

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico do homem tem sido marcado por uma busca contínua de novos materiais. Este esforço resultou em diversas classes de materiais que afetam quase todos os aspectos da vida contemporânea, incluindo, por exemplo, a área de Ortodontia. Assim sendo, uma grande diversidade de materiais está disponível para um ortodontista ao programar a montagem de um aparelho ortodôntico fixo (FERREIRA, 2005).

Desde o início da Ortodontia, quando já se sabia que os dentes poderiam ter suas posições alteradas mediante a aplicação de forças, têm sido desenvolvidos vários dispositivos para a realização da movimentação dentária, e dentre os componentes fundamentais para a prática ortodôntica, encontram-se bráquetes e fios ortodônticos (FLEISCHMANN et al., 2008).

A boca, ao contrário de outras cavidades naturais, está constantemente exposta a fortes estímulos mecânicos, térmicos e químicos, em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, destacando-se a mastigação. Desta forma, a boca está propensa a apresentar alterações decorrentes de modificações sistêmicas, sejam elas de fundo carencial, metabólico, ou de outra natureza, as quais poderão concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e o hospedeiro (OLIVEIRA, 2005).

A composição e diversidade da microbiota bucal podem variar de um indivíduo para outro. Entretanto, a despeito das variações entre indivíduos, alguns grupos de microrganismos estão presentes em nichos bucais específicos na maioria dos indivíduos. A complexidade da microbiota aumenta até atingir relativa estabilidade nos adultos jovens. Diversos fatores contribuem para este aumento da complexidade da microbiota bucal, entre eles fatores sociais (contato com maior número de indivíduos), fatores ambientais (aumento na diversidade da dieta) e fatores fisiológicos, tais como: modificações das mucosas, erupção de maior número de dentes, aumento do fluxo e concentração de componentes salivares (GRANER; GONÇALVES; HOFLING, 2005).

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam,

aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (VON RECUM; LABERGE, 1995; GIL; FERREIRA, 2006).

A escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos que devem ser encontrados. Nesse sentido, a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), bem como a velocidade de degradação do material são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999; TABATA, 2009)

A aplicação de biomateriais odontológicos sobre os tecidos gengivais, mucosas e tecidos duros pode constituir um risco terapêutico que pode ser controlado mediante o conhecimento das características, concentrações e propriedades dos produtos, por parte do profissional (JÚNIOR; GARRAFA, 2007).

Diversas ligas metálicas têm sido usadas de várias formas em implantes ortodônticos no corpo humano há muitos anos, embora o número de dispositivos a base de aços inoxidáveis implantados tenham crescido significativamente nos últimos 20 anos, muitos questionamentos ainda persistem sobre presença de elementos como níquel e cromo, principalmente devido à toxicidade presente nessas ligas (VOORT, 2006).

Áreas retentivas de superfícies sólidas apresentam-se como regiões preferenciais de colonização de determinados microrganismos formadores do biofilme dentário (HEINTZE, 1996; SUGA; GUEDES-PINTO; SIMIONATO, 2005). Com isso, os aparelhos ortodônticos, por intermédio de seus acessórios, funcionam como retentores adicionais de microrganismos potencialmente capazes de formar biofilme dentário, levando a desmineralizações do esmalte, lesões de cárie dentária e gengivite (ANHOURY et al., 2002; FALTERMEIER; BURGERS; ROSENTRITT, 2008; GWINNETT; CEEN, 1979; HEINTZE, 1996).

A utilização de aparelho ortodôntico fixo gera maior acúmulo de biofilme dental, pela facilidade de deposição nas áreas retentivas, dificultando a manutenção de uma boa higiene bucal por parte do paciente ortodôntico, favorecendo, como já dizia Balenseifen e Madonia (1970), mudanças no meio ambiente bucal, através da queda do pH e aumento de carboidratos, *Streptococcus* e *Lactobacillus*.

Em pacientes com alta atividade de cárie, a concentração de *Streptococcus mutans* na saliva é freqüentemente elevada. Tal concentração varia de hospedeiro para hospedeiro, sendo as condições endógenas do mesmo responsável por estes níveis (CARLSSON; OLSON; BRATTHALL, 1985; CASTRO et al., 2000).

O biofilme dentário é um depósito bacteriano aderido à superfície do dente composta por inúmeras espécies que interagem combinando-se em arranjos complexos (SILVA et al., 2006). No biofilme, não é apenas a presença de um único organismo que determina as suas propriedades, mas uma inter-relação entre todos integrantes da população microbiana são importantes. Assim, a cárie dentária, é reconhecida como uma doença que resulta não apenas da presença de estreptococos ou qualquer organismo único no biofilme dental (KURAMITSU et al, 2007). A colonização primária é feita predominantemente por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, especialmente por gênero de estreptococos (COLE et al., 1999). Nesta fase inicial, o *S. mutans* tanto pode estar ausente como presente em baixos números (LANG; MOMBELLI; ATTSTROM, 2005).

Dentre os *Streptococcus*, o *S. mutans* é considerado de maior relevância, sendo descrito como agente etiológico da cárie dentária, devido à produção de ácidos e à capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares (PEC). Esses polissacarídeos decorrentes do aproveitamento de energia quando da hidrólise principalmente da sacarose presente na dieta, facilitam a adesão bacteriana às estruturas dentárias e a outros microrganismos (DONOGHUE; PERRONS, 1991; WENNERHOLM; BIRKHED; EMILSON, 1995).

Nos biofilmes, as populações bacterianas encontram-se aderidas a uma superfície ou umas às outras e imersas em uma matriz polimérica orgânica que confere proteção a seus membros. Os biofilmes podem ser formados por bactérias deterioradoras e patogênicas sob condições apropriadas, sendo que fatores como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e de nutrientes influenciam a sua formação (SOUZA, 2006).

As vantagens da permanência das células bacterianas em biofilmes são numerosas, principalmente no que se refere à proteção contra agentes agressivos. Além da resistência a sanitizantes e antibióticos, os biofilmes apresentam também resistência à radiação ultravioleta e à desidratação (ELASRI e MILLER, 1999). Sendo assim, percebe-se que a fisiologia das células do biofilme é, notoriamente, diferente, das células que vivem em modo planctônico.

Neste contexto, sabe-se que algumas propriedades dos materiais podem interferir na colonização microbiana de superfícies sólidas, como rugosidade, energia superficial livre, tensão superficial, hidrofobicidade e afinidade com substâncias dissolvidas e polímeros (QUIRYNEN et al., 2008).

Atualmente, diferentes qualidades de aço inoxidável têm sido empregadas na confecção de bráquetes e fios ortodônticos, como por exemplo, a liga 316L (low carbon – baixo carbono). Somando-se a isso, os fios ortodônticos provenientes de outras composições e diferentes propriedades mecânicas têm sido cada vez mais utilizados (MACHADO et al., 2007).

No momento, encontram-se na literatura científica, poucos estudos *in vitro*, que descrevem o mecanismo de bioaderência realizado pelo *Streptococcus mutans* na superfície de fios ortodônticos (aço 316L).

Considerando-se a diversidade de materiais que podem ser empregados no decorrer de um tratamento ortodôntico corretivo total, o trabalho proposto, objetiva realizar estudos *in vitro* para: avaliar a ocorrência de atividade de bioaderência de *Streptococcus mutans* sob o aço 316L, pois essas informações podem ser úteis no momento da indicação deste acessório, levando-se em consideração o perfil de higiene e dieta de cada paciente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tratamento ortodôntico e as doenças cárie e periodontal

A Ortodontia é uma especialidade que vem se popularizando, principalmente devido às exigências estéticas do mundo atual. Cada vez mais pacientes desejam não só ter dentes hígidos, mas também dentes bonitos e posicionados corretamente. Considerando-se o conjunto corporal, a face e os dentes desempenham papel importante no desenvolvimento da auto-estima e na interação entre as pessoas (BASTOS; HENRIQUES; OLYMPIO, 2006).

Os tratamentos ortodônticos com aparelho fixo têm sido associados com o surgimento de lesões de macha branca em esmalte. A prevalência média do surgimento dessas lesões em pacientes ortodônticos varia de 2% a 96%, de acordo com a calibragem utilizada em cada investigação, dos métodos de diagnóstico, da presença ou não de descalcificações antes da instalação do aparelho e da utilização ou não de suplemento de flúor durante o tratamento ortodôntico, afirmaram Benham et al. (2009).

Segundo Benhan et al. (2009) o surgimento de lesões de mancha branca durante o tratamento ortodôntico esta diretamente vinculado a presença das bandas cimentadas nos dentes, dos bráquetes colados na superfície do esmalte, das molas, dos elásticos, dos arcos de nivelamento e das resinas usadas para colagem. Os acessórios ortodônticos normalmente dificultam a higiene oral convencional, criando pontos retentivos que favorecem o acúmulo prolongado da placa bacteriana.

Como dizia Heintze (1996), idealmente o tratamento ortodôntico deveria ser um procedimento para prevenir a doença cárie, já que o apinhamento dos dentes dificulta a realização da correta higiene bucal e contribui para o maior acúmulo do biofilme. A correção ortodôntica bem sucedida facilita a higiene bucal. Entretanto, os acessórios colados funcionam como retentores adicionais do biofilme, o que justifica o acompanhamento direto da escovação, utilizando todos os artifícios disponíveis para tal.

Segundo Rezende (2001), a aparatologia ortodôntica fixa contribui para o aumento da contagem de microorganismos (FIG. 1), como os *S. mutans*, *Lactobacilos* e *Cândida*, sendo primordial para esses pacientes sua conscientização

e dos ortodontistas, quanto à necessidade de adoção de medidas preventivas intensas, durante todo o período de tratamento (TAMBURUS; BAGATIN; SILVA NETTO, 1998).

Figura 1 - Acessório ortodôntico



Fonte: http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Odonto_MontenegroMF_1.pdf Odonto_MontenegroMF_1.pdf

Saavedra et al. (2007) afirmaram que o aparelho ortodôntico é considerado como um fator de retenção e acúmulo de placa bacteriana, o que pode favorecer o surgimento da inflamação gengival, que dependendo da sua severidade, quando não tratada, pode evoluir para problemas mais graves como a periodontite. Porém, os autores enfatizam que uma escovação dentária eficiente, capaz de remover toda a placa bacteriana aderida aos dentes e as superfícies do aparelho ortodôntico, têm o potencial de prevenir a cárie, manter a saúde gengival, evitando assim o surgimento de complicações periodontais.

Quando o paciente não consegue remover o biofilme formado ao redor dos fios e bráquetes, lesões de mancha branca podem se desenvolver (FIG. 2). Esta desmineralização do esmalte dental continua sendo seqüela comum do tratamento ortodôntico (CHADWICK; ROY; KNOX, 2005). Segundo Ögaard (2008), elas são definidas como lesões iniciais do processo carioso, que podem progredir para cavitação e posterior acometimento de todo o dente. Aparecem freqüentemente como pequenas linhas ao longo da periferia dos bráquetes e em poucos pacientes ocorre como grandes descalcificações, com ou sem cavitação. O esmalte torna-se poroso e propenso a manchamento por comidas e bebidas.

Figura. 2 - Lesões de mancha branca ativa



Fonte: http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Odonto_MontenegroMF_1.pdfOdonto_MontenegroMF_1.pdf

Uma das grandes dificuldades encontradas é a pouca disposição dos pacientes para a aquisição de novos hábitos ou para a modificação de hábitos já adquiridos em relação à sua saúde bucal. A falta de conhecimento quanto à correta escovação também contribui para o agravamento das lesões. A educação para a saúde bucal é o que impulsiona o indivíduo a mudar o seu comportamento com relação à saúde. Este processo deve ser enfatizado também na Ortodontia, já que o tratamento requer cuidados ainda maiores para se prevenir a cárie e a doença periodontal (MIRANDA; LEMOS; TORRES, 2000).

A colocação de aparelhos ortodônticos potencializa as alterações ambientais na cavidade bucal como: diminuição de pH, aumento na concentração de carboidratos e aumento na contagem de *Streptococcus* (AARESTRUP; GUIMARÃES, 1999).

Segundo Ögaard (2008), alguns tipos de aparelhos podem aumentar a agregação do biofilme (FIG. 3 A e B), mesmo com os esforços do paciente para se obter sucesso na escovação. As ligaduras elásticas tendem a acumular mais biofilme, sendo que deve-se dar preferência a amarração metálica e bráquetes auto-ligados naqueles casos onde a escovação é ineficiente.

Figura. 3 - Tipos de aparelhos que dificultam a higienização:

A) Disjuntor do tipo Haas e B) Aparelho de protração mandibular



A



B

Fonte: http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Odonto_MontenegroMF_1.pdfOdonto_MontenegroMF_1.pdf

Machado (2002) realizou um estudo objetivando avaliar a condição periodontal dos pacientes tratados ortodonticamente, comparando-as com um grupo controle de pacientes não tratados. Todos os indivíduos tratados ortodonticamente passaram por programas de prevenção, com aplicações de flúor e instruções de escovação, e foram estimulados a fazer bochechos diários de flúor. Foram realizadas profilaxias a cada consulta em todos os pacientes cuja higienização apresentava-se deficiente. O índice de placa, a higiene bucal e a saúde gengival foram boas ou ótimas durante o período de tratamento. Antes e durante o período de tratamento, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o grupo tratado, entretanto, após a remoção do aparelho, no 5º exame, verificou-se um índice estatisticamente significativo menor de placa e gengivite nos pacientes tratados ortodonticamente quando comparado com o grupo controle. A condição periodontal em ambos os grupos foi excelente. Os autores demonstraram que, em resposta ao programa preventivo adotado, não houve diferença entre a condição periodontal dos pacientes tratados ortodonticamente quando comparado com o grupo e controle. Este estudo comprovou que o tratamento ortodôntico, quando acompanhado de cuidados de higienização, não causa danos ao periodonto e ao status gengival, e estimula a manutenção de uma boa higiene bucal após o término do tratamento.

A técnica correta de escovação e a motivação do paciente são os principais fatores para se conseguir o controle do biofilme (FENG; SEKIGUCHI; PANNUTI, 2006).

2.2 ALTERAÇÕES BACTERIANAS FRENTE AO TRATAMENTO ORTODÔNTICO

Ao longo da vida, as superfícies de interface do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microorganismos. No entanto, a renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de grandes quantidades destes. Na cavidade oral, entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura não descamativa que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos (LANG; MOMBELLI; ATTSTROM, 2005).

Segundo Ribeiro et al. (2004) a literatura relata o aparecimento de fatores favoráveis e desfavoráveis após a instalação dos aparelhos ortodônticos fixos. Dentre os fatores favoráveis foi observado um aumento significativo do fluxo salivar nos primeiros meses após a instalação do aparelho. Já o principal fator desfavorável é o acúmulo de placa bacteriana, que traz como consequência uma modificação da microflora bucal.

Capbell (2003) realizou um estudo em doze pacientes, com objetivo de avaliar a dinâmica da colonização de microorganismos bucais antes e após a colocação do aparelho ortodôntico fixo. Cinco coletas de saliva estimulada foram realizadas em períodos pré-determinados, com o objetivo de quantificar a variação do número de colônias de *S. mutans*, de *Lactobacilos* e de *Cândida albicans*. O autor observou um aumento estatisticamente significativo no número de colônias de *S. mutans* e de *Lactobacilos*, não havendo diferença significativa para a *Cândida albicans*.

Considerando a contagem de *S. mutans* como referência para avaliação de risco de cárie, Matos et al. (2003) constataram que a colocação de aparelho ortodôntico fixo é capaz de elevar em 20% o número de pacientes classificados como de alto risco de cárie.

Frejman et al. (2004) detectaram em suas investigações que logo após a inserção das fios ortodônticos ocorre um aumento significativo da contagem tanto dos *Lactobacilos* quanto dos *S. mutans*.

