the agar matrix than to its antimicrobial potential (DICKERT; MACHKA; BRAVENY, 1981; JORGENSEN; FERRARO, 2009). Nonetheless, the disc diffusion assay has been frequently used as a screening method for the assessment of antimicrobial potential of products (AL-MUSSALAM et al., 2006; JOYCHARAT et al., 2012; KIM et al., 2015; NEGRINI et al., 2015; SONG et al., 2006) because it is simple, practical and a standardized method (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

It is important to consider that the effects found in this study were in planktonic conditions. There are differences on antimicrobial effects between planktonic and biofilm conditions (DRENKARD; AUSUBEL, 2002; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; PEREIRA et al., 2016). Thus, although an antimicrobial effect has been found under the tested conditions, *in vitro* biofilm models must also be used to evaluate the ability of these products on decreasing the cell viability.

Therefore, based on our data, it can be concluded that most of the tested products presented an antimicrobial effect against *S. mutans* and *L. casei*. Colgate Plax 2/1, Sensodyne and Malvatricin mouthwashes (based on cetylpyridinium chloride and malva extract) exerted slower antimicrobial effect against *S. mutans*. Additionally, it seems the antimicrobial effect is faster against *L. casei* than in *S. mutans*.

REFERENCES

- ALBUQUERQUE, R. F. Jr. et al. Reduction of salivary *S. aureus* and mutans groups streptococci by a preprocedural chlorhexidine rinse and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinium. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 35, no, 8, p. 635-640, Sept. 2004.
- AL-MUSALLAM T. A. et al. Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. **Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.**, St. Louis, v. 129, no. 2, p. 145-151, Feb. 2006.
- ANDRÉ, R. F. G. et al. Prevalence of mutans streptococci isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 22, no. 1, p. 62-67, 2011.
- BORRAJO, J. L. et al. Efficacy of chlorhexidine mouthrinse with and without alcohol: a clinical study. **J. Periodontol.**, Indianápolis, v. 73, no. 3, p. 317-321, Mar. 2002.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. Evidence-based recommendation on toothpaste use. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 28, no. 1, p. 1-7, 2014.
- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 20, no. 1, p. 13-16, 2008.
- DEGHANI, M. et al. Combined chlorhexidine-sodium fluoride mouthrinse for orthodontic patients: clinical and microbiological study. **J. Clin. Exp. Dent.**, Sine loco [S. I.], v. 7, no. 5, p. 569-575, 2015.
- DRENKARD E.; AUSUBEL F. M. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. **Nature**, London, v. 416, p. 740-743, Apr. 2002.
- DICKERT H.; MACHKA K.; BRAVENY I. The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. **Infection**, Munich, v. 9, no. 1, p. 18-24, Jan. 1981.
- ELDRIDGE, K. R. et al. Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 80, no. 6, p. 685-690, Dec. 1998.
- EMILSON, C. G. Prevalence of Streptococcus mutans with different colonial morphologies in human plaque and saliva, **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 91, p. 26-32, 1983.
- FORBES S. et al. Simultaneous assessment of acidogenesis-mitigation and specific bacterial growth-inhibition by dentifrices. **PloS. One.**, San Francisco, v. 11, no. 2, Feb. 2016.
- HAGHGOO R. et al. Comparing the efficacy of xylitol-containing and conventional chewing gums in reducing salivary counts of Streptococcus mutans: An in vivo study. **J. Int. Soc. Prev. Community Dent.**, Mumbai, v. 5, no. 2, p. 112-117, Dec. 2015.
- JOYCHARAT N. et al. Anti-streptococcus mutans efficacy of Thai herbal formula used

as a remedy for dental caries. **Pharm. Biol.**, London, v. 50, no. 8, p. 941-947, 2012.

JORGENSEN J. H.; FERRARRO M. J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 49, no. 11, p. 1749-55, Dec. 2009.

KIM R. J. et al. An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 60, no. 10, p. 1497-1502, Oct. 2015.

