

# A SALIVA E SEUS PRODUTOS – SUA IMPORTÂNCIA NA PERIODONTIA: REVISÃO DA LITERATURA

Saliva and your products – your importance in periodontics: literature review

Taís Browne de Miranda<sup>1</sup>, Isabelle Schalch Campos<sup>2</sup>, José Roberto Cortelli<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Aluna do Programa de Doutorado em Odontologia, Departamento de Odontologia – Universidade de Taubaté, Taubaté/SP - Brasil

<sup>2</sup> Aluna do Programa de Mestrado em Odontologia, Departamento de Odontologia – Universidade de Taubaté, Taubaté/SP - Brasil

<sup>3</sup> Professor Assistente, Núcleo de Pesquisa Periodontal – Universidade de Taubaté, Taubaté/SP - Brasil

Recebimento: 29/01/19 - Correção: 01/03/19 - Aceite: 23/04/19

## RESUMO

A saliva é um fluido biológico bucal secretado por glândulas salivares e tem grande participação na regulação da microbiota bucal. Atualmente diversas áreas da pesquisa científica adotam o uso da saliva na elaboração de diagnósticos e previsibilidade de terapias afins. Esta tendência se deve ao fato de que o uso da saliva é uma fonte rica de informações moleculares e sua aquisição é relativamente simples por ser uma técnica não invasiva, de fácil coleta, baixo custo, indolor e segura. A saliva pode ser usada no diagnóstico precoce de doenças sistêmicas (câncer, doenças infecciosas e cardiovasculares) e diversas substâncias orgânicas e inorgânicas podem ser detectadas, assim como drogas e seus metabólitos e marcadores biológicos. Particularmente em periodontia, o uso da saliva pode ser importante no diagnóstico, na quantificação de bactérias, na avaliação de interleucinas, nitrato e nitrito entre outros. Assim, o objetivo desta revisão de literatura é atualizar clínicos e periodontistas em relação a importância da saliva como uma ferramenta valiosa no diagnóstico e no monitoramento da condição do hospedeiro em relação às patologias periodontais.

**UNITERMOS:** Doenças periodontais; Saliva; Diagnóstico; DNA. R Periodontia 2019; 29: 60-64.

## INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é a primeira interface em que patógenos entram em contato com o hospedeiro, estabelecendo mecanismos de defesa imune inata e adaptativa. A saliva tem papel importante na modulação da microbiota bucal, sendo ela um fluido biológico secretado por glândulas salivares, como glândulas parótida, submandibular e sublingual. É composta principalmente de água (entre 94-99%) e, dentre outros compostos estão: eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos), imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados (ureia e amônia). Inclui-se também à saliva bactérias e metabólitos bacterianos, células epiteliais e leucócitos. O fluxo médio diário salivar varia entre 1 a 1,5L e possui pH (potencial hidrogeniônico) entre 5,3 e 7,8, sendo assim, ligeiramente ácida. Os componentes salivares são multifuncionais (realizam mais de uma função), redundantes (funções semelhantes) e anfifuncionais (agem a favor ou contra o hospedeiro). As principais funções da saliva são:

lubrificação e proteção; ação antibacteriana; digestão e sabor. Parâmetros como o volume da saliva e sua composição bioquímica diferem entre os indivíduos e são influenciados pela idade, gênero e hábitos alimentares (Humpherey & Williamson, 2001; Chojnowska *et al.*, 2018; Cross & Ruhl, 2018; Bhattarai *et al.*, 2018).

As superfícies dos dentes após a exposição ao ambiente bucal são imediatamente cobertas com uma camada de proteínas salivares, chamada de película adquirida. Após poucos minutos, interações moleculares específicas dão início à primeira fase de formação do biofilme dental, já que permitem a ligação de bactérias bucais à película adquirida (Heller *et al.*, 2016). A doença periodontal pode ser caracterizada como destrutiva e é o resultado de um processo inflamatório nos tecidos periodontais de proteção e suporte dos dentes desencadeado por bactérias patogênicas presentes no biofilme dental (Maciel *et al.*, 2016). Atualmente são reconhecidos como fatores de risco à doença periodontal o tabagismo e bactérias específicas chamadas periodontopatogênicas. Existe ainda outros fatores que

podem ser apontados como prováveis fatores de risco, entre eles destaca-se a obesidade, nível sócio-econômico-cultural, cálculo dental, estresse e depressão, consumo de álcool, idade e gênero (Souza *et al.*, 2010).

