

Braz J Health, 2010; 1: 37-46

Efeito da Aplicação da Clorexidina no Controle de Estreptococos Mutans do Biofilme Oclusal

Effects of chlorhexidine application protocols on mutans streptococci of the occlusal biofilm

Mariane Emi Sanabe^{1,2}, Cristiane Motisuki¹, Thais de Cássia Negrini¹, Denise Madalena Palomari Spolidorio³, Josimeri Hebling¹

¹Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Araraquara, SP; ²Faculdade de Odontologia da Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO, São Paulo, SP; ³Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Araraquara, SP.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da clorexidina em diferentes protocolos, na população de estreptococos mutans (SM) do biofilme oclusal de molares permanentes em erupção. Quarenta pares de molares permanentes contralaterais hígidos foram aleatoriamente divididas em 4 grupos. Nos grupos CLXV1 e CLXV3 o tratamento foi realizado com verniz de clorexidina 1%, para os grupos CLXG1 e CLXG3 foi utilizada clorexidina gel 1% e a frequência de aplicação foi de uma ou três aplicações. Uma amostra de biofilme foi coletada dos molares, antes a aplicação e durante os períodos de avaliação. Os dados de UFC de SM foram submetidos aos testes de Friedman e Wilcoxon. Todos os tratamentos reduziram significativamente o número de SM até o período de 7 dias, entretanto CLXG3 manteve esta redução até o período de 30 dias. A tripla aplicação do gel de clorexidina 1% apresentou o melhor efeito longitudinal de redução de SM.

Palavras-chaves: Clorexidina; Placa dentária; *Streptococcus mutans*

Abstract

The aim of this study was to compare the effects of chlorhexidine in different protocols on the number of mutans streptococci (MS) in the occlusal biofilm of erupting permanent molars. Forty pairs of contralateral sound molars in eruption were selected. For CHXV1 and CHXV3 groups the treatment was done with varnish containing 1% chlorhexidine while for CHXG1 and CHXG3 groups, it was used 1% chlorhexidine gel. Regarding the frequency of application received a single or three. A sample of plaque was collected from the occlusal surface previous application and during the evaluation periods. The obtained data were submitted to Friedman and Wilcoxon tests. Although significant reduction in MS levels was observed for all chlorhexidine treated groups up to 7 days, only CHXG3

maintained this significant reduction up to 30 days. The triple application of 1% chlorhexidine gel was the most effective in controlling MS in the occlusal biofilm.

Key-words: Chlorhexidine; Biofilms; *Streptococcus mutans*.

Introdução

A anatomia oclusal complexa dos molares favorece uma maior retenção de restos alimentares e bactérias, criando zonas vulneráveis ao desenvolvimento de lesões de cárie. Em fase de erupção, esta suscetibilidade pode ser agravada devido a fatores como presença do tecido gengival recobrindo parte da superfície, posição em infraoclusão não permitindo que estes dentes participem da função mastigatória, localização posterior dificultando a higienização apropriada¹ e mineralização incompleta do esmalte.

Medidas preventivas globais e específicas são adotadas para impedir a manifestação da doença ou controlar sua evolução principalmente em pacientes de alto risco ao desenvolvimento da doença cárie. Os selantes de fossas e fissuras, por exemplo, têm demonstrado uma alta eficiência na proteção específica de superfícies oclusais², entretanto existe uma grande preocupação quanto a sua utilização indiscriminada, desequilibrando a equação da relação custo-benefício. Molares em erupção representam um desafio a indicação deste método específico de prevenção, devido a impossibilidade de sua aplicação em condições favoráveis, especialmente, ausência de contaminação salivar³. Por ser uma situação transitória de alto risco local uma alternativa para estes

casos seria recorrer a utilização de agentes químicos para controle da formação e acúmulo do biofilme oclusal^{4,5}.