Ribeiro et al. (2004) observaram níveis elevados de *S. mutans* durante a fase ativa do tratamento ortodôntico, sendo que esses níveis apresentaram redução após um período entre 6 a 15 semanas da remoção do aparelho.

Segundo Frejman et al. (2004) inúmeras pesquisas demonstraram a ocorrência de um aumento do número de *S. mutans* durante o tratamento ortodôntico fixo. Porém boa parte desses estudos evidenciou que esse aumento ocorre apenas durante os primeiros meses após a instalação do aparelho, sendo que após um período de tempo mais prolongado se percebe uma baixa desse número com tendência de estabilização neste número menor.

Ribeiro et al. (2004) realizaram um estudo para analisar a prevalência de *S. mutans* após um período mínimo de 2 anos da instalação do aparelho ortodôntico fixo e observaram que não houve modificações nos níveis salivares desse microorganismo.

Segundo Rezende et al. (2001) na cavidade oral existe uma vasta variedade de espécies microbianas, no entanto, alguns microorganismos são mais importantes que outros na patogenia da cárie dentária. O *S. mutans* é a bactéria mais intimamente associada com a fase inicial da lesão cariosa, enquanto o *Lactobacilo* está associado ao desenvolvimento subsequente da mesma.

2.3 MECANISMOS DE ADESÃO BACTERIANA NA FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTÁRIO

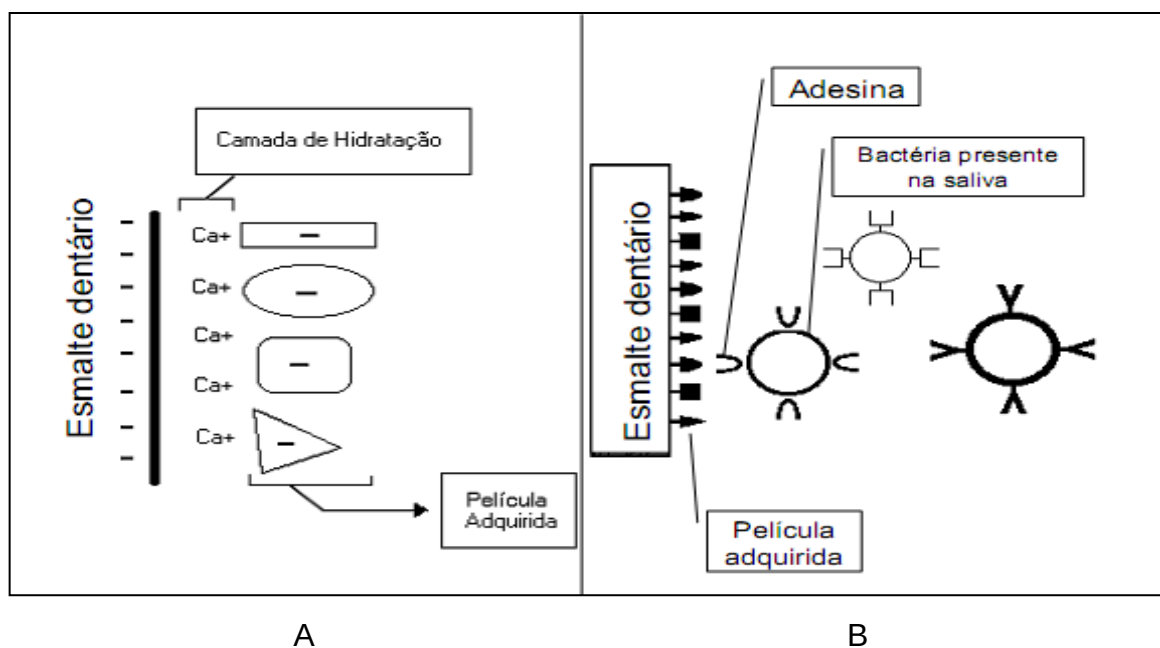
O estudo da adesão da bactéria à superfície requer o conhecimento das características físico-químicas das duas superfícies – bactéria e substrato – e da interação entre elas. Em geral, ambas as superfícies possuem carga global negativa, e para que ocorra a adesão é necessário que a barreira de repulsão eletrostática seja superada pela força atrativa (ANDRADE; PINTO; LIMA, 2008).

Os mecanismos envolvidos na aderência microbiana são muito complexos e ainda não totalmente entendidos. Inicialmente acreditava-se que as bactérias eram associadas de forma inespecífica às superfícies dentárias, sob influência de forças de van der Waals, que são forças eletrostáticas atrativas e repulsivas (MARSH; NYVAD, 2005).

Segundo Walker; Marsh (2004; 2007) a adesão inicial da bactéria com a superfície pode ser descrita usando a teoria DLVO, proposta por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overbeek (1948) que sustenta que a energia potencial total de interação entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Lifshitz-van der Waals e as forças de dupla camada elétrica. Para estes autores, a célula bacteriana penetra no limite da camada hidrodinâmica e experimenta um espaço de atração não específica global de cerca de 10-20 nm a partir da superfície.

Segundo Walker; Marsh (2007), este espaço existe devido às interações pelas forças eletrostáticas de atração e repulsão de Van der Waals que atuam em toda a célula e são de longo alcance, fracas e reversíveis. Se a célula e a superfície forem predominantemente carregadas negativamente, as forças de repulsão aumentam e evitam que as células e a superfície entrem em contato mais estreitamente. Por outro lado, a ligação da célula pode vir a ser irreversível devido às interações estereoquímicas de curto alcance entre as adesinas nos micro-organismos e receptores complementares nas superfícies (FIG. 4 A e B).

Figura 4 - A) Esquema da organização da película adquirida do esmalte.
B) Proteínas de superfície bacteriana (adesinas) se ligam especificamente a componentes da película adquirida, permitindo ligações mais estáveis.



Fonte: Adaptada de B. Nyvad e O. Fejerskov, in: A. Thylstrup, O. Fejerskov. Tratado de Cariologia. Ed. Cultura Médica, RJ, 1ª. edição, 1988.

Na cavidade oral, os microrganismos no biofilme dental são expostos a grandes quantidades de açúcar durante um curto período de tempo e alguns microrganismos têm a capacidade de utilizar esses carboidratos para produzir ácidos, sintetizar polissacarídeos extracelulares e armazenar energia. Depois desta rápida exposição ao açúcar, o biofilme dental sofre longos períodos de abstinência ao açúcar. Esta condição fisiológica do crescimento bacteriano é conhecida como episódio de "festa ou fome" (CARLSSON, 1997) e pode causar a estratégia de seleção microbiológica aumentando a proporção de espécies ácido-tolerantes como é o caso do *S. mutans* no biofilme (LOESCHE, 1986; MARSH, 2006).

Os *S. mutans* são um grupo de microrganismos altamente cariogênicos pelas seguintes características:

1. Capacidade de colonizar a superfície dentária: Essas bactérias colonizam superfícies que não descamam (dentes, materiais restauradores, acrílicos). Portanto, só colonizam a cavidade bucal após a erupção dos dentes e em pacientes edentados, desde que portadores de próteses (BERKOWITZ e JORDAN, 1975; FLÓRIO et al., 2004).
2. Produzir polissacarídeos extracelulares do tipo glucano (dextrana e mutana) a partir da sacarose, o que favorece a formação de biofilme espesso. (SHKLAIR et al., 1979).
3. Capacidade acidogênica: a produção de ácido láctico é determinante fundamental para a patogenicidade, sendo responsável pela desmineralização do esmalte na etapa inicial da cárie. É um pré-requisito essencial para que um microrganismo seja considerado cariogênico (MENAKER et al., 1984).
4. Capacidade acidúrica: sobrevivência do microrganismo em pH ácido, permitindo que o microrganismo desenvolva suas atividades metabólicas em ambientes de pH baixo, tais como sulcos e fissuras dos dentes. (HAMADA e SLADY, 1980).
5. Acúmulo de polissacarídeos intracelulares de glicose do tipo amilopectina a partir de carboidratos da dieta do hospedeiro. Esses polímeros são metabolizados quando os açúcares exógenos estão esgotados, resultando na formação de ácido láctico.
6. Fermentadores de grande quantidade de carboidratos, incluindo manitol e sorbitol.

Contudo, é sabido que uma película é adquirida e influencia na aderência de microrganismos orais, potencializando-a em alguns casos ou reduzindo-a em outros, dependendo da composição da película e do tipo de microrganismo. A formação da

película adquirida se dá por forças físicas entre as superfícies orais e os componentes orgânicos e inorgânicos dos fluídos circundantes.

Acredita-se que a película confira especificidade ao processo de adsorção e que suas proteínas tenham maior afinidade com alguns microrganismos do que com outros (SANTOS; JORGE, 2007).

O *S. mutans* é considerado o microrganismo mais cariogênico encontrado no biofilme dentário, devido a sua capacidade de usar a dieta a base de carboidratos como a sacarose para sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC), como também sua capacidade acidúrica e acidogênica. PEC são importantes fatores de virulência do *S. mutans* por promoverem aderência bacteriana na superfície do dente (SCHILLING et al., 1992), contribuir para a integridade estrutural do biofilme dentário (KOO et al., 2009; XIAO et al., 2010), mudar a porosidade do biofilme (DIBDIN; SHELLIS, 1988) e consequentemente aumentar a desmineralização do esmalte (CURY et al., 2000).

Nesta fase, o microambiente é favorável para o estabelecimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*, os quais se aderem aos colonizadores intermediários (JENKINSON, 1994). A microbiota oral continua a aumentar em diversidade até, eventualmente, ser alcançada a comunidade clímax em duas semanas ou mais. A comunidade clímax é caracterizada pela homeostase microbiana, que tende a expulsar espécies invasoras (MARSH; NYVAD, 2005). Com esse crescimento e aumento de espessura do biofilme, os microrganismos anaeróbios são favorecidos. Os bastonetes Gram-negativos (*Prevotella intermédia*, *P. loeschii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forshytia*, *Capnocytophaga* spp., *Eubacterium* spp. e *Selenomonas* spp.) e espiroquetas (*Treponema denticola*), aumentam em número, principalmente nas camadas mais próximas do dente (SANTOS; JORGE, 2007).

As bactérias têm um sistema de reconhecimento nas suas superfícies, que habilita componentes específicos da superfície bacteriana (adesinas) a se aderirem às moléculas complementares (receptores) na película adquirida. Por exemplo, *S. sanguis* e *S. oralis* se ligam especificamente a resíduos terminais de ácido siálico das glicoproteínas salivares humanas (GIBBONS, 1989). Mas, na composição da película, de especial interesse estão as proteínas ricas em prolina (PRP), que se ligam à superfície dentária e interagem com receptores específicos na superfície de *S. mutans* (NAUNTOFTE; TENOVUO; LAGERLOF, 2005).

Enquanto isso, especificamente, a aderência de estreptococos *S. mutans* aos dentes ocorre em duas etapas. Após o processo inicial de aderência aos componentes da película adquirida, o qual é reversível, segue-se a aderência irreversível sacarose-dependente. Na presença de sacarose essas bactérias sintetizam moléculas de poliglicose, referidas como glucanos, tanto solúveis quanto insolúveis em água. Esses glucanos permitem firme adesão, promovendo condições favoráveis para a colonização de outros microrganismos que não têm a capacidade de se ligarem diretamente sobre as superfícies. Assim, apenas a sacarose pode ser usada na produção desses polissacarídeos extracelulares (BALAKRISHNAN; SIMMONDES; TAGG, 2000).

2.4 O *Streptococcus mutans*

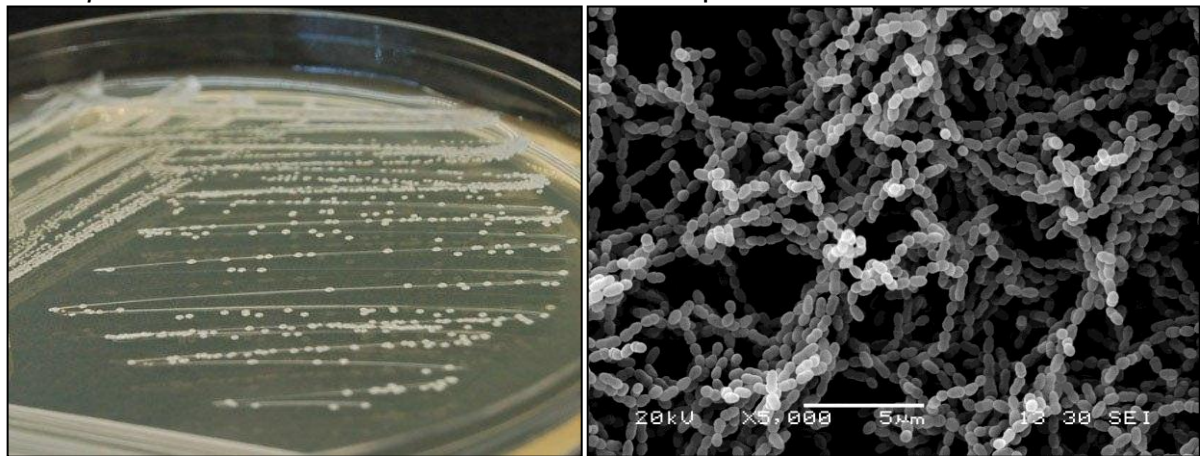
O *Streptococcus mutans* é um coco, gram-positivo, anaeróbio facultativo, α -hemolítico e fermentador mais cariogênico da espécie. (LORENZO, 2004).

Os *Streptococos* orais são divididos em quatro grupos principais de espécies: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. anginosus* e *S. mitis*. Dentre estas, o *S. mutans* é a espécie isolada mais comum no biofilme dental, e estudos epidemiológicos o têm colocado como principal patógeno na etiologia da cárie dentária (MARSH; MARTIN, 2005a).

O nome da espécie *Streptococcus mutans*, deriva do fato que suas células podem perder sua morfologia em forma de cocos e com frequência aparecerem como bacilos curtos ou como bacilo-cocos (MARSH; MARTIN, 2005a).

As células de *S. mutans*, têm morfologia ovalada, medem cerca de 0,5 a 0,75 μm de diâmetro, agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento, são anaeróbios facultativos, mesófilos e sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C (FIG. 5 A e B). Em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius, formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio de cultura, e com bordas irregulares. Com adição de sacarose ao ágar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 μm de diâmetro (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973).

Figura. 5 - A) Cultura de *Streptococcus mutans* cultivado no laboratório. B) Cepas de *Streptococcus mutans* observadas no microscópio eletrônico de varredura 5000x



A

B

Fontes: microbewiki.kenyon.edu e bremlang.blogspot.com

As bactérias do gênero estreptococos são, atualmente, consideradas os principais microrganismos associados à cárie humana. Sua preponderância se deve a certas habilidades que tornam o grupo capaz de induzir a doença, em função de sua habilidade acidogênica, aciduricidade e capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares a partir de carboidratos, particularmente, na presença de altas concentrações de sacarose (HAMADA et al., 1996; MARSH, 2003). Destes estreptococos, os principais microrganismos envolvidos na patogênese da cárie humana e da desmineralização do esmalte são os *S.mutans* e os *S.sobrinus* (LIM et al., 2008).

A adesão de células bacterianas à superfície dos dentes é de fundamental importância para o início da lesão cariosa. Os glucanos extracelulares insolúveis são os principais responsáveis por essa adesão e também pela coesão intercelular entre bactérias diferentes como *Streptococos* e *Actinomyces*. E essa síntese de glucanos extracelulares insolúveis resulta da ação da enzima glicosiltransferase sobre a sacarose (NEWBRUN et al, 1977).