Diversas áreas da pesquisa científica utilizam a saliva como um meio diagnóstico relevante por esta ser uma fonte não invasiva, de fácil coleta, baixo custo, indolor e segura (tanto para o sujeito quanto para o pesquisador), que pode refletir o estado de saúde/doença do indivíduo. Adicionalmente, facilita a análise repetida durante o monitoramento, sendo possível recuperá-la diversas vezes. Pode ser usada também no diagnóstico precoce de doenças sistêmicas, como por exemplo câncer, doenças infecciosas e cardiovasculares. Já em estudos farmacocinéticos, a saliva é utilizada no monitoramento terapêutico de diferentes drogas (Humphrey & Williamson, 2001; Ganowicz, 2011; Marti-Alamo *et al.*, 2012; Kochurova & Kozlov, 2014; Karched *et al.*, 2017; Chojnowska *et al.*, 2018). Laboratórios forenses podem avaliar o perfil genético dos indivíduos utilizando o DNA recuperado de fluidos corporais (incluindo a saliva) e/ou tecidos presentes em cenas de crimes (Kaufman & Lamster, 2002).

Como a doença periodontal é multifatorial, as pesquisas em periodontia exploram as possibilidades do uso da saliva para fins diagnósticos, detectando e quantificando bactérias salivares relacionadas à doença, como as bactérias do complexo vermelho de Socransky *et al.* (1998) (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A identificação destas espécies pode ser realizada por cultura microbiológica e/ou análise do DNA. Atualmente os métodos de análise do DNA ganham popularidade por serem considerados mais simples, rápidos, específicos e sensíveis quando comparados à cultura microbiológica (Karched *et al.*, 2017). Também são realizadas análises de melatonina (Lodhi *et al.*, 2016); marcadores de estresses oxidativos (Gumus *et al.*, 2015); interleucinas (IL), como por exemplo IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6 (Al-Hamoudi *et al.*, 2018; Yarkac *et al.*, 2018).

Levando em consideração a importância da coleta da saliva como meio auxiliar no diagnóstico da doença periodontal, o objetivo desta revisão é fornecer informações adicionais para que clínicos, especialistas e pesquisadores possam adotar esta técnica como uma ferramenta importante em suas investigações clínicas.

Realizou-se uma busca eletrônica na base de dados em literatura odontológica e médica internacional (Pubmed – Biblioteca nacional de medicina US; ScienceDirect – *Science, health and medical journals*). A busca foi realizada em bases de dados científicos limitando-se ao idioma inglês e utilizando as seguintes palavras-chave: *saliva*, *homeostasis* e *periodontitis*

e *periodontal disease* e *diagnostic*. Em seguida, os títulos e os resumos identificados foram avaliados e selecionados de acordo com sua relevância.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Coleta de saliva

A saliva é um fluido biológico e sua coleta deve ser adequadamente otimizada para redução de erros, diante disso, a técnica de coleta e a duração variam de acordo com o desenho do estudo. Na coleta, o indivíduo expõe a saliva em um recipiente de vidro ou plástico esterilizado de forma natural e passiva ou na forma estimulada (Kaufman & Lamster, 2002; Bhattarai *et al.*, 2018).

De acordo com Chojnowska *et al.*, (2018), muitos pesquisadores recomendam a saliva como excelente material para diagnóstico bioquímico, toxicológico e imunológico da cavidade bucal e doenças sistêmicas. Diversas substâncias orgânicas e inorgânicas podem ser detectadas, assim como drogas e seus metabólitos e marcadores biológicos. Segundo Kaufman & Lamster (2002) a coleta da saliva pode ser considerada o melhor material para pesquisas científicas em humanos do ponto de vista ético. Uma grande vantagem da coleta de saliva é a sua não-coagulação e sua estabilidade, comprovada desde que mantida à temperatura ambiente por 24 horas e por uma semana a 4°C. No estudo de Bhattarai *et al.* (2018), os autores sugerem congelamento imediato de amostras de saliva a -20°C, porém, podem ser armazenadas a 4°C, mas não mais que seis horas. Afirmam ainda que, quando armazenadas a -80°C sofrem pouca ou nenhuma degradação ao longo de anos preservando assim a sua viabilidade. Inibidores enzimáticos também podem ser adicionados à saliva para aumentar o tempo de preservação da amostra.