A clorexidina é um dos agentes antimicrobianos mais investigados, considerada superior a outras substâncias no controle quantitativo e qualitativo da formação do biofilme bacteriano, devido sua alta substantividade^{6,7}. O efeito médio de inibição de cárie promovido pela clorexidina pode variar entre 35 e 75%⁸, o que torna a utilização dessa substância relevante no controle da doença. Entretanto, vários protocolos de utilização vêm sendo recomendados, os quais incluem como principais covariáveis o método e a frequência de aplicação⁹.

A clorexidina é comumente comercializada na forma de gel, enxaguatório bucal, verniz, e como parte da formulação de dentifrícios. As soluções e dentifrícios são mais utilizados quando o objetivo da terapia é obter uma redução generalizada do nível de estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal, enquanto que em situações isoladas de risco, como no caso dos molares em erupção, o verniz e o gel seriam mais apropriados. Preconizando este tipo de terapia, a ocorrência de possíveis efeitos indesejáveis da clorexidina seria minimizada, como

pigmentação dos dentes e principalmente de restaurações estéticas¹⁰ e alteração do paladar¹¹. Porém, ainda é necessário definir um protocolo de aplicação da clorexidina a 1% no controle do SM na fase transitória de alto risco em que se encontram os dentes em erupção.

O objetivo deste trabalho foi comparar a efetividade de diferentes protocolos de aplicação do gel e verniz de clorexidina a 1%, após uma única ou três aplicações, no controle de estreptococos do grupo mutans no biofilme da superfície oclusal de molares permanentes em fase de erupção.

Material e Métodos

Foram convidadas a participar deste estudo clínico randomizado duplo cego 40 crianças entre 05 e 13 anos de idade, apresentando primeiros ou segundos molares em erupção. Os responsáveis pelos menores participantes receberam todas as informações necessárias sobre a pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Para a inclusão no estudo, foram considerados os seguintes critérios: presença de no mínimo primeiros ou segundos molares permanentes contralaterais clinicamente hígidos até o estágio 4 de erupção, segundo a classificação de Dennison, Straffon e More¹²,

apresentando acúmulo de biofilme excessivo sobre a superfície dentária, contagem inicial de estreptococos do grupo mutans no biofilme oclusal UFC/ml $\geq 10^4$, e aceitação do termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídas, as crianças que por algum motivo estivessem fazendo uso de antibiótico antes ou viessem a fazê-lo no transcorrer da pesquisa.

A amostra foi dividida aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 10 pares de molares cada (10 crianças), sendo um dos dentes utilizado como controle negativo e o outro para aplicação de clorexidina (*split-mouth design*). Para os Grupos CLXV1 e CLXV3 o tratamento foi realizado com verniz contendo 1% em peso de diacetato de clorexidina e timol (Cervitec[®], Vivadent, Schaan, Liechtenstein), enquanto que para os Grupos CLXG1 e CLXG3, utilizou-se uma fórmula manipulada de digluconato de clorexidina a 1% (Fármacia Santa Paula, SP, Brasil), na forma de gel. Quanto a frequência de aplicação, os grupos CLXG1 e CLXV1 receberam apenas uma aplicação de clorexidina, e os Grupos CLXG3 e CLXV3 receberam três aplicações com intervalo de uma semana entre cada sessão.

Não houve indução para qualquer tipo de mudança relacionada à higiene bucal ou hábito dietético dos participantes.