Outras características peculiares das bactérias cariogênicas são a aciduridade, capacidade de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, tais como em pH baixo; e a acidogenicidade, capacidade de produzir ácidos (LOESCHE, 1986). Poucas bactérias orais são capazes de tolerar condições ácidas por longos períodos; entretanto, estreptococos mutans e

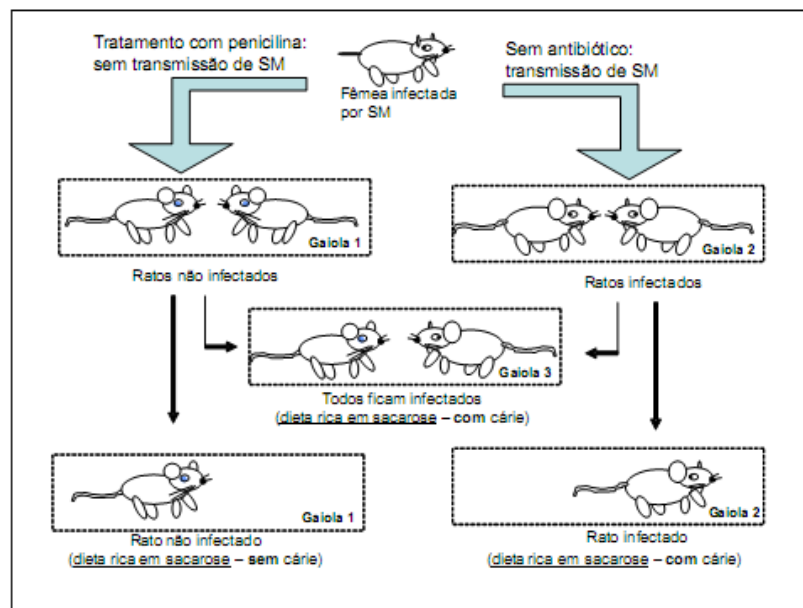
lactobacilos não só permanecem viáveis em pHs baixos, mas preferencialmente crescem e metabolizam produtos (MARSH; NYVAD, 2005).

A produção de glucanos extracelulares insolúveis pelos *S. mutans* está diretamente relacionada com a atividade da enzima glicosiltransferase que utiliza a sacarose como substrato oriundo da dieta e a decompõe em glucose que irá formar os glucanos (LANDUCCI et al., 2003).

Mostrou-se que, 3 a 8 horas após a limpeza adequada dos dentes, cerca de 61% a 78% da microbiota que se estabelece na película adquirida seja composta por espécies de estreptococos (NYVAD; KILIAN, 1990).

A natureza infecciosa transmissível da cárie dentária causada pelo *S. mutans* foi demonstrada através de experimentos em ratos e hamsters, realizados por pesquisadores americanos, Paul H. Keyes e Robert J. Fitzgerald, a partir dos anos 50. Através destes estudos, estes pesquisadores demonstraram que a cárie é de fato uma doença infecciosa, transmissível, causada por microrganismos descritos pela primeira vez em 1924, por Clarke, na Inglaterra, os *S. mutans* (FITZGERALD e KEYES, 1960; KEYES, 1960; TANZER, 1995). A FIG. 6 ilustra os principais experimentos realizados por estes pesquisadores.

Figura 6 - Esquema dos principais experimentos em ratos e hamsters realizados por Paul H. Keyes e Robert J. Fitzgerald, para demonstrar que a cárie dentária é uma doença infecciosa transmissível, causada pelo *S. mutans* (SM).



Segundo Newbrum (1988), essa bactéria é encontrada em grande número na placa que cobre lesões cariosas. Evidências clínicas indicam que esse microorganismo pode sobreviver na boca principalmente em superfícies sólidas, como dentes, próteses e aparelhos ortodônticos.

2.5 A ORTODONTIA E O DESENVOLVIMENTO DE ACESSÓRIOS ORTODÔNTICOS

A Ortodontia é a mais antiga das especialidades da Odontologia, tendo sido a primeira a se organizar de fato e de direito. Edward Hartley Angle foi um dos fundadores e primeiro presidente da Sociedade Americana de Ortodontistas, em 1901. No entanto, desde a antiguidade, dentes apinhados e irregulares tem sido um problema para alguns indivíduos e tentativas para corrigir essas desordens datam de, pelo menos, 1.000 anos a.C., tendo sido encontrados aparelhos ortodônticos primitivos em escavações gregas e etruscas (VILELLA, 2001).

Hoje se pode compreender melhor a evolução da especialidade e conhecer o trabalho de muitos dentistas e ortodontistas que, no passado, utilizavam apenas procedimentos mecânicos, mas que puderam estabelecer uma ciência meticulosa e bem fundamentada, objetivando a correção das más formações dentárias e faciais, com base no princípio científico da oclusão dentária normal (COMISSÃO ORGANIZADORA – UFRJ., 1992).

As ligas de uso mais comum na ortodontia são aquelas de aço inoxidável e as de titânio puro, onde suas características físicas e químicas também favorecem seu uso na implantodontia (STAFFOLANI et al., 1999).

Na Ortodontia contemporânea, diversos tipos de bráquetes encontram-se à disposição do profissional, e estes podem ser compostos de vários materiais, como aço inoxidável, policarbonato, porcelana, zircônia, titânio ou, até mesmo, pela combinação desses (FLEISCHMANN et al., 2008).

A maioria dos dispositivos metálicos utilizados durante o tratamento ortodôntico é confeccionada com aço inoxidável do tipo austenítico que, entre outros metais, contém em sua liga cerca de 8% de níquel e 18% de cromo. Contudo, o níquel tem sido freqüentemente associado a manifestações alérgicas, provocando mais reações do que todos os outros metais combinados (SÓRIA et al., 2005).

Os aços inoxidáveis são basicamente ligas ferro-cromo, apesar de outros metais atuarem como elementos de liga, mas o cromo é o mais importante e um mínimo de 11% é necessário para que os aços inoxidáveis sejam resistentes à corrosão. Os aços inoxidáveis são ligas de ferro, carbono, cromo e níquel, e em geral apresentam teores em cromo entre 12 e 25% e níquel entre 8 e 20 %. A presença do cromo, que a partir deste percentual e em contato com o oxigênio, permite a formação de uma película finíssima de óxido de cromo sobre a superfície do aço. Essa película é impermeável e insolúvel nos meios corrosivos usuais. A adição do níquel provoca uma mudança na estrutura do material, que passa a apresentar melhoras na ductilidade (capacidade de deformação plástica), na resistência mecânica e na resistência à corrosão. Para além desta estrutura básica pode apresentar: manganês, alumínio e molibdênio (inferior a cerca de 7 %) que permite aumentar a resistência à corrosão destes materiais (DIAS; OLIVEIRA; CORREIA; SOBRAL, 2002). O QUADRO 1 apresenta a composição química dos aços inoxidáveis mais utilizados.

Quadro 1 – Composição química de alguns aços inoxidáveis austeníticos

DESIGNAÇÃO	ELEMENTOS (%)					
	C	Cr	Ni	Mn	Mo	Outros
304	< 0,08	19	9	2,0	0	0
304L	< 0,03	19	10	2,0	0	0
309	< 0,20	23	13,5	2,0	0	0
316	< 0,08	17	12	2,0	2,5	0
316L	< 0,03	17	12	2,0	2,5	0

Fonte: Stahlschlüssel, 1995.

O aço inoxidável austenítico (aço inoxidável tipo 316L da AISI – American Iron and Steel Institute) é o metal mais utilizado na confecção de bráquetes, bandas e arcos ortodônticos. Sua composição constitui-se de 18% de cromo, 8% de níquel, 2% a 3% de molibdênio e baixo conteúdo de carbono (máximo de 0,03%) (PLATT et al., 1997; ELIADES, ELIADES, BRANTLEY, 2001; GONTIJO, 2001). Suas propriedades mecânicas, tais como ductilidade e resistência ao desgaste, tornam esta liga interessante para esta finalidade. A sigla L que acompanha a especificação 316 do aço inoxidável refere-se ao baixo teor de carbono em comparação ao tipo 316 (GWINNETT, 1982; ELIADES, ELIADES, BRANTLEY, 2001). Neste aço ainda é

adicionado o molibdênio para promover uma proteção adicional contra a corrosão (ELIADES, LIADES, BRANTLEY, 2001). A composição química do Aço Inoxidável 316L pode ser vista no QUADRO 2.

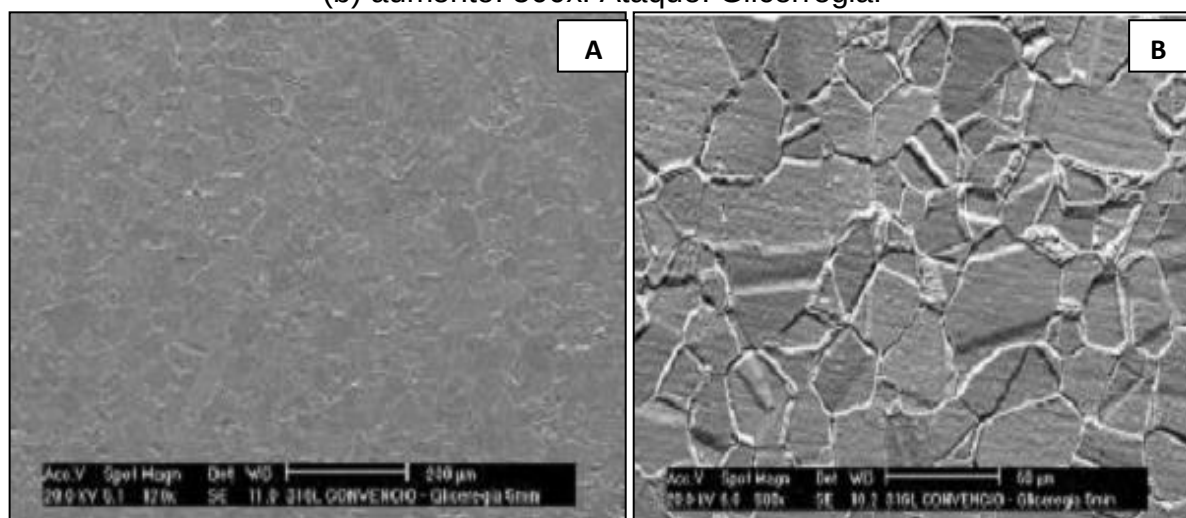
Quadro 2 - Composição Química (% em peso) do aço inoxidável 316L

ELEMENTO	TEOR (%)
Si	0,43
Mn	1,19
Ni	11,28
Cu	0,38
Cr	17,20
P	0,032
Mo	2,11
Co	0,20
C	0,028
S	0,002

Fonte: Dias, 2002.

Os acessórios ortodônticos são confeccionados com aço inoxidável tipo 304, 304L, 316, 316L e 317, nos quais a quantidade de carbono decresce de acordo com o aumento do número das séries de aços (GWINNETT, 1982). A FIG. 7 tem-se a ilustração do aço inoxidável 316L.

Figura 7 – Micrografia do aço inoxidável 316L. (a) aumento: 120X e (b) aumento: 500x. Ataque: Glicerregia.



Fonte: <http://www.aaende.org.ar/ingles/sito/biblioteca/material/PDF/COTE021.PDF>.

2.5.1 Considerações sobre a adesão inicial de microrganismos no aço inoxidável

Segundo informações disponíveis no sítio do American Iron and Steel Institute e da British Stainless Steel Association, o aço inoxidável, descoberto por Harry Brearley, Inglaterra, 1912, corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. Em se tratando do AISI 316L, um dos mais utilizados na Ortodontia, esta liga contém de 11 a 12% de cromo; 17 a 18% de níquel e o restante de ferro.

Por um fenômeno denominado Passivação, o cromo, devido à sua alta afinidade com o oxigênio, tende a se combinar com este formando uma fina camada de óxido de cromo, com aproximados 40 Angstrom de espessura. Esta camada passiva é a responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável.

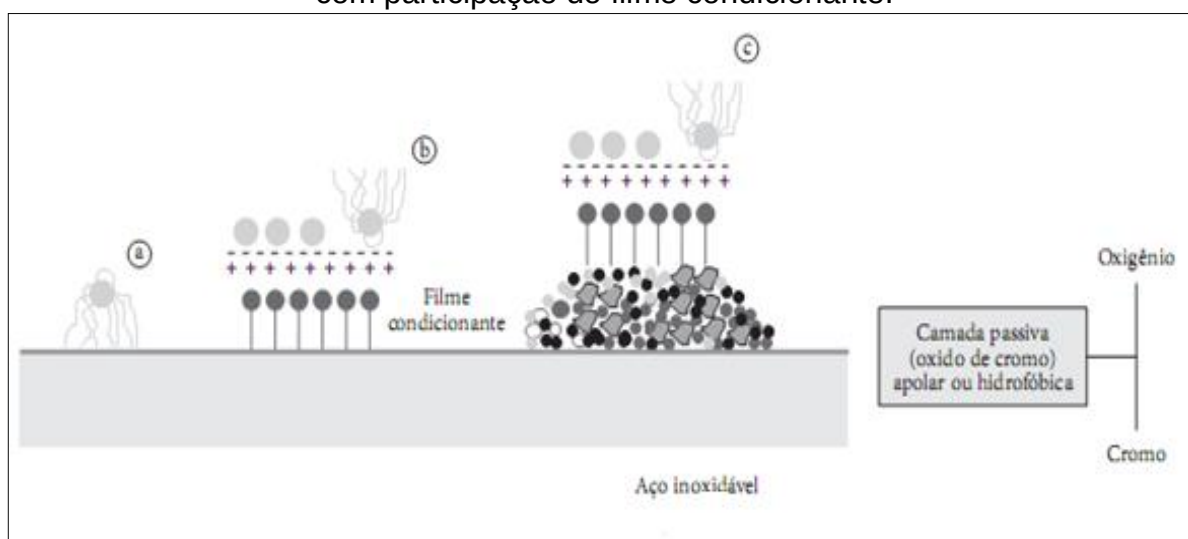
Neste contexto, em se tratando da adesão inicial, então, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana, maior a sua capacidade de se ligar diretamente a esta superfície. Considerações semelhantes foram feitas por Sheng, Ting e Pehkonen (2007) e Meylheuc et al. (2006).

Os diferentes graus de hidrofobicidade de uma célula são conferidos por fatores de virulência associados à adesão, como pili, fímbrias e flagelos, bem como pela membrana externa, em gram-negativos, e os diferentes graus de eletronegatividade conferidos pela presença de grupos funcionais polares, como fosfatos, carboxilas, hidroxilas e ácido teicoico (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005; VANHAECKE et al., 1990). Desta forma, bactérias Gram-negativas, devido a suas estruturas peculiares, apresentariam uma vantagem competitiva, quando comparadas a Gram-positivas, no que diz respeito à adesão inicial, colonização da superfície e formação do biofilme. Com base nestas considerações, apresentamos, na FIG. 8, um modelo para descrever a adesão inicial de microrganismos no aço inoxidável.

Em 8a é apresentada a interação direta entre o microrganismo com a camada passiva. Microrganismos Gram-negativos, potencialmente mais hidrofóbicos, como *A. hydrophila*, poderiam se aderir dessa forma. Em 8b e 8c é apresentada a interação entre a célula e um filme condicionante. Este filme, constituído por elementos da fase aquosa, como minerais, lipídios e proteínas, poderia intermediar o contato entre microrganismo cuja superfície seja menos hidrofóbica e o aço. Caso

estes constituintes tenham caráter anfipático, poderiam se ligar ao aço inox por sua fração apolar e expor seu radical polar, facilitando a adesão do microrganismo. No leite, por exemplo, estes constituintes seriam representados pela lecitina e pela caseína. *S. aureus*, Gram-positivo e que não apresenta membrana externa ou estruturas para motilidade, como flagelos, tende a ser menos hidrofóbico. Para microrganismos como estes, o filme condicionante pode exercer apoio fundamental a sua adesão.

Figura 8 - Esquema para a formação da camada passiva e para a adesão inicial de microrganismo diretamente ao aço inoxidável ou à camada ou filme condicionante. Em a) são mostradas as interações hidrofóbicas; e b, c) interações eletrostáticas, com participação do filme condicionante.