Em estudos clínicos, as amostras de DNA extraídas da saliva são comumente conservadas a -80°C até que o material possa ser analisado. O tempo de armazenamento depende do desenho do estudo. Karched *et al.* (2017) avaliaram diferentes preparações de amostras de saliva: saliva total (*in natura*) e, após centrifugação, sobrenadante e precipitado. Também avaliaram se o tempo de preservação afeta a quantidade de DNA de bactérias selecionadas contida na amostra. Foi realizada a análise por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) para quantificação de *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Streptococcus mutans*. As concentrações de DNA não se alteraram nos diferentes tipos de preparos, porém a estabilidade do DNA das bactérias foi significativamente maior em amostras de sobrenadante. Ficou demonstrado neste estudo que o DNA

purificado da saliva pode ser preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  sem perda de DNA por pelo menos 6 meses.

No processo de extração do DNA de bactérias orais, é de suma importância sua purificação. Um fator que pode interferir na purificação de bactérias Gram-positivas é a grande quantidade de peptidoglicanos presentes na parede celular. Por isso, é essencial escolher a melhor metodologia para este processo (Karched *et al.*, 2017).

### **Análises salivares na doença periodontal**

Não é rara a ocorrência de gengivite gestacional, de ocorrência geralmente no segundo e terceiro meses da gestação. Além disso, na gravidez existem mudanças psicológicas (preocupações e ganho de peso), que podem afetar o estado de saúde periodontal e fisiológicas, afetando o sistema imunológico materno; uma dessas mudanças consiste no aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), causando o estresse oxidativo. O estresse oxidativo está relacionado com a severidade da doença periodontal, que por sua vez se correlaciona com a gravidez causando alguns resultados adversos, como por exemplo bebês de baixo peso (Gumus *et al.*, 2015; Yarkac *et al.*, 2018). Para investigar marcadores de estresse oxidativo em níveis salivares de gestantes e suas associações com parâmetros clínicos periodontais (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem), Gumus *et al.* (2015) avaliaram 115 mulheres grávidas, 115 mulheres em processo pós-parto e 72 mulheres sistemicamente saudáveis e não grávidas (controle). Os autores observaram que a identificação precoce de marcadores de estresse oxidativo na saliva pode ser de grande valor clínico no tratamento periodontal de gestantes.

O impacto da terapia periodontal não cirúrgica considerando a presença de hormônios relacionados ao estresse na saliva e níveis de citocinas no fluido crevicular gengival em mulheres grávidas e não grávidas foram avaliados por Yarkac *et al.* (2018). Os autores observaram que a terapia periodontal melhorou significativamente a condição periodontal e os níveis de estresse salivares. Afirmaram ainda que a severidade da inflamação gengival durante o período gestacional estava associada ao estresse.

A doença periodontal tem como característica importante a liberação de radicais livres (derivados de bactérias e/ou resposta imune do hospedeiro). A melatonina tem sido investigada, pois afeta processos fisiológicos como por exemplo a ativação do sistema imunológico; e está presente livremente na saliva (Lodhi *et al.*, 2016). Lodhi *et al.* (2016) observaram os níveis de melatonina na saliva em indivíduos de 18 a 65 anos, alocados em três grupos: grupo controle

(periodontalmente saudáveis); gengivite; e periodontite. Identificaram que os níveis de melatonina foram mais elevados no grupo periodontite, seguido de gengivite e grupo controle. Ainda, todas as amostras foram positivas para melatonina e correlacionadas com índice gengival e profundidade de sondagem. Os resultados levaram os autores a concluir que a gravidade da doença periodontal está diretamente relacionada com o aumento nos níveis de melatonina salivar. Adicionalmente, indicam que a melatonina salivar pode atuar como um biomarcador diagnóstico para doenças periodontais.