KOHLER, B.; PETERSSAN, B. M.; BRATTHALL, D. Streptococcus mutans in plaque and saliva and the development of caries. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, no. 1, p.19-25, 1981.

LINDQUIST B.; EMILSON C. G.; WENNERHOLM K. Relationship between mutans streptococci in saliva and their colonization of the tooth surfaces. **Oral. Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 4, no. 2, p. 71-76, 1989.

LUNDSTROM, F.; KRASSE B., Streptococcus mutans and lactobacilli frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. **Eur. J. Orthod.**, Oxford, v. 9, no. 2, p. 109-116, May 1987.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiol.**, Whashington, v. 149, n. 2, p. 279-294, Feb. 2003.

MIYASAWA-HORI H.; AIZAWAW S.; TAKAHASHI N. Difference in the xylitol sensitivity of acid production among Streptococcus mutans strains and the biochemical mechanism. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 21, no. 4, p. 201-205, 2006.

MOREIRA, A. C. A. et al. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 7, no. 3, p. 266-272, Set./Dez. 2008.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 8, no. 2, p. 153-161, May/Ago. 2009.

MOREIRA J. S. M.; FERREIRA M. B. C.; HASHIZUME L. N., In vitro antimicrobial activity of the components of a mouthwash containing malva sylvestris. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 12, no. 4, p. 505-509, 2012.

NANDA, J. et al. Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts using saliva and plaque as microbial risk indicators in 3-8 year old children. A cross sectional study. **J. Clin. Exp. Dent.**, Sine loco [S. l.], v. 7, no. 1, p. 114-118, Feb. 2015.

NEGRINI T. C. et al. Avaliação do efeito da 8-hidroxiquinolina em bactérias de interesse odontológico – estudo in vitro. **Rev. Saúde & Ciência**, Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 114-121, 2015.

- O'TOOLE G.; KAPLAN H. B.; KOLTER R., Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.
- PEREIRA C. A. et al., Antibacterial activity of baccharis dracunculifolia in planktonic cultures and biofilms os Streptococcus mutans. **J. Infect. Public. Health**, Oxford, v. 9, no. 3, p. 324-330, May/June 2016.
- PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Prevention of dental caries through the use of fluoride--the WHO approach. **Community Dent. Health.**, London, v. 33, no. 2, p. 66-68, June 2016.
- PIRES, J. R.; ROSSA, C. J.; PIZZOLITTO, A. C. In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 21, no. 4, p. 342-347, 2007.
- POLSEN S. Fluoride-containing gels, mouth rinses and varnishes: an update of evidance of efficacy. **Eur Arch Paedriatr Dent**, Leeds, v. 10, n. 3, p. 157-61, Sept 2009.
- QUIRYNEN, M. et al. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 28, no. 12, p. 1127-1136, Dec. 2001.
- SARI, E.; BIRINCI I., Microbiological Evaluation of 0,2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patientes. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 77, no. 5, p. 881-884, 2007.
- SARMENTO, D. J. S. et al. Antimicrobial potential of the popular antiseptics Anapyon, Água Rabelo and Malvatricin against oral microorganisms. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 13, no. 4, p. 309-314, Out./Dez. 2013.
- SENTILA R. et al., In vitro evaluation and comparison of the antimicrobial potency of commercially available oral hygiene products against streptococcus mutans. **Indian. J. Med. Sci.**, Mumbai, v. 65, no. 6, p. 250-259, June 2011.
- SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 94, no. 10, p. 1341-1347, Oct. 2015.
- SILVA R. P. R. et al., In vitro evaluation of antimicrobial activity of mouthrinses. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 68, no. 1, p. 91-94, 2011.
- SONG J. H. et al., In vitro anti-cariogenic activity of dichloromethane fraction from rheum undulatum l. root. **Arch. Pharm. Res.**, Seoul, v. 29, np. 6, p. 490-496, June 2006.
- SOUZA G. C. et al., Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 90, n. 1, p. 135-143, Jan. 2004.
- SIMÕES R. P. R. et al., In vitro evaluation of antimicrobial activity of mouthrinses. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 68, no. 1, p. 91-94, 2011.
- VAN STRYDONCK, D. A. C. et al. Plaque inhibition of two commercially avaiable chlorhexidine mouterinses. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, no. 3, p. 305-309, Mar. 2005.