Fonte: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/29.pdf>.

2.6 USO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NO ESTUDO DA ADESÃO BACTERIANA

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia, topografia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, necessárias para se entender o comportamento das superfícies. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física,

medicina e geologia (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; FOOK, 2008). Este aparelho é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. Os diferentes modos de contrastes permitem melhorar tanto a topografia induzida por deformação plástica e danos, ou a heterogeneidade na composição química ou na orientação cristalográfica (NAGATANI et al., 1987; BRETHERAU; CREPIN; BORNERT, 2001).

Na tentativa de elucidar os fenômenos de interações microbianas, aderência e metabolismo dos diferentes microrganismos bucais, muitos modelos de estudo *in vitro* têm sido desenvolvidos. Dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores inerentes a microbiota bucal necessitam ser minimizados para a análise mais detalhada de cada fenômeno. Esses modelos incluem como corpos de prova, cortes dentais, fragmentos de dentina, vidro, entre outros (BARBIERI, 2005).

Os modelos utilizados para ensaio de aderência são freqüentemente analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura, Cintilografia, ELISA com utilização de anticorpo específico para a bactéria em estudo e contagem de Unidades Formadoras de Colônia (GAINES et al., 2003).

Estudos de adesão de bactérias são bastante facilitados pelo uso do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), tendo em vista o poder de resolução do microscópio e a interpretação de imagens tridimensionais. Utilizando o MEV vários pesquisadores descreveram o modo de adesão de bactérias.

Eick et al. (2004), em estudo de aderência *in vitro*, analisaram a capacidade de aderência de *S. mutans* a diferentes materiais restauradores, com análise do experimento por meio de MEV e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C). Branting; Sund; Linder (1989), estudando estomatites bucais em portadores de próteses em acrílico, avaliaram a adesão de *C. albicans* e *S. mutans* em superfícies acrílicas incubando os microrganismos em meios contendo glicose e sacarose por meio do MEV e por marcadores cintilográficos das células aderidas. Barbieri (2005) investigou qualitativamente e quantitativamente, a capacidade de aderência de *S. mutans* e *C. albicans* isoladamente e associados, realizando ensaio de aderência *in vitro* na superfície dentária, cuja análise foi feita por MEV. Sem; Kamran; Larz (1997) verificaram o padrão de crescimento de *C. albicans* na dentina radicular também por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.

2.7 A DIETA E A HIGIENE BUCAL NO TRATAMENTO ORTODÔNTICO

Para Olympio et al. (2006) o paciente ortodôntico, principalmente os mais jovens, muitas vezes apresentam o hábito de consumir com certa freqüente alimentos cariogênicos. Sabendo que a dieta é um dos principais fatores que influenciam no desenvolvimento da cárie e o ortodontista têm a obrigação de orientar os seus pacientes a respeito da importância da restrição do consumo dos alimentos considerados cariogênicos.

Para Souza-Junior (1998) os açúcares em geral são considerados como uma das causas principais da cárie, e dentre esses, a sacarose têm um potencial cariogênico incomparável. O estado físico e a freqüência em que os carboidratos são ingeridos contribuem significativamente para o surgimento e progressão das lesões de cárie.

Segundo Olympio et al. (2006) sendo a dieta um dos principais fatores que influenciam no desenvolvimento da cárie, o ortodontista deve realizar, quando julgar necessário, uma avaliação dietética para melhor determinar o risco individual de cárie.

Para Olympio et al. (2006) os pacientes ortodônticos devem ser orientados a respeito da importância de se restringir o consumo dos alimentos tidos como cariogênicos. Aconselha-se que a ingestão desse tipo de alimento deva ser feito em ocasiões programadas e, preferencialmente, restritas as refeições principais como café da manhã, almoço e jantar.

Para Souza-Junior (1998) a análise dos hábitos dietéticos é um instrumento valioso, mas não fundamental para todos os pacientes, mas sim para aqueles em que as evidências clínicas e os dados da anamnese sugiram que estamos diante de um paciente com alto risco de cárie. O autor lembra que a orientação preventiva e o reforço educativo constante sobre a dieta é um procedimento fundamental que deve ser utilizado para todos dos pacientes.

Há bastante tempo sabe-se que a configuração de bráquetes e a presença de fios, elásticos, molas e outros acessórios interferem na capacidade do paciente de manter algumas partes dos dentes e do aparelho ortodôntico limpo (GWINNETT; CEEN, 1979). Assim, a presença de dispositivos ortodônticos no meio bucal cria condições adicionais favoráveis para um significativo aumento do biofilme dentário

que, por sua vez, induz o surgimento de descalcificação, cáries dentárias e inflamação gengival. É evidente que os aparelhos, por si só, não podem ser responsabilizados por tais inconvenientes, mas sim a falta de atenção com os cuidados adicionais de higiene, cuja responsabilidade deve ser dividida entre o profissional e o paciente (ou pais destes). Desta forma, é necessário o emprego de cuidados especiais a serem tomados tanto pelo ortodontista no âmbito clínico quanto pelo paciente no seu dia-a-dia, traduzidos por especial atenção aos aspectos educativos e motivadores bem como cuidados dietéticos e um rigoroso programa de higiene (BACCHI; PRATES; ATTIZZANI, 1997; BERTHOLD; MONTEIRO, 1993).

Em pacientes com aparelhos ortodônticos fixos, os quais não podem ser removidos da boca para serem higienizados, o controle da contaminação microbiana por meio do uso de agentes químicos é de fundamental relevância, não apenas para reduzir o risco de doenças prevalentes como cárie dental e doença periodontal, mas também para preservar a saúde geral do paciente (SOATO, 2009).

Em relação ao controle mecânico do biofilme dentário, os principais recursos disponíveis são as escovas, fios e fitas dentais. No entanto, em ortodontia, a instrução e a motivação podem ser incrementadas pelo uso de instrumentos auxiliares como escovas dentais com variação no desenho, como a unitufo, a interdental, a sulcus (duas fileiras de cerdas) ou a ortodôntica (CAMPBELL; CAETANO, 2004).

3. PROPOSIÇÃO

O uso de materiais metálicos em meios biológicos tem demonstrado que estes sofrem diversas alterações, entre estas, se destaca a bioaderência. A utilização do aço 316L em tratamento ortodôntico apresenta tal característica, pois o meio bucal apresenta diversos fatores que promovem condições para este fenômeno. O presente trabalho teve o propósito de avaliar a bioaderência dos *Streptococcus mutans* ATCC (25175), *in vitro*, na superfície de materiais ortodônticos (fios ou arcos de aço inoxidável 316L).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar por métodos microbiológicos e por microscopia eletrônica de varredura a bioaderência na superfície do fio de aço inoxidável 316L de uso odontológico pelo confronto entre o corpo de prova (aço 316L) e o *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

4.2 Objetivos Específicos

- a. Por cultura em caldo bacteriológico avaliar quantitativamente a viabilidade das células recuperadas do biofilme formado sobre a superfície do aço inoxidável 316L.
- b. Identificar e analisar as superfícies colonizadas por *Streptococcus mutans* sobre o aço inoxidável 316L mediante Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- c. Observar se a colonização pelo *Streptococcus mutans* no fio ortodôntico sofre influência da sacarose.

5 METODOLOGIA

5.1 Delineamento geral do estudo

Para esse estudo, foi utilizado procedimento estatístico comparativo utilizando técnicas de observação direta intensiva em laboratório (MARCONI; LAKATOS, 2010).

5.2 Locais de realização da pesquisa

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

A análise em Microscopia Eletrônica de Varredura foi desenvolvida na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

5.3 Microrganismo selecionado

Foi utilizado como microrganismo teste uma cepa de *Streptococcus mutans* (American Type Culture Collection - ATCC - 25175). Tal microrganismo foi fornecido pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), situado na cidade do Belo Horizonte/MG, Brasil. Na FIG. 9 pode-se observar o microrganismo selecionado.

Figura 9 – *Streptococcus mutans*



Fonte: Universidade Federal de Minas Gerais

5.4 Preparo das soluções e do meio de cultura

As soluções e meios de cultura foram preparados segundo metodologia clássica. Os meios de cultura, vidrarias, ponteiras, corpos-de-prova de liga metálica foram esterilizados em autoclave a 121° C, durante 15 minutos. Os reagentes e meios de cultura, após a autoclavagem foram levados para câmara de fluxo laminar (Veco), em recipientes previamente esterilizados e estocados em refrigerador a 4° C. As placas de Petri de tamanho 90x15 (Pleion), os tubos de poliestireno tinham capacidade para 15,0 e 50,0 mL e copos de bquer capacidade para 23,0 mL.

Para a reativação, crescimento e análise da aderência do microorganismo utilizou-se o caldo BHI (sendo composto de: infusão de coração e cérebro: 17,5 g; peptona: 10 g; dextrose: 2 g; cloreto de sódio: 5 g; fosfato de sódio: 2,5 g e água destilada 1000 mL (RIBEIRO; SOARES, 1993). O QUADRO 3, representa a composição do meio de cultura.

Quadro 3 – Composição (g/L) do caldo BHI

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Infusão de coração e cérebro	17,5
Peptona	10,0
Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de sódio	2,5
Água destilada (1000mL) – q.s.p pH final 7,4 ± 0,2	

Fonte: http://www.mbiolog.com.br/produtos/Caldo_BHI.pdf.

Para o crescimento e análise da aderência do microorganismo utilizou-se o caldo BHI modificado com 15% de sacarose (sendo composto de: infusão de coração e cérebro: 17,5 g; peptona: 10 g; sacarose: 2 g; cloreto de sódio: 5 g; fosfato de sódio: 2,5 g e água destilada 1000 mL. O QUADRO 4, representa a composição do meio de cultura.

Quadro 4 – Composição (g/L) do caldo BHI (Modificado-sacarosado)

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Infusão de coração e cérebro	17,5
Peptona	10,0
Sacarose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato de sódio	2,5
Água destilada (1000mL) – q.s.p pH final 7,4 ± 0,2	

Fonte: Modificado pelo autor

Por meio da utilização de uma balança analítica, com exceção do ágar e da sacarose, os componentes foram pesados e colocados em um cálice adicionado com 1.000 mL de água destilada, sendo dissolvidos com auxílio de bastão de vidro. Ao ágar e à sacarose, pesados e colocados em balão volumétrico, foi adicionada a solução obtida, lavando-se as paredes do balão. A seguir, o balão volumétrico foi tamponado com algodão, identificado e autoclavado a 120° C, por 20 minutos, sendo a autoclave aberta cuidadosamente, logo em seguida, para evitar a caramelização do açúcar. Após o resfriamento até cerca de 50° C.

Para o crescimento e teste de viabilidade do microorganismo utilizou-se ágar BHI, sendo composto de: infusão de coração e cérebro: 8,0 g; hidrolisado péptico de tecido animal: 5,0 g; hidrolisado pancreático de caseína: 16,0 g; cloreto de sódio: 5,0 g; glucose: 2,0 g; fosfato dissódico de hidrogênio: 2,5 g; ágar: 13,5 g e água destilada 1000 mL (RIBEIRO; SOARES, 1993). O QUADRO 5, representa a composição do meio de cultura.

Quadro 5 – Composição (g/L) do ágar BHI.

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Infusão de coração e cérebro	8,0
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0
Hidrolisado pancreático de caseína	16,0
Cloreto de sódio	5,0
Glucose	2,0
Fosfato dissódico de hidrogênio	2,5
Ágar	13,5
Água destilada (1000mL) – q.s.p pH final 7,4 ± 0,2	

Fonte: http://www.mbiolog.com.br/produtos/AGAR_BHI.pdf.

A solução salina a 0,8% de NaCl, foi utilizada para análise da viabilidade do microorganismo. O corpos de prova foram fixados com solução tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 7) e glutaraldeído 2% (SESSO, 2007).

5.5 Seleção e preparo das amostras (corpo de prova).

Foram selecionados para realização deste estudo fios ortodônticos metálicos (Reg. MS/ANVISA 10396830018 - Ref. 55.01.035 – Lote 1222107) da marca Morelli® (Sorocaba, SP, Brasil), a FIG. 10 tem ilustrado o produto selecionado.

Figura 10 - Fios ortodônticos

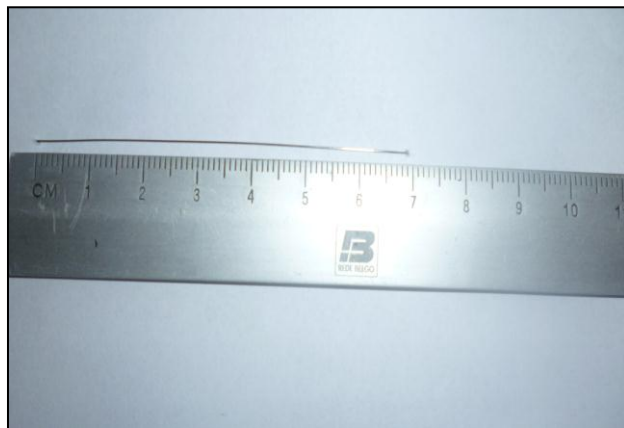


Fonte: Morelli® (Sorocaba, SP, Brasil)

Foram avaliadas neste estudo 90 amostras, sendo 60 destinadas ao teste microbiológico de aderência bacteriana e 30 amostras no controle da esterilidade. Os fios ortodônticos apresentam dimensões de 0,35 mm de diâmetro e 7,0 cm de comprimento e apresentando uma composição química com 50 g da liga metálica composta de cromo e níquel.

Antes de serem utilizadas nos experimentos as amostras foram cordadas com o uso de um alicate e medidas com um comprimento padrão de 7,0 centímetros e em seguida realizou-se a auto-clavação dos mesmos, obtendo ao final corpo de prova esterilizado (FIG. 11).

Figura 11 - Corpo de prova padronizado



Fonte: autoria própria

5.6 Controle de qualidade dos fatores que interferem no crescimento microbiano

5.6.1 Temperatura

Avaliação diária utilizando termômetro químico marca Incoterm®, imerso em solução de glicerol utilizando tubo com rolha perfurada e manutenção da temperatura em 37°C +/- 0,4.

5.6.2 Potencial hidrogênio-iônico (pH)

O controle diário dos valores do pH foi determinado após estabilização da temperatura a 37° C. A preparação da leitura do pH foi determinada seguindo

metodologia descrita na AOAC (2002), sendo coletado 1mL da solução com inóculo e homogeneizada com 10 mL de água destilada. A medida foi realizada utilizando pHmetro digital, da marca Digimed®, com eletrodo de vidro combinado, sendo previamente calibrado com tampão pH 5 e pH 7.

5.6.3 Esterilidade do meio de cultura

Controle de qualidade do meio de cultivo em temperatura de 37° C em estufa bacteriológica no intervalo de 24 e 48h com leitura final de turvação do meio de cultura utilizando a Escala Nefelométrica de McFarland.

5.7 Preparo do inóculo bacteriano

Primeiramente o *Streptococcus mutans* foram transferidos, utilizando uma alça de inoculação estéril, selecionou-se 3 a 5 colônias que foram transferidas para o caldo BHI. O caldo BHI (1000 mL) foi preparado após dissolução em água destilada (37g/L) e incubado com o inóculo em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C em microaerofilia. Nessa técnica são colocados tubos de ensaio dentro de um recipiente com tampa fechada e vedados junto à chama da vela para consumo quase total do oxigênio (técnica da vela). A inoculação prévia neste meio de cultura líquido tem como finalidade revitalizar as células bacterianas e, como é rico em nutrientes, favorece o crescimento de microorganismos sensíveis como os da espécie *Streptococcus mutans*. Após crescimento no caldo, verificado através da turbidez do meio, pela técnica denominada nefelometria. Em seguida o microorganismo foi inoculado em placa ágar-BHI com o auxílio de um swab, seguindo a técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas e puras. Este meio foi incubado por 24 horas a 37° C em microaerofilia em estufa bacteriológica.