Coleta da amostra e tratamento com clorexidina

Previamente a aplicação de clorexidina, de acordo com seu respectivo grupo, uma

amostra de biofilme foi coletada da região de fissuras de cada dente, controle e experimental, para se obter os dados microbiológicos iniciais, quanto ao número de estreptococos do grupo mutans (SM) presente. Esta coleta foi realizada por meio de um pincel microbrush esterilizado, friccionado ao longo do sulco central, e imediatamente transferido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina isotônica e esferas de vidro. Em seguida, pedra pomes e escova Robinson foram utilizadas em baixa rotação para profilaxia dos dentes. Após lavagem e secagem, os dentes foram isolados com auxílio de rolos de algodão. Os dentes incluídos no grupo experimental CLXV1 receberam uma fina camada de verniz aplicada em toda superfície oclusal por meio de um pincel descartável. Após 30 segundos, o isolamento relativo foi retirado e o paciente instruído, de acordo com as orientações do fabricante, a permanecer por 30 minutos sem ingerir líquidos, 3 horas sem ingerir alimentos sólidos e 24 horas sem escovação. Este mesmo procedimento repetiu-se por mais 2 vezes para CLXV3, com intervalo de uma semana entre cada aplicação, com exceção da profilaxia que foi efetuada apenas na primeira sessão, segundo recomendações de Twetman e Petersson¹³. Para os grupos experimentais CLXG1 e CLXG3, uma quantidade de gel de clorexidina suficiente para cobrir toda a superfície oclusal, foi aplicada por 30 segundos, sendo posteriormente removidos os excessos, com bolinhas de algodão. Esta

prática foi realizada mais duas vezes para o CLXG3, com exceção da profilaxia. As recomendações com os cuidados pós-tratamento foram os mesmos já descritos para aplicação do verniz. Para os dentes do grupo controle, os mesmos procedimentos clínicos foram realizados, substituindo-se a aplicação de clorexidina, por solução salina, servindo como controle negativo. O paciente não era informado em qual dos dentes a solução de clorexidina havia sido aplicada. Novas coletas de placa de cada dente, controle e experimental, foram realizadas 7, 30 e 90 dias após a última aplicação de clorexidina. O processamento laboratorial das amostras de biofilme foi realizada de forma cega por um dos autores, o qual não participou da fase clínica do estudo.

Procedimentos bacteriológicos

As amostras foram processadas sempre dentro de no máximo 2 horas após a coleta, dispersas durante 1 minuto, através de um agitador de tubos (MA162, Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda. Piracicaba, São Paulo, Brasil), e diluídas em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-4} em solução tampão fosfato 0,05M pH 7,3. Placas de Petri contendo meio de ágar Sacarose Bacitracina (SB20), que é o meio seletivo para cultivo e crescimento de SM foram divididas em quadrantes, determinando-se uma área para inoculação em duplicatas, de 25µl de cada diluição. As placas SB20 foram incubadas em microaerofilia, empregando-se o sistema

GasPak (Jarras de Anaerobiose; Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda. Piracicaba, São Paulo, Brasil), e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C por 48 horas.

As colônias de SM foram contadas em contador de colônias eletrônico digital (CP600 Plus; Phoenix Industria e Comercio de Equipamentos Científicos, Araraquara. São Paulo, Brasil). O limite mínimo de colônias determinado para considerar uma detecção de microrganismos foi de 30 UFC. Assim, uma quantidade de colônias inferior a este número foi considerada de valor zero. Em relação ao limite máximo de contagem foi estipulado que quantidades de colônias superiores a 300 UFC fossem caracterizadas como infinito, atribuindo-lhes o valor 301 UFC. De acordo com os limites máximo e mínimo determinados, sempre que possível, a contagem foi realizada em apenas um dos quadrantes, que apresentasse quantidades de UFC dentro desse intervalo. A partir dos valores de UFC obtidos foi determinada uma média por mililitro para cada amostra.

Análise estatística

Os dados obtidos a partir das culturas microbiológicas foram transformados em logarítimos com o objetivo de se reduzir a dispersão dos resultados. Desde que valores nulos de UFC foram observados, a constante 1 foi somada a todos os valores antes de sua transformação. Em seguida, esses dados foram analisados estatisticamente através do teste

não paramétrico de Friedman, considerando-se como variáveis independentes, o produto (gel ou verniz) e a frequência de aplicação (1 ou 3 semanas), complementado por testes de Wilcoxon. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

Resultados

As médias e desvios-padrões do número de UFC de SM, após transformação logaritmica, para os grupos experimentais e seus respectivos controles estão apresentadas na Tabela 1. Os valores iniciais de contagem de SM foram estatisticamente iguais para todos os grupos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Tabela 1. Médias (desvios-padrões) do número de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus* do grupo *mutans* [$\log_{10}$ (UFC+1)] para os grupos experimentais e controles, de acordo com os protocolos de aplicação da clorexidina e período de avaliação.