WATANABE E. et al., Antiseptic mouthwashes: in vitro antibacterial activity. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 28, no. 2, p. 180-184, 2015.

ZANELA, N. L.; BIJELLA, M. F.; ROSA, O. P. The influence of mouthrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, no. 2, p. 101-106, June 2002.

6 CONCLUSÃO

De forma geral, podemos concluir que, dentro das limitações desse estudo, a maioria dos produtos testados apresentaram efeito antimicrobiano contra *S. mutans* e *L. Casei*. Malvatricin® com Xilitol, Colgate® Plax 2 em 1 e do Sensodyne® (com base no cloreto de cetilpiridínio e extrato de malva) exerceram um efeito antimicrobiano mais lento contra *S. mutans*. Além disso, parece que o efeito antimicrobiano é mais rápido contra *L. Casei* do que contra *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. F. et al. Streptococci microbiota associated with initial formation on plaque. **R. Ci. Méd. Biol.**, Salvador, v. 1, no. 1, p. 33-41, nov. 2002.
- AKCA, A. E. et al. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with Chlorhexidine against oral pathogens: an in vitro study. **Biomed. Res. Int.**, New York, v. 2016, p. 1-8, Feb. 2016.
- BJORNDAL, L.; MJOR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries – Characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 32, no. 9, p. 717 – 736, Oct. 2001.
- BRADSHAW, D. J. et al. The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 72, no. 1, p. 25-30, Jan. 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil**. Brasília 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. **Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – resultados principais**. Brasília, 2012.
- CAUFIELD, P. W. et al. Oral Lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 94, no. 9, Suppl., p. 110S-118S, Sept. 2015.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 83-90.
- CHOKSHI, A. et al. A correlative study of the levels of salivary Streptococcus mutans, Lactobacilli and Actinomyces with dental caries experience in subjects with mixed and permanent dentition. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, Chennai, v. 20, no. 1, p. 25-28, Jan./Apr. 2016.
- CURY, J. A. Uso do flúor e controle da Cárie como doença. In: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Liv. Santos, 2001. p. 31-68.
- CURY, J. A. Controle químico da placa dental. In: KRIGER, L. (Coord.). **ABOPREV: promoção de saúde bucal**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. Cap. 7, p.129-140.
- CURY, J. A. Dentifrícios: como escolher e como indicar. In: CARDOSO, R. J. C.; GONÇALVES, E. A. N. **Odontologia: odontopediatria e prevenção**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. v. 4, p. 281-295.
- CURY, J. A.; CALDARELLI, P. G.; TENUTA, L. M. Necessity to review the Brazilian regulation about fluoride toothpastes. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 49, no. 74, 2015.