Após 24 horas e com o auxílio de uma alça de plástico estéril, foram retirados de 3 a 5 colônias do ágar-BHI e diluídas em tubo contendo 9 mL de solução salina esterilizada a 0,85%. Esta suspensão bacteriana foi agitada por 2 minutos na velocidade 5 em agitador de soluções AP 59 (Phoenix®, Araraquara, SP, Brasil). A análise da turbidez foi padronizada no valor de 0,5 de acordo com a Escala Nefelométrica de McFarland (PROBAC DO BRASIL®, São Paulo, SP, Brasil)

correspondendo à concentração de, aproximadamente, 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

5.8 Montagem e análise dos sistemas de aderência *in vitro*

A amostra foi dividida em três seqüências de acordo com o tipo de solução em que os fios ortodônticos, previamente autoclavados (a 121°C por 20 min.), seriam submersos (QUADRO 6).

Quadro 6- Soluções preparadas para incubação dos fios ortodônticos.

Seqüências	Composição de cada solução
Seqüência (A _{S/S})	30 tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) e 1 mL do inóculo bacteriano.
Seqüência (B _{C/S})	30 tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo nutritivo BHI adicionado de 15% de sacarose e 1mL do inoculo bacteriano.
Seqüência (C _(S/S))	30 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo nutritivo BHI sem sacarose (controle de esterilidade do meio de cultura e das amostras)

Fonte: SOUZA 2011 (Modificado pelo autor)

Para cada seqüência, nos 90 tubos de ensaio foram depositados individualmente 1 fio ortodôntico em cada tubo (FIG. 12). Em seguida incubaram-se os tubos de ensaio em estufa bacteriológica a 37°C, em microaerofilia, que favorece um ambiente com reduzida concentração de gás oxigênio, por um período de intervalos regulares de 24 em 24 horas durante 10 dias.

Figura 12 – Sistemas de aderência *in vitro*



Fonte: SOUZA 2011 (Modificado pelo autor)

Inicialmente após 24 horas do preparo do inóculo e utilização da escala de Mc Farland que determina valor padrão de 10^8 (UFC/mL), foi transferido 1 mL do inóculo com auxílio do pipetador automático (marca KACIL®) para tubos esterilizados contendo 9 mL de caldo BHI no qual ficaram imersos os corpos de prova suspensos por fio dental estéreis incorporado aos materiais no momento da manipulação e incubando-se a 37° C em microaerofilia por um período de 10 dias em estufa bacteriológica, entretanto de 24 em 24 horas foi realizada transferência de corpo de prova para um novo de cultura (YOSHIYASU, 2001).

5.9 Ensaio bacteriológico para análise da aderência bacteriana

5.9.1 Manutenção de cultura em fase exponencial de crescimento

Para a realização do ensaio bacteriológico foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans*, como cepas-padrão ATCC - 25175. A diluição seriada foi realizada neste ensaio bacteriológico, que pode ter duração de até uma semana após a imersão do corpo de prova sobre 37° C (ERRICSSON, 1959).

Durante os intervalos regulares de 24h/37° C, cada fio ortodôntico foi transferido, com auxílio do fio dental para um tubo de ensaio contendo 9 mL de um novo meio de cultura BHI esterilizado e 1 mL de solução salina com o inóculo que corresponde a suspensão bacteriana inicial, verificada pela solução-padrão do tubo

0,5 da Escala Nefelométrica de McFarland. Assim, a técnica de diluição seriada foi realizada simultaneamente com cada série do experimento, por meio de 3 tubos de ensaio com valores de diluição de 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} . Em cada tubo de ensaio correspondentes aos valores das diluições foi transferido 1 mL de cada solução por um período de 24/24 horas durante 10 dias.

5.9.2 Análise da aderência bacteriana e teste de viabilidade microbiana

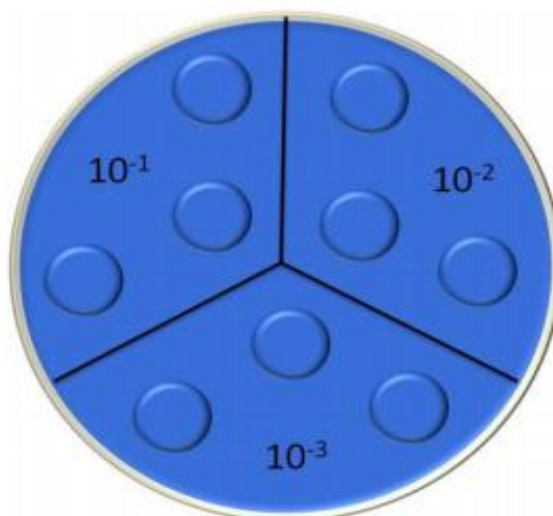
Após esse período, cada fio ortodôntico foi transferido, com auxílio de uma alça de platina flambada até o rubro, para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril, sendo em seguida agitados por 2 minutos na velocidade 5 em agitador de soluções AP 59 (Phoenix®, Araraquara, SP, Brasil). Posteriormente à agitação, a solução obtida foi diluída em série em solução salina estéril até a 10^{-5} . Assim, para cada amostra foram preparados 3 tubos de ensaio contendo 900 µL de solução fisiológica estéril, 100 µL da solução obtida após a agitação foram diluídos no primeiro tubo (10^{-7}), dessa diluição 100 µL foram diluídos no segundo tubo (10^{-6}), e deste foram transferidos 100 µL para o terceiro tubo (10^{-5}). Alíquotas de 25 µL das diluições 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} , foram inoculadas em triplicata em placas contendo meio de cultura ágar BHI (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973) pela técnica da gota (MILES; MISRA; IRURN, 1938). Para cada fio ortodôntico foi utilizado uma placa de petri dividida em três partes iguais. Em cada parte da placa foram inoculadas 3 alíquotas de 25 µL de cada diluição (FIG. 13).

A metodologia utilizada para mensuração do número de UFC aderidas aos fios ortodônticos testados é de simples execução. Para inoculação das diluições, empregou-se a técnica da gota (MILES; MISRA; IRURN, 1938). Por esse método cada placa com meio de cultura ágar recebe triplicata das três diluições.

O período estabelecido para as trocas do meio de cultura para que este fornecesse substrato adequado ao crescimento microbiano antes de atingir a fase de declínio (BARBIERI, 2005).

Além disso, essa estratégia permitiria a produção de ácidos orgânicos pelo *S. mutans*, de maneira similar a que ocorre no biofilme dentário, havendo a necessidade da troca do meio de cultura para que não houvesse acúmulo dos subprodutos e interferência no processo (FEATHERSTONE, 1996).

Figura 13 – Ilustração representativa da Técnica da Gota



Fonte: (MILES; MISRA; IRURN, 1938)

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 48 h em microaerofilia para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Posteriormente, as placas foram colocadas dentro da jarra para a microaerofilia, com vela acesa e gaze umedecida com água, obtendo-se assim uma atmosfera desejável de microaerofilia, com tensão de 5-10% de CO₂ e umidade (STORINO, 1993).

Para cada amostra, foi realizada a contagem das três gotas da diluição que apresentou o menor número de colônias. A média das três contagens foi multiplicada por 40 e elevada à potência correspondente a diluição, para assim estimar o número de UFC/mL, ou seja, UFC/fio ortodôntico (THOMÉ, 2005).

5.9.3 Quantificação de microorganismos viáveis

Alíquotas de 25 µL das diluições 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} , foram inoculadas em triplicata em placas contendo meio de cultura Ágar BHI. Em seguida foram inoculadas 3 alíquotas de 200 µL de cada diluição, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 48 h em microaerofilia para posterior contagem das Unidades Formadoras de colônias (UFC/mL).

O método tradicional de contagem de bactérias da espécie *S. mutans*, foi facilitado na prática bacteriológica com a introdução do Ágar BHI descrito por Gold et al, 1973. A contagem das colônias é feita após incubação das placas em anaerobiose, na estufa a 37°C, durante 48 horas. O tempo limite de armazenagem do ágar BHI é de uma semana devido à inativação da bacitracina (GOLD, JORDAN, VAN HOUTE, 1973). A seguir foram selecionados para contagem, sempre que possível, as placas com 30 a 300 colônias. A seguir, multiplica-se o número encontrado por 10 para corrigir o volume para 1 mL e multiplicar pela recíproca da diluição. O resultado final é expresso em UFC/m. Para cada amostra, foi realizada a contagem das placas que apresentaram o maior número de colônias. O número de colônias foi multiplicado por 10 (fator de correção) e elevada à potência correspondente a diluição, para assim estimar o número de UFC/mL, ou seja, UFC/fio ortodôntico (THOMÉ, 2005).

5.9.4 Análise da bioaderência utilizando o microscópio eletrônico de varredura

A caracterização da microestrutura foi realizada na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (USP/São Carlos). Optou-se por utilizar a técnica de microscópica eletrônica de varredura (MEV), para estudar a adesão do *Streptococcus mutans* no Aço 316L. A FIG. 14 tem-se a ilustração do microscópio eletrônico de varredura.

Figura 14 – Microscópio Eletrônico de Varredura



Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Após o período de incubação, em intervalos regulares de 24 horas, durante 10 dias os 60 fios ortodônticos (30 da série BHI e 30 da série BHI + sacarose), foram preparados para a análise em MEV. Para tanto, os espécimes foram fixados com solução tampão de fosfato de sódio 0,1M (pH 7) e glutaraldeído 2% por 3 horas e em seguida, realizou-se três lavagens consecutivas com a solução tampão por 10 minutos cada (SESSO, 2007 e HADDAD et al., 2007).

Os espécimes foram então montados em porta-amostras de alumínio e recobertos com uma fina camada de ouro, por meio de um aparelho metalizador. Após o recobrimento, as amostras foram analisadas e fotografadas em aumentos padronizados de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

Em relação à análise das amostras em Microscopia Eletrônica de Varredura, de acordo com Kühnisch et al. (2007), esse método pode ser considerado como padrão-ouro na análise de uma superfície, sendo provavelmente um método mais sensível para verificar pequenas alterações estruturais. Diversas pesquisas já utilizaram a MEV para avaliar a aderência de *S. mutans* a dentes ou a diferentes materiais de uso odontológico (BARBIERE, 2005; EICK et al., 2004; GONDIM, 2010; GWINNETT; CEEN, 1979).

Dentre os materiais ortodônticos, optou-se pela escolha de fios ortodônticos metálicos em virtude da larga utilização desse dispositivo na prática ortodôntica.

Para quantificar a área de recobrimento do fio ortodôntico, foi necessário primeiramente relacionar a dimensão do microorganismo e do fio propriamente dito, sabe-se que o *Streptococcus mutans* tem um diâmetro médio de $0,62 \mu\text{m}^2$. A área da amostras com 10 mm de alta definição, dadas pelo MEV foram as seguintes: para 5000x ($642,80 \mu\text{m}^2$), para 1000x ($321,40 \mu\text{m}^2$), para 5000x ($64,28 \mu\text{m}^2$) e para 15000x ($21,43 \mu\text{m}^2$). Neste trabalho foi adotado o aumento de 5000x, pois possibilitou a contagem de um maior número de UFC/ μm^2 .

Para quantificar o grau de aderência fez-se uma correlação entre o valor médio do diâmetro das colônias e a quantidade de UFC/ μm^2 que foram encontradas em cada amostra. Em seguida fez-se a multiplicação do valor encontrado das UFC/ μm^2 pelo valor do aumento de 5000x, ou seja, $64,28 \mu\text{m}^2$. Para determinar o valor do grau de recobrimento foi utilizada a regra de 3. Ex: suponha que numa amostra foram encontradas 30 UFC/ μm^2 , este valor é multiplicado por 0,62, que tem como resultado 18,6. Se a área é $64,28 \text{ UFC/ } \mu\text{m}^2$, então 18,6 multiplicado por 100 é igual a 1860 UFC/ μm^2 , dividindo por 64, 28 UFC/ μm^2 , obteremos 29,00 UFC/ μm^2 .

A microscopia proporcionará a observação das colônias de *S. mutans* na superfície dos fios ortodônticos incubados nas seqüências A e B. Foram definidas como amostras para análise do recobrimento as correspondentes: 1, 3, 5, 7 e 9. Essa padronização deve-se a melhor visualização das colônias sobre o fio ortodôntico. Mediante esta análise foi verificado o grau de recobrimento das colônias bacterianas sobre a superfície dos fios ortodônticos, além de seu padrão e quantidade específica para cada amostra (TAB. 1).

TABELA 1 – Critérios utilizados para quantificação da aderência microbiana

ÍNDICE	ÁREA DE UFC/ μm^2	CRITÉRIO DE RECOBRIMENTO
0	0	Ausência de colonização
1	1 a 15	Recobrimento mínimo de colonização;
2	16 a 30	Pontos esparsos de colonização;
3	31 a 45	Área de colonização avançada;
4	46 a 60	Recobrimento quase total do corpo de prova
5	61 – acima	Recobrimento total do corpo de prova

Fonte: TREIN ET AL., 2006. (Adaptado pelo autor).

6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados referentes à análise da temperatura, pH e contagem da viabilidade dos microorganismos foram analisados descritivamente. Os dados relativos à análise em MEV foram analisados descritivamente, apontando-se o grau de recobrimento das colônias na superfície dos fios ortodônticos.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tentativa de elucidar os fenômenos de interações microbianas, co-agregação, aderência e dos diferentes microrganismos bucais, muitos modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos, e embora nesse tipo de estudo existam vantagens e desvantagens, eles podem auxiliar no entendimento desses mecanismos (BARBIERE, 2005). Porém, o dinamismo destes no meio bucal, em somatória com

outros microrganismos da microbiota, mecanismos imunológicos do hospedeiro e condições ambientais, especialmente a dieta e higiene bucal não conseguem ser plenamente reproduzidos no ambiente laboratorial (MARCOTTE; LAVOIE, 1998; KOLENBRANDER, 2000).

7.1 Em relação à temperatura e pH

TABELA 2 - Representa os valores de temperatura e pH observados durante a preparação dos ensaios

DIA	TEMPO (h)	TEMPERATURA (°C)	pH		
			*Seq. A (s/s)	*Seq. B (c/s)	*Seq. C (s/s) Padrão
1	0 – 24	37,2	7,1	7,0	7,0
2	24 – 48	37,1	7,0	6,7	7,1
3	48 – 72	37,3	7,1	6,6	7,0
4	72 – 96	37,2	7,0	6,5	6,9
5	96 – 120	36,9	7,1	6,5	7,0
6	120 – 124	37,4	7,0	6,4	7,0
7	124 – 148	37,1	6,9	6,5	6,9
8	148 - 172	37,2	7,0	6,5	6,9
9	172 – 196	36,8	7,1	6,4	7,0
10	196 - 220	37,3	7,0	6,4	6,9

Fonte: autoria própria. *sequência A (s/s) – sem sacarose; sequência B (c/s) – com sacarose e sequência C (s/s).