Grupo	Período			
	Baseline	7 dias	30 dias	90 dias
CLXV1	5,24 ± 0,92 a**	3,59 ± 2,70 b	4,12 ± 2,42 a	4,44 ± 2,62 a
CLXV1_Controle*	4,85 ± 0,97 a	3,8 ± 2,26 a	4,06 ± 2,40 a	4,17 ± 2,55 a
CLXV3	5,5 ± 0,43 a	2,83 ± 2,70 b	3,15 ± 2,70 a	4,62 ± 2,14 a
CLXV3_Controle	5,43 ± 0,95 a	4,71 ± 2,24 a	4,46 ± 2,18 a	4,85 ± 2,34 a
CLXG1	5,14 ± 1,16 a	2,81 ± 3,08 b	3,95 ± 2,51 a	3,58 ± 2,36 a
CLXG1_Controle	5,25 ± 1,24 a	5,21 ± 0,90 a	3,53 ± 2,97 a	3,97 ± 2,57 a
CLXG3	5,61 ± 0,99 a	2,24 ± 2,17 b	1,71 ± 2,60 b	4,63 ± 2,84 a
CLXG3_Controle	5,53 ± 0,78 a	4,34 ± 2,57 a	4,91 ± 2,96 a	5,01 ± 2,90 a

* Sem aplicação de clorexidina

**Dentro de cada grupo (avaliação longitudinal), letras iguais representam médias que não diferem estatisticamente (Wilcoxon, $\alpha = 0,05$)

Quando os grupos foram avaliados longitudinalmente, a aplicação do teste de

Friedman revelou significância entre os períodos de avaliação apenas para a clorexidina gel aplicada por 3 vezes ($p=0,03$). Quando testes foram aplicados para a comparação dos períodos aos pares (Wilcoxon), todos os tratamentos foram efetivos na redução do número de SM até o período de 7 dias. Entretanto, apenas o grupo clorexidina gel aplicada por 3 vezes apresentou supressão significativa do número de SM até o período de 30 dias. Para todos os grupos controles, nenhuma redução foi observada. Aos 90 dias, em todos os grupos experimentais, foi observado retorno do número de SM aos níveis detectados inicialmente, antes da realização dos tratamentos.

A Figura 1 representa o comportamento longitudinal de cada grupo experimental e controle negativo.

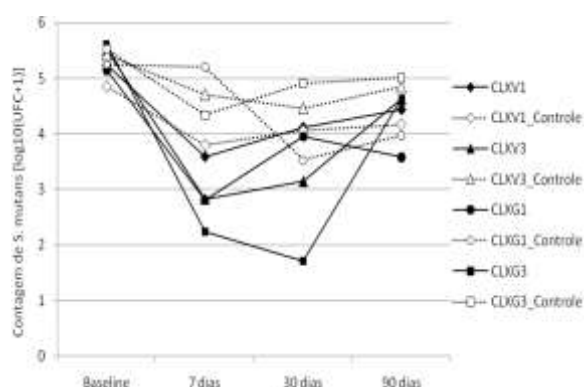


Figura 1. Comportamento longitudinal dos grupos experimentais (linhas contínuas) e controles (linhas pontilhadas) segundo os protocolos de aplicação da clorexidina, no controle da população de *Streptococcus mutans* do biofilme oclusal de molares permanentes em erupção.