- CURY, J. A.; TENUTA, L. M. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. **Adv. Dent. Res.**, Whashington, v. 20, no. 1, p. 13-16, 2008.
- DAMLE, S. G. et al. Effect of dentifrices on their remineralizing potential in artificial carious lesions: an in situ study. **Dent. Res. J. (Isfahan)**, Mumbai, v. 13, no. 1, p. 74-79, Jan./Feb. 2016.
- DAVIES, R.; SCULLY, C.; PRESTON, A. J. Dentifrices - an update. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 15, no. 6, p. 976-982, Nov. 2010.
- DEGÁSPARI, C. H.; DUTRA, A. P. C. Phytotherapy properties from promagranate (*Punica granatum L.*) **Visão Acad.**, Curitiba, v. 12, no.1, p. 36-46, Jan./July 2011.
- DOGAN, A. A. et al. Microbiological evaluation of octenidine dihydrochloride mouth rinse after 5 days' use in orthodontic patients. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 79, no. 4, p. 766-772, July 2009.
- EMILSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to Chlorhexidine. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 85, no. 4, p. 255-265, May 1977.
- FEATHERSTONE, J. D. B. The science and practices of caries prevention. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 131, n. 7, p. 887-899, July 2000.
- FERRAZZANO, G. F. et al. Is *Stevia rebaudiana bertonii* a non cariogenic sweetener? A review. **Molecules**, Basel, v. 21, no. 1, p. 38-50, Dec. 2015.
- FINE, D. H. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. **Periodontol.** 2000, Copenhagen, v. 8, p. 87-107, June 1995.
- FRAGKOU, S. et al. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, Leeds, v. 17, no. 5, p. 367-375, Oct. 2016.
- GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 63, no. 3, p. 378-385, Mar. 1984.
- GRIFFIN, S. O. et al. Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 86, no. 5, p. 410-415, May 2007.
- GUSMÃO, E. S. et al. Clinical application of dentifrices. **Int. J. Dent.**, Recife, v. 2, no. 2, p. 231-235, 2003.
- HANNIG, C.; HANNIG, M. The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. **Clin. Oral Investig.**, Belin, v. 13, no. 2, p. 123-139, June 2009.
- HEAD, D. A.; MARSH, P. D.; DEVINE, D. A. Non-lethal control of the cariogenic potential of an agent-based model for dental plaque. **PLoS. One**, San Francisco, v. 9, no. 8, p. e105012, 2014.
- HENZ, S. L.; HILGERT, L. C. Controle químico do biofilme dental. In: COELHO-DE-SOUZA, F. H. et al. **Tratamentos clínicos integrados em Odontologia**. Rio de Janeiro. Revinter, 2012. p. 75-83.

- HUGO W. B.; LONGWORTH A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v. 16, no. 10, p 655-662, Oct. 1964.
- JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, no. 6, p. 441-444, July 1994.
- JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOME, R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthrinses (II). Effects of 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, no. 2, p. 145-148, Feb. 1991.
- JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 8, no. 2, p. 175-200, 1997.
- JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 15, p. 55-62, Oct. 1997.
- KIDD, E. A.; FEJERSKOV, O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 83, p. 35-38, 2004.
- LIMA, C. V. et al. Caries, toothbrushing habits, and fluoride intake from toothpaste by brazilian children according to socioeconomic status. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 38, no. 4, p. 305-310, 2016.
- LISTGARTEN, M. A. The structure of dental plaque. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 5, p. 52-65, June 1994.
- LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, Whashington, v. 50, no. 4, p. 353-380, Dec. 1986.
- MARINHO, V. C. et al. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents (review) . **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, v. 29, no. 7, p. 1-138, July 2016.
- MARINHO, V. C. et al. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. **J. Dent. Educ.**, Whashington, v. 67, no. 4, p. 448-458, Apr. 2003.
- MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Whashington, v. 8, no. 2, p. 263-271, July 1994.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiol.**, Whashington, v. 149, n. 2, p. 279-294, Feb. 2003.
- MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental plaque as a biofilm. **J. Ind. Microbiol.**, Houndsmills, v. 15, no. 3, p. 169-175, Sept. 1995.
- MARSH, P.; MARTIN, M. V. Placa dentária. In: MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. São Paulo. Liv. Santos, 2005. p. 58-81.
- MARSH, P.; MARTIN, M. V. A microflora oral residente. In: MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. São Paulo: Liv. Santos, 2005. p. 34-57.

MARTINS, R. S. et al. Composition, active ingredients and clinical indications of dentifrices: a literature review between 1989 and 2011. **J. Health Sci. Inst.**, São Paulo, v. 30, no. 3, p. 287-291, 2012.

MATSUYAMA, Y. et al. School-based fluoride mouth-rinse program dissemination associated with decreasing dental caries inequalities between Japanese prefectures: an ecological study. **J. Epidemiol.**, Tokyo, v. 26, no. 11, p. 563-571, Apr. 2016.