A obesidade tem sido associada com a doença periodontal, pois sabe-se o tecido adiposo secreta diversas citocinas pró-inflamatórias que podem influenciar na progressão da doença periodontal (Al-Hamoud *et al.*, 2018). Para avaliar o efeito do tratamento periodontal (raspagem por quadrante – RQ) sobre os parâmetros clínicos periodontais e níveis salivares de IL-6 em indivíduos com periodontite crônica, obesos e não-obesos, Al-Hamoudi *et al.* (2018) realizaram um ensaio clínico prospectivo separando a população em dois grupos: grupo 1 (indivíduos obesos e não obesos, com periodontite crônica); e grupo 2 (indivíduos obesos e não-obesos, sem periodontite crônica). Os autores identificaram que indivíduos do grupo 1 tiveram sangramento à sondagem e profundidade de sondagem maiores em comparação ao grupo 2. Já os níveis salivares de IL-6, medidos através do teste ELISA, foram maiores no grupo 1 aos seis meses de acompanhamento. Os autores puderam concluir que a RQ é eficaz na inflamação periodontal tanto em indivíduos obesos quanto não-obesos e que a periodontite crônica pode influenciar na expressão dos níveis de IL-6.

Choi *et al.* (2018) determinaram a prevalência e quantificação de 9 patógenos periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Campylo bacterrectus*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Eikenella corrodens*) em amostras de saliva utilizando qPCR em adultos jovens (< 35 anos) periodontalmente saudáveis. O patógeno periodontal mais prevalente foi *F. nucleatum*, seguido por *P. anaerobius*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *C. rectus*, e *T. denticola*. Não houve diferença significativa na prevalência das bactérias de acordo com o gênero. Os autores inferiram que a análise da saliva permitiu identificar diversas espécies microbianas mesmo em indivíduos periodontalmente saudáveis.

Em um estudo retrospectivo Funahara *et al.* (2018) investigaram a relação entre a condição bucal e o número de bactérias na saliva em 112 idosos ( $\geq 65$  anos). Como a população idosa japonesa cresceu rapidamente e há relatos de que a higiene bucal pode estar associada à pneumonia

aspirativa (uma das principais causas de morte dos idosos), os autores concluíram que o aumento de bactérias na língua está correlacionado com a quantidade de bactérias presentes na saliva, ou seja, os idosos necessitam de cuidados como alimentação, gargarejo e limpeza da língua.

A presença de nitrito salivar tem sido considerada nos estudos clínicos, pois altos níveis de nitrito salivar são encontrados em indivíduos com doença periodontal, se comportando como um fator biológico para a homeostase bucal e sistêmica (Cortelli *et al.*, 2015). Em 2007, Reher *et al.* compararam os níveis de óxido nítrico em saliva total estimulada de indivíduos com e sem periodontite crônica e os correlacionaram com parâmetros clínicos periodontais. Foram analisados 30 indivíduos, divididos em três grupos: indivíduos sem periodontite; com periodontite moderada; e com periodontite avançada. As amostras de saliva foram coletadas com estimulação mastigatória. Os níveis de nitrito foram maiores em indivíduos com periodontite avançada. Ainda, observaram correlação positiva entre os níveis de nitrito e com profundidade de sondagem  $\geq 4$ mm. Os autores destacaram que a periodontite e sua gravidade estão relacionadas com a concentração de nitrito salivar, indicando que o nitrito pode ser um importante marcador biológico.

Em um estudo clínico randomizado de seis meses, Cortelli *et al.* (2015) avaliaram os efeitos de protocolos terapêuticos periodontais sobre os níveis de nitrito salivar e sua relação com bactérias totais e periodontopatogênicas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii*). Foram avaliados 90 indivíduos em seis grupos: RQ + clorexidina (CHX); RQ + placebo; apenas RQ; *fullmouth disinfection* (FMD) + CHX; FMD + placebo; apenas FMD. Os dados foram avaliados no início, em três e seis meses após a terapia. Os autores encontraram que os níveis de nitrito não tendem a mudar com o tempo, porém, se correlaciona negativamente com níveis bacterianos e com porcentagem de bolsas periodontais profundas. Diante disto, concluíram que os níveis de nitrito na saliva foram levemente afetados pelo tratamento periodontal e que a relação entre nitrito com os níveis bacterianos após o protocolo terapêutico periodontal parece fraca. A terapia de raspagem exibiu maior influência na concentração de nitrito do que o uso da clorexidina.