Discussão

A clorexidina tem sido considerada o agente antimicrobiano de eleição no controle químico do biofilme dentário. Produtos contendo esse agente antimicrobiano têm sido amplamente utilizados para o controle da doença cárie devido a sua capacidade de reduzir significativamente os níveis de *S. mutans* por períodos prolongados^{7,14,15}, sem causar diminuição da suscetibilidade desses microrganismos a esse fármaco¹⁶. Tratamentos com clorexidina chegam a reduzir em média 46% a incidência de lesões de cárie, o que pode ser considerado um efeito substancial⁸. Entretanto, a eficácia do tratamento pode ser influenciada por diversos fatores como a concentração¹⁷, a frequência¹⁸, o modo de aplicação¹⁹ e o veículo utilizado²⁰. Essas covariáveis associadas a diferenças no sítio de análise de redução microbiana (saliva, biofilme interdental, biofilme oclusal) dificultam a comparação direta dos resultados do presente estudo com outros da literatura⁹.

Ao analisar o efeito inibitório dos diferentes veículos utilizados nesse estudo, gel e verniz, sobre o crescimento in vitro de SM, resultado superior foi observado para o gel de clorexidina, embora a mesma concentração desse agente antimicrobiano tenha sido utilizada para ambas as formulações. Em um estudo in vitro realizado por Huizinga, Riben e Arends²¹ foi observado que após 3 meses de controle, o verniz de clorexidina liberou apenas 20% da droga. Devido a essa lenta liberação do agente antimicrobiano, a ação

dos vernizes de clorexidina pode ser limitada in vivo, uma vez que esses podem ser removidos pela higiene bucal ou dieta do indivíduo antes mesmo que a ação da droga seja plenamente exercida. Os resultados in vivo observados no presente estudo confirmam essa possibilidade. Embora todos os protocolos analisados, independente do veículo e da frequência de utilização, tenham reduzido de forma significativa a quantidade de SM presente na superfície oclusal até 7 dias após a aplicação de clorexidina 1%, apenas a forma gel aplicada por 3 vezes com intervalo de 7 dias entre as aplicações manteve a redução de SM até o período de 30 dias após a última aplicação.

O aumento da frequência de aplicação do verniz de clorexidina não resultou em maior eficiência do tratamento no controle do biofilme oclusal. Contrário a esses resultados, Ie e Schaeken²² observaram que a aplicação repetida do verniz de clorexidina foi mais eficaz do que uma única aplicação, no controle microbiológico do biofilme da superfície oclusal de pré-molares e molares. Da mesma forma, estudos desenvolvidos por Twetman e Petersson^{13,23} demonstraram supressão significativa de *S. mutans* até 3 meses após a utilização do mesmo verniz de clorexidina, Cervitec, utilizado no presente estudo. Tal diferença pode estar relacionada ao sítio de avaliação. Nos dois estudos de Twetman e Petersson^{13,23} citados acima, o verniz de clorexidina foi utilizado na superfície proximal a qual facilita a retenção

física do agente uma vez que não sofre a ação direta das forças mastigatórias. Para superfícies sujeitas diretamente ao impacto da mastigação, como no caso das superfícies oclusais, formulações que permitam uma liberação mais rápida do agente antimicrobiano seriam preferíveis. Isso seria ainda mais relevante para dentes completamente erupcionados e em oclusão com o antagonista.

Araújo, Naspitz, Chlotti e Cai²⁴ realizaram três aplicações do mesmo verniz de clorexidina utilizado nesse estudo com intervalos de 3 meses entre cada aplicação e verificaram redução significativa dos níveis de SM presentes no biofilme oclusal, e ausência de lesões de cáries em todos os dentes que receberam o tratamento após dois anos de acompanhamento. Entretanto, no estudo mencionado, as crianças receberam aconselhamento dietético e escovação supervisionada durante o transcorrer do experimento, o que pode ter favorecido os resultados observados. No trabalho de Haunsen et al.²⁵ foi observada redução de lesões de cárie em fase inicial através de um conjunto de ações preventivas como escovação, aconselhamento dietético, aplicação de flúor e clorexidina entre outros, entretanto a efetividade de cada procedimento no resultado obtido foi mascarada. No presente estudo, nenhuma orientação adicional foi dada aos voluntários, na tentativa de isolar o efeito exercido pelo tratamento realizado.