Como demonstrado a TAB. 2 relaciona as variações da temperatura e pH realizados no ensaios biológico durante o período de 10 dias, comparando os valores obtidos na sequência A e a sequência B (com sacarose). Pode-se verificar temperaturas variando de 36,8 a 37,4°C. Para microrganismos anaeróbios facultativos a sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973). Para a maioria das bactérias da cavidade oral, o crescimento se dá numa temperatura entre 30 e 37 °C (HOLT et al. 1994). Na TAB. 2 podemos verificar também uma variação nos valores de pH entre as sequências A e B, indicando uma pequena diminuição nos valores de pH na sequência B, provavelmente em função da atividade bacteriana ao longo do tempo (horas). Segundo Holt (1994), os estreptococcus apresentam uma taxa de crescimento numa faixa de pH que varia entre 4.6 e 5.0, sendo o crescimento mais rápido numa

faixa de pH entre 6.5 e 7.0. A presença das bactérias e seu metabolismo sugere a produção de ácido láctico que associado ao caldo nutritivo favoreceu liberação de íons H^+ ocasionado redução do pH. Observamos que os valores de pH da sequência A apresenta valores próximos, entretanto ocorreu uma pequena variação do valor de pH durante as primeiras 48 horas de crescimento na sequência B, provavelmente foi potencializada pelas bactérias inoculadas na presença da sacarose no meio de cultura. Com o crescimento celular devido a produção de ácido láctico é esperado a redução no valor de pH do meio de cultura. Segundo a literatura os valores de pH do caldo após crescimento de *S. mutans* tem variado entre 7,3 e 5,5 (Wiater et al, 1999). Makaya (2007), obtiveram valores de pH entre 6,96 e 5,99. Além disso, o acréscimo de açúcares aos meios de cultura favoreceu quedas acentuadas de pH no biofilme em função da produção de ácidos por *S. mutans*, indicando a relação açúcar-dependente dos microrganismos cariogênicos (BORGES; CASTILHO; PEREIRA, 2008).

A capacidade de fermentar carboidratos e de reduzir o pH para aproximadamente 5,5 - 6,5 são características das bactérias cariogênicas, como *S. mutans*. Da mesma forma, esses microrganismos produzem reservas de polissacarídeos e as utilizam como substrato de fermentação quando não existe carboidrato disponível no meio externo (WILLIAMS; ELLIOTT, 1979; MARSH, 2003). Além disso, o *S. mutans* é capaz de produzir enzimas denominadas glicosiltransferases, que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose. Os resíduos de glicose unem-se por meio de ligações glicosídicas formando glucanos insolúveis, que conferem aos microorganismos a capacidade de aderir às superfícies. A aderência específica de *S. mutans* e de outros microorganismos aos glucanos aderentes e insolúveis e a subsequente formação de ácidos, reduzem o pH da placa bacteriana (LOESCHE, 1986; STAMFORD et al., 2005).

A retenção da capacidade acidogênica do *S. mutans* durante o crescimento em placas de cultura foi confirmada pela queda do pH e pela manutenção da acidez mesmo após a remoção do meio de cultura, lavagem do biofilme e adição de novo meio de cultura, conforme foi demonstrado. Isso indica que após o crescimento do biofilme até o meio atingir pH ao redor de 6,5, o biofilme ainda é viável e capaz de metabolizar ativamente o açúcar disponível.

7.2 Avaliação da aderência bacteriana e teste de viabilidade microbiana

TABELA 3 - Representa os valores da média das 3 gotas e as UFC/mL na seq. A

DIA	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-7})	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-6})	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-5})	*UFC/mL (10^{-7})	UFC/mL (10^{-6})	UFC/mL (10^{-5})
	Seq. A (s/s)	Seq. A (s/s)	Seq. A (s/s)	Seq. A (s/s)	Seq. A (s/s)	Seq. A (s/s)
1	193,66	135,42	72,98	$7,7460 \times 10^4$	$5,4168 \times 10^5$	$2,919 \times 10^6$
2	198,92	142,91	79,83	$7,9568 \times 10^4$	$5,7164 \times 10^5$	$3,193 \times 10^6$
3	213,21	145,86	75,32	$8,5284 \times 10^4$	$5,8344 \times 10^5$	$3,012 \times 10^6$
4	205,32	141,38	71,55	$8,2128 \times 10^4$	$5,6552 \times 10^5$	$2,862 \times 10^6$
5	212,54	148,76	76,34	$8,5016 \times 10^4$	$5,9504 \times 10^5$	$3,053 \times 10^6$
6	217,23	154,33	83,98	$8,6892 \times 10^4$	$6,1732 \times 10^5$	$3,359 \times 10^6$
7	214,95	153,39	81,95	$8,5980 \times 10^4$	$6,1356 \times 10^5$	$3,278 \times 10^6$
8	211,49	151,49	79,77	$8,4596 \times 10^4$	$6,0596 \times 10^5$	$3,190 \times 10^6$
9	216,55	155,67	84,63	$8,6620 \times 10^4$	$6,2268 \times 10^5$	$3,385 \times 10^6$
10	213,99	152,83	81,12	$8,5596 \times 10^4$	$6,1132 \times 10^5$	$3,244 \times 10^6$

Fonte: autoria própria. *UFC/mL – Representa a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de solução.

TABELA 4 - Representa os valores da média das 3 gotas e as UFC/mL na seq. B

DIA	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-7})	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-6})	Média das 3 gotas Diluição contabilizada (10^{-5})	*UFC/mL (10^{-7})	UFC/mL (10^{-6})	UFC/mL (10^{-5})
	Seq. B (c/s)	Seq. B (c/s)	Seq. B (c/s)	Seq. B (c/s)	Seq. B (c/s)	Seq. B (c/s)
1	278,92	229,94	128,97	$1,1115 \times 10^5$	$9,1976 \times 10^5$	$5,1588 \times 10^6$
2	250,54	209,26	107,73	$1,0021 \times 10^5$	$8,3704 \times 10^5$	$4,3092 \times 10^6$
3	268,99	212,94	112,31	$1,0759 \times 10^5$	$8,5176 \times 10^5$	$4,4924 \times 10^6$
4	280,31	239,14	129,11	$1,1212 \times 10^5$	$9,5656 \times 10^5$	$5,1644 \times 10^6$
5	263,19	228,91	121,21	$1,0527 \times 10^5$	$9,1564 \times 10^5$	$4,8484 \times 10^6$
6	285,38	233,34	127,91	$1,1415 \times 10^5$	$9,3336 \times 10^5$	$5,1664 \times 10^6$
7	271,37	224,43	124,43	$1,0854 \times 10^4$	$8,9772 \times 10^5$	$4,9772 \times 10^6$
8	267,92	216,98	122,74	$1,0716 \times 10^4$	$8,6792 \times 10^5$	$4,9096 \times 10^6$
9	274,97	223,43	125,05	$1,0998 \times 10^4$	$8,9372 \times 10^5$	$5,0020 \times 10^6$
10	282,31	226,71	128,82	$1,1292 \times 10^4$	$9,0684 \times 10^5$	$5,1532 \times 10^6$

Fonte: autoria própria. *UFC/mL – Representa a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de solução.

As TABs. 3 e 4 apontam os valores médios da técnica das 3 gotas na sequência A e na sequência B (com sacarose) por meio da diluição contabilizada que representa a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de solução.

A escolha de *S. mutans* como microrganismo teste, fundamentou-se na importância deste na etiologia da cárie dentária (NYVAD, KILIAN, 1990, SANTOS, JORGE, 2007), devido aos seus vários fatores de virulência, como acidogênese e aciduricidade, alta capacidade de adaptação ao ambiente, presença de adesinas na superfície celular e produção de polissacarídeos extracelulares (MATTOS-GRANER, 1999).

Demonstrou-se um maior número de células viáveis na presença de sacarose (TAB. 4), em comparação ao número de células viáveis na ausência de sacarose (TAB. 3). Assim, é adequado considerar que o próprio meio de cultura contém nutrientes essenciais para o microrganismo e que no início do processo de colonização, o *S. mutans* utiliza-se de mecanismos de aderência sacarose-dependentes (KOLENBRANDER; LONDON, 1993), como também interações eletrostáticas via cálcio salivar (pontes de cálcio) e interações hidrofóbicas (DE LORENZO, 2004).

Foi observado um aumento significativo da colonização por *S. mutans* na superfície dos fios ortodônticos submersos na sequência B que continha BHI caldo adicionado de sacarose, tendo esse grupo apresentado maior média de UFC/mL em relação às amostras incubadas em meio de cultura sem acréscimo desse dissacarídeo (TAB. 4). Os estreptococos do grupo mutans possuem capacidade de produzir, a partir da sacarose, polissacarídeos extracelulares com propriedades de adesão (KOLENBRANDER et al., 1998). No entanto, outros estreptococos bucais, também podem sintetizar estes polissacarídeos, mas apenas aqueles microrganismos apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose (BARBIERI et al., 2005).

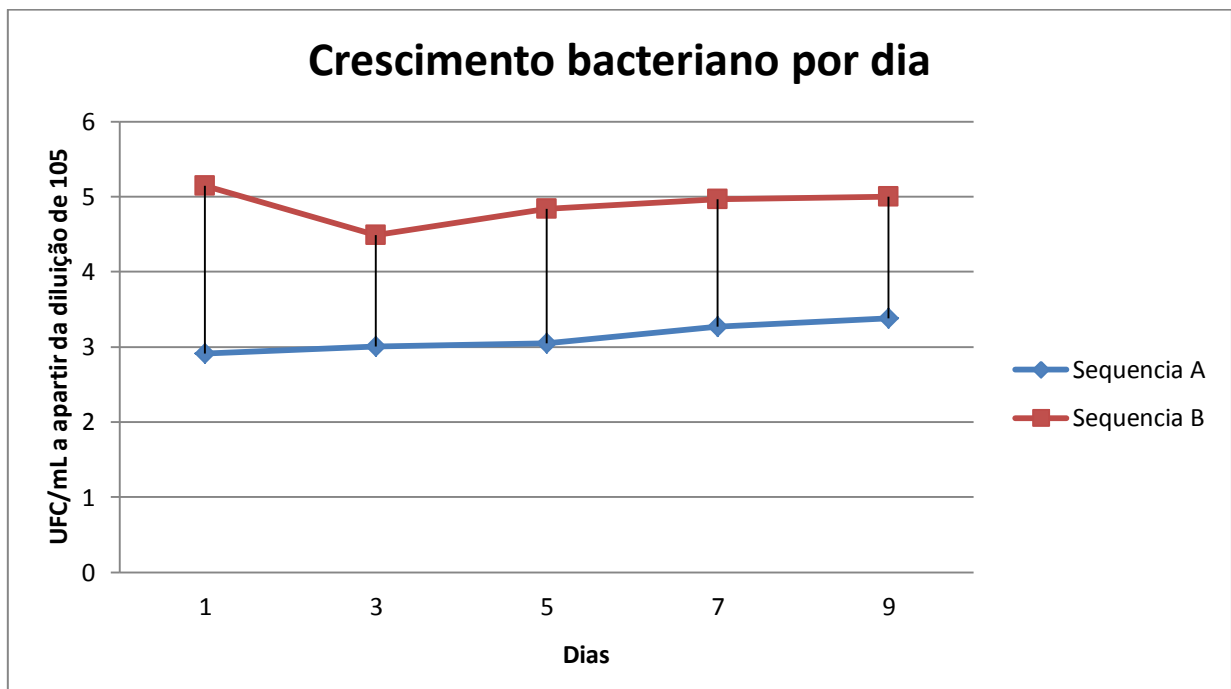
Ainda nesse contexto, BORGES, CASTILHO, PEREIRA, (2008), em um estudo que determinou o efeito *in situ* da sacarose, lactose e glicose+frutose (adicionados separadamente) na colonização do esmalte por *S. mutans* e seu potencial cariogênico *in vitro*, observaram que a sacarose obteve a maior média de número de colônias, seguida da lactose e da glicose + frutose.

Em contrapartida, também houve colonização microbiana na superfície dos fios ortodônticos incubados na ausência de sacarose (TAB. 3). Deve-se considerar

que o próprio meio de cultura contém nutrientes essenciais para o microrganismo e que no início do seu processo de colonização, *S. mutans* utiliza-se de outros mecanismos de aderência, os quais são sacarose-independentes (KOLENBRANDER, LONDON, 1993).

O GRAF. 1 representa o crescimento bacteriano nas sequências A e B (com sacarose) a partir da diluição contabilizada (10^{-5}) no intervalo entre o 1° ao 9° dia de ensaio.

Gráfico 1 – Crescimento bacteriano por dia a partir da diluição contabilizada (10^{-5})



Fonte: autoria própria

O gráfico 1 demonstra que o crescimento bacteriano na sequência B (com sacarose) apresentou uma maior quantidade de microorganismos viáveis em comparação a sequência A. A afinidade inicial de bactérias a superfícies sólidas ocorre principalmente devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Superfícies com alta energia superficial livre mais facilmente atraem bactérias, tais como *S. mutans* (VAN DIJK et al., 1987). Em um estudo realizado por ELIADES, ELIADES, BRANTLEY (1995), os fios ortodônticos metálicos apresentaram a maior tensão superficial crítica e pode vir a ter uma maior capacidade de retenção de placa.

Fatores bacterianos podem interferir nos resultados, principalmente no que diz respeito às características fisiológicas da célula bacteriana, o estágio de crescimento em que ela se encontra e a densidade de células na suspensão.

Entretanto, embora todos esses parâmetros sejam controlados, pequenas variações são inevitáveis, devendo ser consideradas na interpretação dos resultados. Quando culturas de células bacterianas atingem uma situação de falta de nutrientes ou excesso de produtos metabólicos ocorre uma diminuição no ritmo de crescimento (BHATTI et al., 1997).

7.3 Avaliação da bioaderência utilizando o microscópio eletrônico de varredura

TABELA 5 - Representa a seq. A (s/s) e o grau de recobrimento do corpo de prova.

SEQÜÊNCIA B (S/S)	NÚMERO DE UFC/ μm^2	ÁREA TOTAL DE UFC/ μm^2	GRAU DE RECOBRIMENTO UFC/ μm^2
1	6	3,72	5,78
3	8	4,96	7,70
5	21	13,02	20,22
7	28	17,36	26,96
9	70	43,4	67,41

Fonte: autoria própria. Obs. Valores constantes: Média do diâmetro do microorganismo = $0,62 \mu\text{m}^2$. Área das amostras para aumento de 5000 = $64,38 \mu\text{m}^2$.

TABELA 6 - Representa a seq. B (c/s) e o grau de recobrimento do corpo de prova.

SEQÜÊNCIA A (C/S)	NÚMERO DE UFC/ μm^2	ÁREA TOTAL DE UFC/ μm^2	GRAU DE RECOBRIMENTO UFC/ μm^2
1	17	10,54	16,37
3	52	32,24	50,07
5	95	58,90	91,48
7	134	83,08	129,00
9	175	108,50	168,53

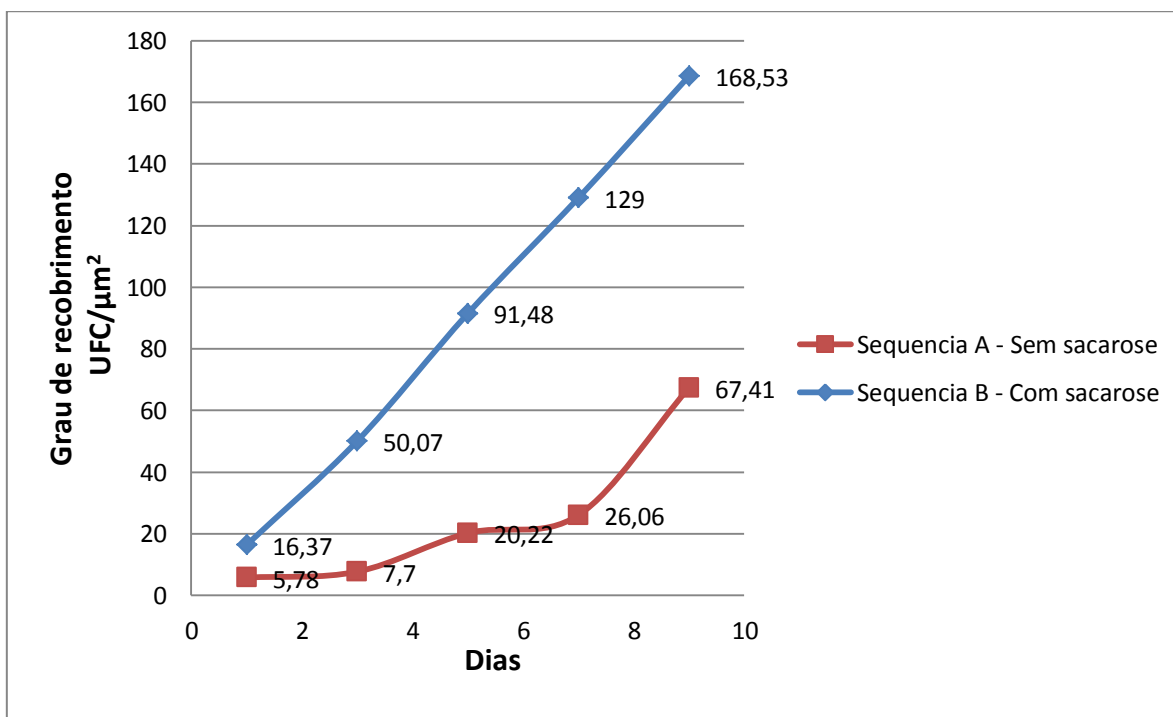
Fonte: autoria própria. Obs. Valores constantes: Média do diâmetro do microorganismo = $0,62 \mu\text{m}^2$. Área das amostras para aumento de 5000 = $64,38 \mu\text{m}^2$.