Mitsui & Harasawa (2017) investigaram os efeitos de três tipos de enxaguatórios bucais (óleos essenciais, iodo-povidine e CHX) na atividade redutora de nitrato e nos níveis de *Veillonella dispar* (bactéria bucal redutora de nitrato). Os participantes usaram o enxaguatório designado e ingeriram 110mg de nitrato. Em seguida, foi feita a coleta de saliva no momento, uma, cinco e dez horas após. Foi observado

aumento significativo nos níveis de nitrato/nitrito salivares em todos os indivíduos, independente do enxaguatório utilizado. Por outro lado, os níveis de *V. dispar* reduziram após bochecho com CHX. Os resultados encontrados sugerem que o bochecho com óleo essencial e iodo-povidine tiveram pouco efeito nos níveis de nitrato/nitrito salivares. Sendo assim, pode-se concluir que o uso dos três tipos de enxaguatórios interferiram pouco na atividade de redução de nitrato em nitrito e também nos níveis de *V. dispar*.

Uma análise descritiva da abundância e diversidade de bactérias orais redutoras de nitrato foi realizada por Burleigh *et al.* (2018), que também determinaram a associação entre estas com variáveis cardiovasculares e biomarcadores de óxido nítrico no sangue e na saliva. Foram identificadas sete espécies bacterianas conhecidas por contribuir na redução do nitrato, sendo *Prevotella melaninogenica* e *Veillonella dispar* as mais prevalentes. Os autores observaram que a quantidade de bactérias redutoras de nitrato se associou apenas com a geração de nitrito salivar, sugerindo que estas não influenciam na geração de óxido nítrico através da dieta.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a revisão da literatura aqui apresentada concluímos que o potencial da saliva na obtenção de diferentes informações biológicas é imenso. Particularmente a periodontia já utiliza deste método como um meio auxiliar no diagnóstico clínico e na previsibilidade pós terapia. Muitas possibilidades ainda estão por vir no sentido de se explorar mais profundamente o que a saliva pode nos oferecer pois esta é rica em produtos biológicos que certamente ofereceram a comunidade um amplo conhecimento do binômio saúde/doença.

## ABSTRACT

Saliva is a buccal biological fluid secreted by salivary glands and has great participation in the regulation of the oral microbiota. Currently several areas of scientific research adopt the use of saliva in the elaboration of diagnoses and predictability of related therapies. This trend is due to the fact that the use of saliva is a rich source of molecular information and its acquisition is relatively simple because it is a non-invasive technique, easy to collect, low cost, painless and safe. Saliva can be used for the early diagnosis of systemic diseases (cancer, infectious and cardiovascular diseases) and various organic and inorganic substances can be detected, as well as drugs and their metabolites and biological markers. Particularly in periodontics, the use of saliva may be important in the



diagnosis, in the quantification of bacteria, in the evaluation of interleukins, nitrate and nitrite among others. Thus, the objective of this literature review is to update clinicians and periodontists regarding the importance of saliva as a valuable

tool in the diagnosis and monitoring of the host condition in relation to periodontal pathologies.