A redução dos níveis SM observadas no presente estudo poderia ser relacionada a melhor higiene bucal realizada pelos pacientes uma vez que os mesmos estavam conscientes de que o estudo avaliava a formação do biofilme. Do ponto de vista ético, o objetivo do estudo deve estar claramente apresentado no termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários. Entretanto, o comportamento dos níveis de SM observados para os grupos do controle negativo elimina completamente esta possibilidade. Nenhuma redução de SM foi observada para esses grupos, mesmo 7 dias após a aplicação dos produtos. Esse fato também nos permite afirmar que não ocorreu efeito cruzado significativo do tratamento aplicado em um lado da cavidade bucal, o que também poderia influenciar os resultados dos grupos controle negativo.

Para todos os grupos tratados com clorexidina foi observada a recolonização da superfície oclusal após apenas 30 dias da aplicação do agente antimicrobiano, com exceção do grupo onde o gel de clorexidina foi aplicado 3 vezes, no qual os níveis de SM voltaram aos inicialmente detectados após 90 dias. O curto período de supressão de SM observado no presente estudo pode estar relacionado à morfologia da superfície oclusal dos molares. Em fissuras que se apresentam mais estreitas e profundas, há maiores oportunidades de sobrevivência desses microrganismos ao tratamento com clorexidina, permitindo sua reprodução em

locais não alcançados pelo agente antimicrobiano ²⁶. Além disso, devido à administração da clorexidina ser restrita à superfície oclusal, ocorre uma rápida recolonização dessa área, por meio da saliva infectada pelas outras superfícies dentárias contaminadas ¹⁹. Desta forma, uma aplicação generalizada de clorexidina poderia reduzir o nível de microrganismos por mais tempo ²⁰. Porém, para evitar efeitos indesejáveis dessa substância, em casos de molares em erupção não há necessidade de uma supressão por um longo período, uma vez que essa condição é temporária. De acordo com nossos resultados, 3 aplicações de gel de clorexidina (1x/semana), somente na superfície oclusal, seriam suficientes para controlar a população de SM até a erupção completa dos molares.

Devido à dificuldade em se manter a supressão prolongada de SM tem sido sugerido que haja uma associação de orientações sobre saúde bucal e aconselhamento dietético ¹⁸. A adição de flúor ao tratamento também pode auxiliar na redução da atividade cariogênica desses microrganismos ²⁷ e o controle mecânico do biofilme dentário deveria prevalecer sobre o controle químico.

Conclusão

Os protocolos de aplicação da clorexidina investigados no presente estudo reduziram de maneira significativa a população de SM presente na superfície oclusal de molares em erupção, até 7 dias após a

aplicação do agente antimicrobiano. Entretanto, apenas a utilização do gel de clorexidina 1% aplicado 3 vezes com intervalo de 1 semana entre cada aplicação manteve a supressão desse grupo de microrganismos até 30 dias após sua utilização.