As TABs. 5 e 6 relacionam o grau de recobrimento dos microorganismos na sequência A e na sequência B (com sacarose) sobre a superfície do fio ortodôntico (aço inoxidável). Na sequência A pode-se observar que no intervalo entre o 7° e 9° dia de ensaio houve um aumento do número de microorganismos em contato com a

superfície do fio ortodôntico, em contrapartida, ficou evidenciado que na sequência B os valores de recobrimentos proporcionalmente maiores em relação aos valores da sequência A, especificamente nos intervalos entre o 5º e 7º dias, como também entre o 7º e o 9º dia. Este fato deve-se provavelmente a alternância de meio de cultura que após um período de 24h foram trocados a fim de manter um número de microorganismos aproximadamente constante que garantisse o fenômeno da bioaderência.

De acordo com Borges, Castilho e Pereira (2008), em um estudo que determinou o efeito *in situ* da sacarose, lactose e glicose+frutose na colonização do esmalte por *S. mutans* e seu potencial cariogênico *in vitro*, a sacarose obteve, a maior média de número de colônias, seguida da lactose e da glicose+frutose. Além disso, o acréscimo de açúcares aos meios de cultura favoreceu quedas acentuadas de pH no biofilme em função da produção de ácidos pelos *S. mutans*, indicando a relação açúcar-dependente desse microrganismo. Dessa forma, estimula-se a realização de outros ensaios de aderência de *S. mutans* à braquetes ortodônticos utilizando-se diferentes concentrações de sacarose. O GRAF. 2 representa o grau de recobrimento dos fios ortodônticos nas sequências A e B (com sacarose) durante um período de 10 dias.

Gráfico 2 – Grau de recobrimento em UFC/ μm^2 por dias com Área total de 64,38 μm^2 analisada ao aumento de 500x



Fonte: autoria própria

O gráfico 2 demonstra o recobrimento entre as sequências A e B, sendo que na sequência B (com sacarose) houve um aumento relativamente proporcional, indicando uma maior quantidade de microorganismos aderidos em comparação a sequência A.

Os estreptococos do grupo mutans possuem capacidade de produzir, a partir da sacarose, polissacarídeos extracelulares com propriedades de adesão (KOLENBRANDER et al., 1998). No entanto, outros estreptococos bucais, também podem sintetizar estes polissacarídeos, mas apenas aqueles microrganismos apresentam aumento de colonização induzido pela sacarose (BARBIERI et al., 2005).

7.4 Em relação à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os índices de UFC/ μm^2 pode ser observado, abaixo no QUADRO 8.

Quadro 8 - Distribuição dos resultados quanto ao índice de aderência bacteriana nas sequências A_(S/S), B_(C/S) e Seq. C_(Padrão)

Período	Sequência	Índices
1 dia	Seq. A _(S/S)	1
	Seq. B _(C/S)	1
	Seq. C _(Padrão)	0
3 dia	Seq. A _(S/S)	1
	Seq. B _(C/S)	3
	Seq. C _(Padrão)	0
5 dia	Seq. A _(S/S)	1
	Seq. B _(C/S)	4
	Seq. C _(Padrão)	0
7 dia	Seq. A _(S/S)	2
	Seq. B _(C/S)	5
	Seq. C _(Padrão)	0
9 dia	Seq. A _(S/S)	3
	Seq. B _(C/S)	5
	Seq. C _(Padrão)	0

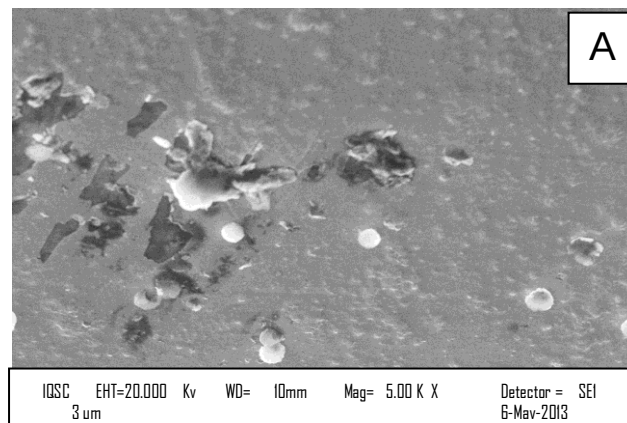
Fonte: TREIN ET AL., 2006. (Adaptado pelo autor).

Pode-se observar que a maioria dos fios ortodônticos submetidos na sequência $A_{(S/S)}$, apresentaram índices de aderência microbiana de 1 (recobrimento mínimo de colonização), mas ao 9º dia apresentou índices de aderência microbiana de 3 (recobrimento quase total do corpo de prova). A maioria dos fios ortodônticos submetidos na sequência $B_{(C/S)}$, apresentaram índices de aderência microbiana de 4 e 5 (recobrimento quase total e total do corpo de prova). Apenas os corpos de prova presentes na sequência $C_{(Padrão)}$ apresentaram ausência de colonização bacteriana.

A seguir, nas FIGs. 15 e 16 são apresentadas eletromicrografias para cada um dos índices encontrados na análise da formação de aderência bacteriana nos fios ortodônticos submetidos as duas sequências (Seq. $A_{(S/S)}$ e Seq. $B_{(C/S)}$)

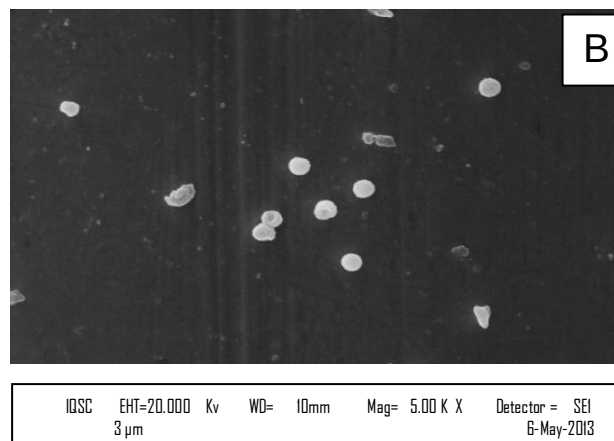
A FIG. 15 representa a aderência bacteriana na sequência $A_{(S/S)}$ durante os 1º, 3º, 5º, 7º e 9º dia de ensaio.

Figura 15. A - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência $A_{(S/S)}$ no aumento de 5000x para o índice 1 (recobrimento mínimo de colonização).



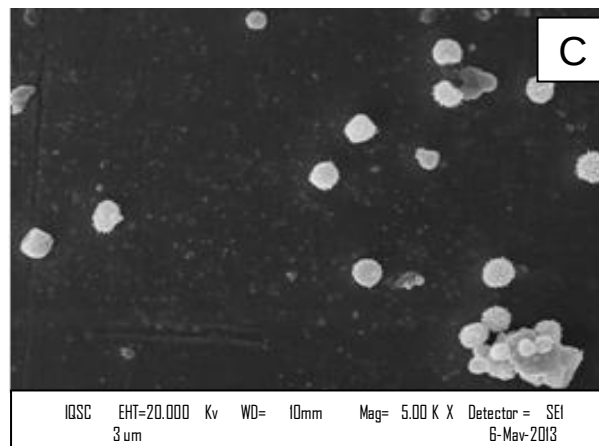
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 15. B - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência $A_{(S/S)}$ no aumento de 5000x para o índice 1 (recobrimento mínimo de colonização).



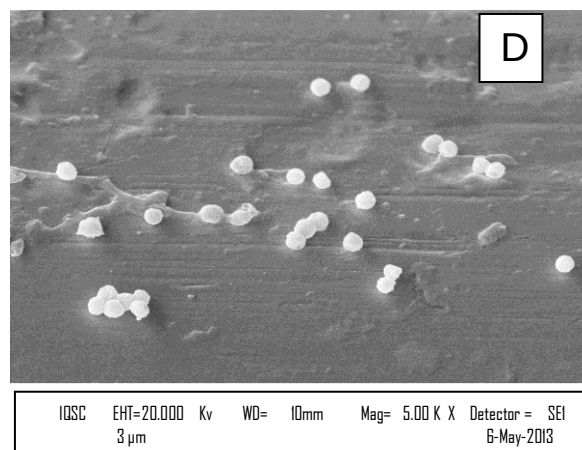
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 15. C - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A_(S/S) no aumento de 5000x para o índice 1 (recobrimento mínimo de colonização).



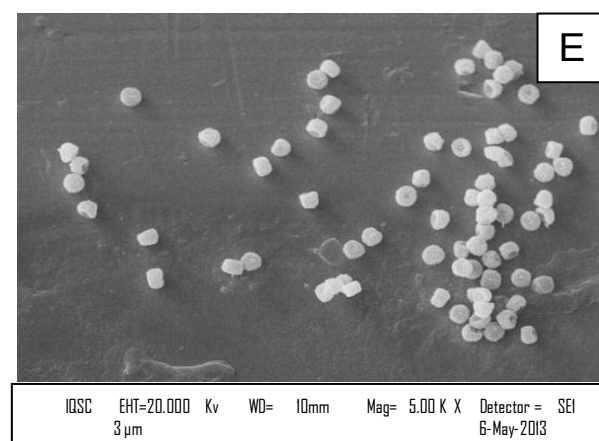
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 15. D - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A_(S/S) no aumento de 5000x para o índice 2 (pontos esparsos de colonização).



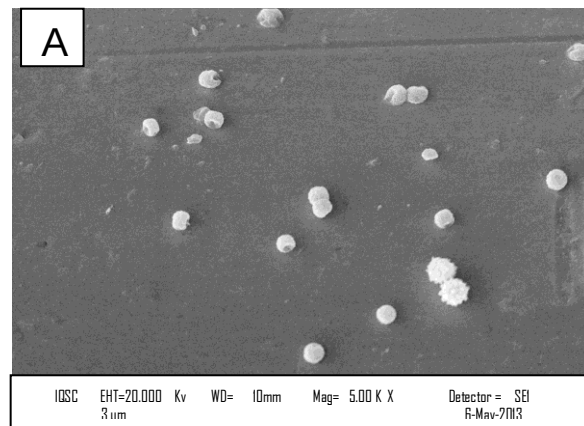
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 15. E - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A_(S/S) no aumento de 5000x para o índice 3 (área de colonização avançada).



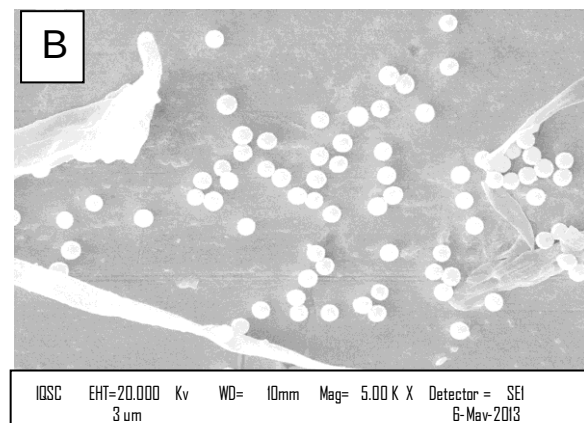
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 16. A - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B_(C/S) no aumento de 5000x para o índice 1 (recobrimento mínimo de colonização).



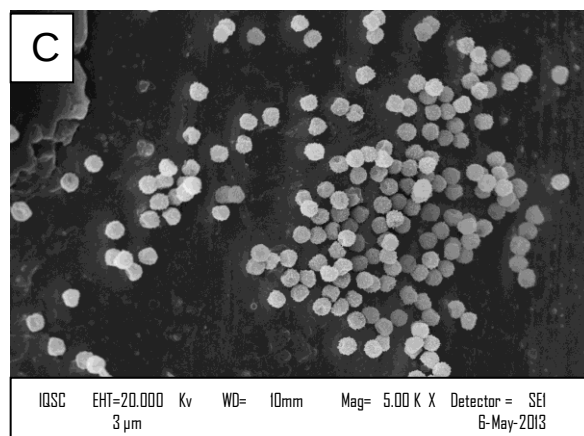
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 16. B - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B_(C/S) no aumento de 5000x para o índice 3 (área de colonização avançada).



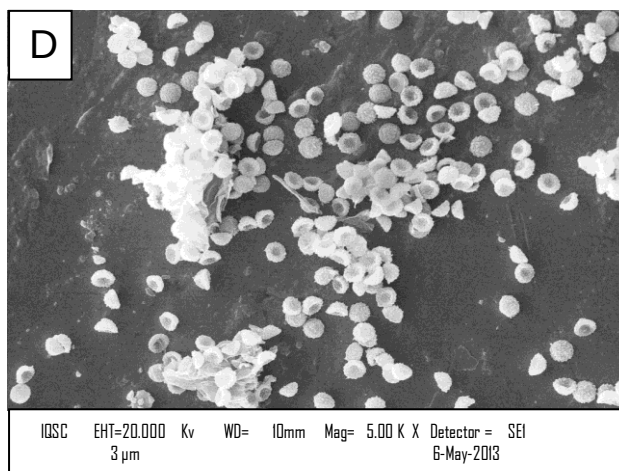
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 16. C - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B_(C/S) no aumento de 5000x para o índice 4 (recobrimento quase total do corpo de prova).



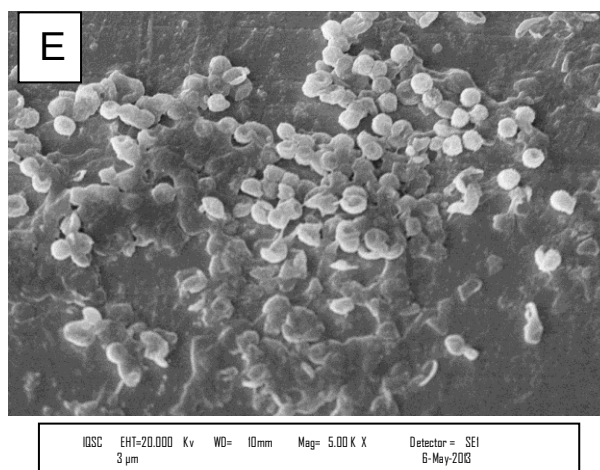
Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 16. D - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B_(C/S) no aumento de 5000x para o índice 5 (recobrimento total do corpo de prova).



Fonte: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Figura 16. E - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B_(C/S) no aumento de 5000x para o índice 5 (recobrimento total do corpo de prova).



Esta análise possibilitou também o entendimento da configuração espacial dos fios ortodônticos, bem como a visualização minuciosa da área de colonização de suas superfícies (ver apêndice 1).

Estudos *in vitro* da aderência de *S. mutans* utilizam diferentes métodos de avaliação, como contagem de UFC, turbidimetria, cintilografia e MEV, porém, com tempos de incubação sempre bastante inferiores e utilizando como corpos de prova, diferentes materiais, portanto não exibindo o padrão de aderência obtido neste estudo.