**UNITERMS:** Periodontal diseases; Saliva; Diagnosis; DNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2001; 85 (2): 162-169.
- 2- Chojnowska S, Baran T, Wilinska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, Knas M. Human saliva as a diagnostic material. *Advances in Medical Sciences* 2018; 63 (2018): 185-191.
- 3- Cross BW, Ruhl S. Glycan recognition at the saliva – Oral microbiome interface. *Cellular Immunology* 2018; In press: 1-15.
- 4- Bhattarai KR, Kim HR, Chae HJ. Compliance with Saliva Collection Protocol in Healthy Volunteers: Strategies for Managing Risk and Errors. *International Journal of Medical Sciences* 2018; 15 (8): 823-831.
- 5- Heller D, Helmerhorst EJ, Gower AC, Siqueira WL, Paster BJ, Oppenheim FG. Microbial diversity in the early in vivo-formed dental biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 2016; 82 (6): 1881-1888.
- 6- Maciel SS, Feres M, Gonçalves TED, Zimmermann GS, da Silva HDP, Figueiredo LC *et al.* Does obesity influence the subgingival microbiota composition in periodontal health and disease? *Journal of Clinical Periodontology* 2016; 43: 1003-1012.
- 7- Souza AB, Chambrone L, Okawa RTP, Silva CO, Araújo MG. A obesidade como fator de risco para doença periodontal: Revisão da literatura. *Journal of Clinical Dentistry and Research* 2010; 4: 74-82.
- 8- Ganowicz E. Salivary diagnostics - Diseases of the oral cavity. *Dental and Medical Problems* 2011; 48 (3): 421-30.
- 9- Marti-Alamo S, Mancheno-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fauel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2012; 4 (4): 237-43.
- 10- Kochurova EV, Kozlov SV. The diagnostic possibilities of saliva. *Clinical Laboratory Diagnostics* 2014; 1 (1): 13-5.
- 11- Karched M, Bhardwaj RG, Pauline EM, George S, Asikainen S. Effect of preparation method and storage period on the stability of saliva DNA. *Archives of Oral Biology* 2017; 81 (1): 21-25.
- 12- Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva – a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2002; 13 (2): 197-212.
- 13- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 1998; 25: 134-44.
- 14- Lodhi K, Saimbi CS, Khan MA, Nath C, Shuela R. Evaluation of melatonin levels in saliva in gingivitis and periodontitis cases – a pilot study. *Contemporary clinical dentistry* 2016; 7 (4): 519-523.
- 15- Gumus P, Emingil G, Ozturk V, Belibasakis GN, Bostanci N. Oxidative stress markers in saliva and periodontal disease status: modulation during pregnancy and postpartum. *BMC Infectious diseases* 2015; 15 (261): 1-9.
- 16- Al-Hamoudi N, Abduljabbar T, Mirza S, Al-Sowygh ZH, Vohra F, Javed F *et al.* Non-surgical periodontal therapy reduces salivary adipocytokines in chronic periodontitis patients with and without obesity. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 2018; 9 (e12314): 1-7.
- 17- Yarkac FU, Gokturk O, Demir O. Effect of non-surgical periodontal therapy on the degree of gingival inflammation and stress markers related to pregnancy. *Journal of Applied Oral Science* 2018; 26 (e20170630): 1-8.
- 18- Choi H, Kim E, Kang J, Kim HJ, Lee JY, Choi J *et al.* Real time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults. *Journal of Periodontal & Implant Science* 2018; 48 (4): 261-271.
- 19- Funahara M, Soutome S, Hayashida S, Umeda M. An analysis of the factors affecting the number of bacteria in the saliva of elderly adults in need or care. *International Journal of Gerontology* 2018; 12 (1): 205-207.
- 20- Cortelli SC, Costa FO, Rodrigues E, Cota LOM, Cortelli JR. Periodontal Therapy Effects on Nitrite Related to oral Bacteria: A 6-Month Randomized Clinical Trial. *Journal of Periodontology* 2015; 86 (8): 984-994.
- 21- Reher VGS, Zenóbio EG, Costa FO, Reher P, Soares RV. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. *Journal of Oral Science* 2007; 49 (4): 271-276.
- 22- Mitsui T, Harasawa R. The effects of essential oil, providone-iodine, chlorhexidine mouthwash on salivary nitrate/nitrite and nitrate-reducing bacteria. *Journal of Oral Science* 2017; 1 (1): 1-5.
- 23- Burleigh MC, Liddle L, Monaghan C, Muggeridge DJ, Sculthorpe N, Butcher JP *et al.* Salivary nitrite production is elevated in individuals with a higher abundance of oral nitrate-reducing bacteria. *Free Radical Biology and Medicine* 2018; 120 (1): 80-88.

Endereço para correspondências:

Taís Browne de Miranda

Rua Dr. Emílio Winther, 1153, ap 32 – Jardim das Nações

CEP: 12030-000 – Taubaté – SP

Tel.: (12) 99120-2731

E-mail: taisbrowne@gmail.com