Referências

1. Carvalho JC, Ekstrand KR, Thylstrup A Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption. *J Dent Res.* 1989; 68 (5): 773-779.
2. Simonsen RJ. Pit and fissure sealant: review of the literature. *Pediatr Dent.* 2002; 24 (5): 393-414.
3. Feigal RJ, Musherure P, Gillespie B, Levy-Polck M, Quelhas I, Hebling J Improved sealant retention with bonding agents: A clinical study of two-bottle and single-bottle systems. *J Dent Res.* 2000; 79 (11): 1850-1856.
4. Brathall D, Serinirach R, Rapisuwon S, Kuratana M, Luangjarmekorn V, Luksila K, Chapanich P A study into the prevention of fissure caries using an antimicrobial varnish. *Int Dent J.* 1995; 45 (4): 245-254.
5. Joharji RM, Adenubi JO Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9-month clinical evaluation. *J Dent.* 2001; 29 (4): 247-254.
6. Jones CG Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000; 15: 55-62.
7. Petti S, Hausen H Caries-preventive effect of chlorhexidine gel applications among high-risk children. *Caries Res.* 2006; 40 (6): 514-521.
8. Van Rijkom HM, Truin GJ, van't Hof MA A meta analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res.* 1996; 75 (2): 790-795.
9. Zhang Q, van Palenstein, Helderma WH, van't Hof MA, Truin GJ Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 (6): 449-455.
10. Sheen S, Banæeld N, Addy M The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining in vitro- a developmental method. *J Dent.* 2001; 29 (2): 99-102.
11. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav.* 2001;74 (1-2): 85-99.
12. Dennison JB, Straffon LH, More FG Evaluating tooth eruption on sealant efficacy. *J Am Dent Assoc.* 1990;121 (5): 610-614.
13. Twetman S, Petersson LG Effect of different chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in interdental plaque and saliva. *Caries Res.* 1997; 31 (3): 189-193.
14. Du MQ, Tai HJ, Lo ECM, Fan MW, Bian ZMW A two-year randomized clinical trial of chlorhexidine varnish on dental caries in chinese preschool children. *J Dent Res.* 2006; 85 (6): 557-559.
15. Schaeken MJM, van der Hoeven JS, van den Kieboom CWA Effect of chlorhexidine varnish on streptococci in dental plaque from occlusal fissures. *Caries Res.* 1994; 28 (4): 262-266.
16. Järvinen H, Pienihäkkinen K, Huovinen P, Tenovuo J Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to antimicrobial agents after short-term oral chlorhexidine treatments. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103 (1): 32-35.
17. Schaeken MJM, Van Der Hoeven JS, Hendriks JCM Effects of varnishes containing chlorhexidine on the human dental plaque flora. *J Dent Res.* 1989; 68 (12): 1786-1789.
18. Wallman C, Krasse B, Birkhed D, Diacono S The effect of monitored chlorhexidine gel treatment on mutans streptococci in margins of restorations. *J Dent.* 1998; 26 (1): 25-30.
19. Emilson CG, Gisselsson H, Birkhed D Recolonisation pattern of mutans streptococci after suppression by three different modes of chlorhexidine gel application. *Eur J Oral Sci.* 1999; 107 (3): 170-175.
20. Wallman C, Birkhed D Effect of chlorhexidine varnish and gel on mutans streptococci in margins of restorations in adults. *Caries Res.* 2002; 36 (5): 360-365.
21. Huizinga ED, Ruben JL, Arends J Chlorhexidine and thymol release from a varnish system. *J Biol Buccale.* 1991; 19 (4): 343-348.
22. Ie YL, Schaecken MJM Effect of single and repeated application of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in plaque from fissure of premolar and molar teeth. *Carie Res.*1993; 27 (4): 303-306.
23. Twetman S, Petersson LG Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res.* 1998; 32 (2): 113-118.
24. Araújo AMPG, Naspitz GMCC, Chelotti A, Cai S Effect of Cervitec on mutans streptococci in plaque and on caries

formation on occlusal fissures of erupting permanent molars.

Caries Res. 2002; 36 (5): 373-376.

25. Hausen H, Seppä L, Poutanen R, Niinimaa A, Lahti S, Kärkkäinen S, Pietilä I Noninvasive control of dental caries in children with active initial lesions. Caries Res. 2007; 41 (5): 384-391.

26. Kozai K, Wang HJ, Sandham HJ, Phillips Changes in strains of mutans streptococci induced by treatment with chlorhexidine varnish. J Dent Res. 1991; 70 (9): 1252-1257.

27. Twetman S, Petersson LG Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of mutans streptococci. Caries Res. 1997; 31 (5): 361-365.

Recebido em: 17/05/2009

Aceito em: 11/08/2009

Endereço para Correspondência:

Mariane Emi Sanabe

Rua Costa Aguiar, 2324 - Ipiranga São Paulo SP CEP

042040-002. Telefone: (11) 8966-2772

email: emisanabe@hotmail.com