MOLINA, F. P. et al. Propolis, salvia, calêndula and casto – antifungal activity of natural extracts on *Candida Albicans* strains. **Cien. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v. 11, no. 2, p. 86-93, Abr./June 2008.

MONFRIN, R. C. P.; RIBEIRO, M. C. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 91-94, 2011.

MORAN, J.; ADDY, M.; ROBERTS, S. A comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, no. 8, p. 578-582, Sept. 1992.

NANDA, J. et al. Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts using saliva and plaque as microbial risk indicators in 3-8 year old children. A cross sectional study. **J. Clin. Exp. Dent.**, [S. l.], v. 7, no. 1, p. 114-118, Feb. 2015.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 25, no. 1, p. 69-75, Feb. 1997.

PAES LEME, A. F. et al. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 85, no. 10, p. 878-887, Oct. 2006.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. Prevention of dental caries through the use of fluoride - the WHO approach. **Community Dent. Health.**, London, v. 33, no. 2, p. 66-68, June 2016.

POULSEN, S. Fluoride-containing gels, mouth rinses and varnishes: an update of evidence of efficacy. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, Leeds, v. 10, no. 3, p. 157-161, Sept. 2009.

ROSIN-GRGET, K. et al. The cariostatic mechanisms of fluoride. **Acta Med. Acad.**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 179-88, Nov. 2013.

SAVABI, O. et al. Effects of biosurfactant produced by *Lactobacillus casei* on gtfB, gtfC, and ftf gene expression level in *S. mutans* by real-time RT-PCR. **Adv. Biomed. Res.**, Mumbai, v. 3, no. 3, p. 231-258, 2014.

SCHEIE, A. A.; PETERSEN F. C. Cariologia clínica. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento**. 2. ed. São Paulo: Liv. Santos, 1995. p. 265-276.

SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 94, no. 10, p. 1341-1347, Oct. 2015.

SIMÕES, R. C. S. et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of mouthrinses. **Rev. bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 68, no. 1, p. 91-94, Jan./June 2011.

STECKSEN-BLICKS, C.; GUSTAFSSON, L. Impact of oral hygiene and use of fluorides on caries increment in children during one year. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 14, no. 4, p. 185-189, Aug. 1986.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, London, v. 358, n. 9276, p. 135-138, July 2001.

TENUTA, L. M.; CURY, J. A. Fluoride: its role in dentistry. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 24, Suppl. 1, p. 9-17, 2010.

TORRES, C. R. G. et al. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, São José dos Campos, v. 3, n. 2, July/Dez. 2000.

UMAR, D. et al. The effect of pomegranate mouthrinse on Streptococcus mutans count and salivary pH: An in vivo study. **J. Adv. Pharm. Technol. Res.**, Mumbai, v. 7, no. 1, p. 13-16, Jan./Mar. 2016.

USHA, C.; SATHYANARAYANAN R. Dental caries - A complete changeover (Part I). **J. Conserv. Dent.**, Mumbai, v. 12, no. 2, p. 46-54, Apr. 2009.

VADEBONCOEUR, C.; PELLETIER, M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 19, no. 3, p. 187-207, Feb. 1997.

VAN DER WEIJDEN, G. A.; HIOE, K. P. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, Suppl. 6, p. 214-228, 2005.

VICENTE, V. A. et al. Report between the caries disease prevalence and microbial risk. **Cienc. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v. 11, no. 2, p. 44-48, Apr./June 2008.

VLCEK, D.; RAZAVI, A.; KUTTENBERGER, J. J. Wound management and the use of mouth rinse in mandibular third molar surgery. **Swiss. Dent. J.**, Bern, v. 125, no. 10, p. 1085-1093, 2015.

WESTFELT, E. Rationale of mechanical plaque control. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, no. 3, pt. 2, p. 263-267, Mar. 1996.

WOLFF, L. F. et al. Four-year investigation of salt and peroxide regimen compared with conventional oral hygiene. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 118, no. 1, p. 67-72, Jan. 1989.

XIAO, J. et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 8, no. 4, 2012.