Quando se analisa as eletromicrografias dos fios ortodônticos submetidos tanto à sequência A quanto na sequência B, inicialmente observa-se um pequeno número de colônias aderidas às superfícies destes, não havendo formação de um

biofilme espesso. Esse achado difere dos resultados de outros estudos de análise da aderência de *S. mutans* a materiais odontológicos em MEV, que observaram a formação de um biofilme maciço e espesso (BARBIERE, 2005; GONDIM, 2010). No entanto, Barbieri (2005) incubou dentes humanos por 21 dias e Gondim (2010) incubou diferentes materiais restauradores por 15 dias, sendo que em ambas as pesquisas houve renovação do meio de cultura a cada 48 horas. Dessa forma, o número reduzido de colônias observado nas eletromicrografias do presente estudo, provavelmente se deve ao tempo de incubação das amostras, que foi de 24 horas.

Todavia, a escolha desse intervalo de tempo é perfeitamente justificável, já que são necessárias pelo menos 24 horas sem higiene bucal para que haja a formação de uma camada de biofilme clinicamente evidenciável. Sendo que o tempo que as bactérias bucais levam para dobrar de número (tempo de geração média) é estimado em 3 horas. Isso significa que um único microrganismo pode multiplicar-se atingindo um total de 256 microrganismos em 24 horas (SANTOS; JORGE, 2007).

Além disso, é preciso realizar também estudos quantitativos a respeito das características superficiais desses fios ortodônticos, pois o polimento de uma superfície é a média de altura entre picos (saliências) e depressões (vales) devendo ser quantitativamente mensurada de forma tridimensional. Para esse fim, o Microscópio de Força Atômica pode ser utilizado (MATASA, 1997).

Estudos *in vitro* apresentam limitações quanto à reprodução das condições bucais naturais como capacidade tampão da saliva, hábitos alimentares e características individuais/coletivas (HUYSMANS; VIEIRA; RUBEN, 2005). Contudo, os mesmos são amplamente empregados no campo da microbiologia para avaliação da aderência microbiana. Nesta perspectiva, sugere-se que estudos adicionais como a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) para análise das bactérias viáveis, sejam realizados com espécies diferentes, abrangendo cepas de referência e selvagem para verificar se a aderência dos microrganismos se comporta de forma similar a demonstrada no presente trabalho, bem como estudos *in situ* que possam fornecer maior fidedignidade aos resultados.

8 CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste trabalho e com base nos resultados obtidos nas metodologias empregadas, pôde-se concluir que:

- O caldo BHI e BHI sacarosado (modificado) permitiu avaliar a viabilidade de *S. mutans* nos sistemas de aderência *in vitro*, após diferentes períodos de tempo. De acordo com o estudo *in vitro* com cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), observou-se viabilidade de microrganismos pelas células recuperadas das colônias nas diluições de 10^7 , 10^6 , 10^5 por até 240 horas.
- A utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possibilitou identificar áreas de colonização sobre o aço inoxidável 316L.
- Os meios BHI e BHI sacarosado (modificado) foram diferentes na quantificação (contagem) de *Streptococcus mutans* evidenciando que a substituição da glucose pelo pela sacarose alterou a eficácia do meio.

8.1 Proposições para futuras pesquisas

- Além dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser sugerido o estudo e análise da biocorrosão causada pelo *Streptococcus mutans* na superfície do corpo de prova e a liberação de íons durante o processo que podem ser acumulados no corpo de um paciente em tratamento ortodôntico.
- Avaliar o efeito *in vitro* de vegetais com potencial sobre a viabilidade celular e o crescimento de *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

American Public Health Association (APHA), **“Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”**, 18th ed., Washington DC, ISBN 087553-207-1, 1992.

AMERICAN IRON AND STEEL INSTITUTE - **AISI**. Southfield: AISI, 2008. Disponível em: <<http://www.steel.org>>. Acesso em: Janeiro 2013.

ANHOURY, P. et al. **Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials**. Angle orthod., Appleton, v. 72, n. 4, p. 338-343, Aug. 2002.

AOAC – **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 17th ed., 2002.

ASTM Standard G 1-90. **Standard practice for preparing, cleaning and evaluating corrosion test specimen**. (Philadelphia PA: ASTM 1990).

BALENSEIFEN, J. W.; MADONIA, J. V. **Study of Dental Plaque in Orthodontic Patients**. J Dent Res, Alexandria, v. 49, n. 2, p. 320-324, Mar./Apr. 1970.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da aderência “in vitro” de Streptococcus mutans e Candida albicans na superfície dentária**. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BASTOS, J. R. M.; HENRIQUES, J. F. C.; OLYMPIO, K. P. K. **Manual de prevenção de cárie dentária e doença periodontal em pacientes sob tratamento ortodôntico**. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, 2002.

BENHAM, A.W.; CAMPBELL, P.M.; BUSCHANG, P.H. Effectiveness of pit and fissure sealants in reducing white spot lesion during orthodontic treatment. **Angle Orthodontist**. Appleton, v.79, n.2, p.338-345, mar. 2009.

BHATTI, M.; ROBERT, A.M.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Effect of Dosimetric and Physiological Factors on the Lethal Photosensitization of Porphyromonas gingivalis in vitro. **Photochem Photobiol.**, v.65, n.6, p.1026-1031, 1997.

BORGES, M. F.; CASTILHO, A. R. F.; PEREIRA, C. V. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo in situ e in vitro. **Rev. odonto. ciênc.**, Porto Alegre, v. 23, n. 4, p. 360-364, out./dez. 2008.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. **The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique.** Arch. oral biol., New York, v. 30, n. 3, p. 265-268, 1985.

CASTRO, A. M. et al. ***Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária.** Rev. do CROMG, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, p. 24-27, jan./abr. 2000.

COLE, M. F. et al. **Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin.** A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. Infect. immun., Washington, v. 67, n. 4, p. 1878-1886, Apr. 1999.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T.; TABCHOURY, C. P. **Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose.** Caries Res 2000;34:491-7.

DANTAS, E. **“Determinação das Taxas de Corrosão. Tratamento de Águas de Refrigeração e Caldeiras”**, Ed. José Olympio, ECOLAB, 1988, pág. 50-62.

DE LORENZO, J. L. Placa (biofilme) dental. In:_____ **Microbiologia para o estudante de Odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. p.73-85.

DONOGHUE, H. D.; PERRONS, C. J. **Effect of nutrients on defined bacterial plaques and *Streptococcus* C67-1 implantation in a model mouth.** Caries res., Basel, v. 25, n. 2, p. 108-115, 1991.

DIAS, J.C.N.; OLIVEIRA, R.C.B.; CORREIA, A.N; SOBRAL, A.V.C. **Estudo da ocorrência da corrosão em aços inoxidáveis AISI 316L e 444 utilizados na indústria petroquímica.** 6º COTEQ Conferência sobre Tecnologia de Equipamentos, 22º CONBRASCORR – Congresso Brasileiro de Corrosão Salvador - Bahia - 19 a 21 de agosto de 2002. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Analítica e Física Química. CE, BRASIL.

DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. **Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content.** Journal of Dental Research, Alexandria, v. 67, n. 6, p. 890-895, jun. 1988.

ELIADES T, ELIADES G, BRANTLEY WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 108(4): 351-360, 1995.

ERRICSSON, Y. **Clinical investigations of the salivary buffering action.** ActaOdontol.Scand., 17: 131-165, 1959.]

FALTERMEIER, A.; BURGERS, R.; ROSENTRITT, M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. Am. j. orthod. dentofacial orthop., St. Louis, v. 133, n. 4, p. 99-103, Apr. 2008.

FERREIRA, J.T.L. **Avaliação da resistência à corrosão de materiais metálicos utilizados em aparelhos ortodônticos fixos.** Tese submetida ao corpo docente da coordenação dos programas de pós-graduação de engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de doutor em ciências em engenharia metalúrgica e de materiais. Rio de Janeiro. Outubro, 2005.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com confeites: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 291-296, 2005.

FLEISCHMANN, L. A. et al. **Estudo comparativo de seis tipos de braquetes ortodônticos quanto à força de adesão.** Rev. dent. press ortodon. ortopedi. facial., Maringá, v. 13, n. 4, p. 107-116, jul./ago. 2008.

GARCIA, A; SPIM, J.A; SANTOS, C.A. **Ensaio dos materiais.** Rio de Janeiro: LTC, 2000.

GWINNETT, A. J.; CEEN, R. F. **Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study.** Am. j. orthod., St. Louis, v. 75, n. 6, p. 667-677, June 1979.

GOLD, O.G., JORDAN, H.V. & VAN HOUTE, J.A **selective medium for Streptococcus mutans**.Arch. Oral Biol., 18, 1357-1364, 1973.

GONÇALVES, N.J., SÉRVULO, E.F.C., FRANÇA, F.P.**Ação de biocida à base de glutaraldeído e sal quaternário de amônio no controle de microorganismos sésseis**.6° COTEQ Conferência sobre Tecnologia de Equipamentos22° CONBRASCORR – Congresso Brasileiro de Corrosão Salvador – Bahia19 a 21 de agosto de 2005.

GRANER, R.O.M; GONÇALVES, R.B; HOFLING, J.F. Disciplina: Pré-Clínica II (DP-201). **Aspectos microbiológicos da placa dental**. Área de Microbiologia e Imunologia. FOP-UNICAMP.PIRACICABA, 2005.

HEINTZE, S. D. **A profilaxia individual em pacientes com aparelhos fixos: recomendações para o consultório**. Ortodontia, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 4-15, maio/ago.1996.

HENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, n. 2, p. 661-669, 2007.

JENKINSON, H. F. **Adherence and accumulation of oral streptococci**. Trends Microbiol., n. 2, p. 209-212, 1994.

JÚNIOR, J.G.B; GARRAFA, V. **Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica**.Rev Saúde Pública 2007;41(2):223-8. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil. Cátedra Unesco de Bioética. Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil.

KOLENBRANDER PE, ANDERSEN RN, BAKER RA, JENKINSON HF. The adhesion-associated sca operon in Streptococcus gordonii encodes an inducible highaffinity ABC transporter for Mn21 uptake. **J Bacteriol**, 180(2): 290-295, 1998.

KOLENBRANDER PE, LONDON J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J Bacteriol** , 175(11): 3247-3252, 1993.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **Ann. rev. microbiol.**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 413-37, Oct. 2000.

KÜHNISCH, J., et al. Effects of dental probing on occlusal surfaces – a scanning electron microscopy evaluation. **Caries res.**, Basel, v. 41, n. 1, p. 43-48, 2007.

KURAMITSU, H. K; HE, X.; LUX, R.; ANDERSON, M. H.; SHI, W. **Interspecies interactions within oral microbial communities**. Microbiol Mol Biol Rev, Los Angeles, v.71, n.4, p. 653-70, dec. 2007.

LANG, N. P.; MOMBELLI, A.; ATTSTROM, R. Placa e cálculo dentais. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 336-361.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v.50, p.353-380, 1

LORENZO, J.L.de. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. 274p.

MACHADO, G.R. RAMOS, F.B; TERRA, A.C; SANTOS, S.H; CUNHA,T.G.E; AVOGLIO, J.L.V, KAJITA, T. **Avaliação da corrosão dos braquetes ortodônticos**. SOTAU R. virtual Odontol. 2007, 1(4):15-27.

MAKAYA, N. Relatório de Projecto **Tecnológico I da Licenciatura em Química Tecnológica: Avaliação do crescimento de culturas de Streptococcus mutans e de actividade de glucosiltransferase**. Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2007.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary imunoglobulin A. **Microbiol. mol. biol. rev.**, Washington, v. 62, n. 1, p. 71-109, Mar. 1998.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, p. 279-294, 2003.

MARSH, P. D. **Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style**. J Clin Periodontol. Oxford, v. 32 (Suppl 6), p. 7-15, oct. 2005.

MATASA, C. G. Encaixe do braquete examinado através do microscópio de força atômica (MFA). **Rev. Clin. Ortodon. Dental Press**, Maringá, v. 2, n. 5, p. 60-75, set./out. 1997.

MATTOS-GRANER RO. **Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 a 30 meses de idade** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999. 155p.

MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, n. 2, p. 128-137, 2006.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRURN, J. O. **The estimation of the bacterial power of the blood**. J. hyg., London, v. 38, n. 6, p. 732-749, Nov. 1938.

MIRANDA J, LEMOS M, TORRES M. Promoção de saúde bucal em odontologia: uma questão de conhecimento e motivação. **Rev. do CROMG** 2000; 6(3):154-157.

NYVAD B, KILLIAN M. Comparison of initial streptococcal microflora on dental enamel. **Caries res**, 24(4): 267-272, 1990.

NYVAD, B.; KILLIAN, M. **Comparison of initial streptococcal microflora on dental enamel**. Caries Research, Basel, v. 24, p. 267-272, 1990.

OLYMPPIO, K.P.K.; BARDAL, P.A.P.; HENRIQUES, J.F.C.; BASTOS, J.R.M. Prevenção da cárie dentária e doença periodontal em Ortodontia: uma necessidade imprescindível. R Dental Press Ortodon Ortop Facial, Maringá, v.11, n.2, p.110-119, mar./abr. 2006.

OLIVEIRA, M.A.M. **Aspectos imunológicos e microbiológicos da candidose bucal**. Tese submetida ao corpo docente da coordenação dos programas de pós-graduação em imunologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de doutor em ciências da saúde. Salvador. 2005.

PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. **Novos biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, p.104-109, 1999.

PLATT, J.A; GUZMAN, A; ZUCCARI, A; THORNBURG, D.W; RHODES, B.F; OSHIDA, Y; MOORE, B.K. **Corrosion behavior of 2205 duplex stain less steel.** Am J Orthod Dento fac Orthop 1997; 112: 69-79.

QUIRYNEN, M. et al. **An in vivo study of the influence of surface roughness of implants on the microbiology of supra and subgingival plaque.** J. dent. res., Chicago, v. 72, n. 9, p. 1304-1309, Sept. 2008.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática:** roteiro e manual - bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu,1993. 112p.

SAAVEDRA, J.A.P.; PATTERSON, M.C.R.; PICO, M.P. Higiene Bucal: surepercusión em pacientes com tratamientos ortodóncicos. **Rev Cubana Estomatil**, Havana, v.44, n.1, jan./mar. 2007. Disponível em << www.bus.sld.cu>> acesso em 28/01/2010.

SAMPAIO, J.P.; MACHADO, E.; SAILVA, C.C.; GOMES, R.V.; MARTINS, S.C.S.; MELO, V.M.M.; SANT'NA, H.B.; SOBRAL, A.V.C. **Avaliação da Corrosão Microbiológica no Aço Inoxidável AISI 444 por Microrganismos Presentes em Amostras de Petróleo.** Universidade Federal do Ceará (UFC) – Dep. de Engenharia Mecânica e Produção. Revista Matéria, v. 10, n. 2, pp. 258 – 264. Ju de 2005.

SANTOS, S. F. S.; JORGE, A. O. C. Biofilme dentário. In: JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal.** 3. ed. São Paulo: Santos, 2007. p. 53-70.

SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: HADDAD, A. et al. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas.** 1. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. p. 1-24.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEN, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, n. 2, p. 661-669, 2007.

SILVA, A.M.A.; SANTIAGO, T.M.; GUEDES, M.I.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; FREIRE, J.A.K.; SILVA, R.C.B. **Influencia dos microrganismos *Salmonellaanatum* e *Aspergillusnigerna* de gradação da superfície do alumínio.** A. Ciências Exatas e da Terra. Revista Química Industrial. São Paulo, v. 32. pp. 40-46. 2006.

SILVA, R.C; ZUANON, A.C.C. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). **Brazilian Dental Journal**. Ribeirão Preto, v. 17, n. 2, p.106-109. 2006.

SOUSA, E.R. **Aspectos microbiológicos da cárie dental**. Salus vita, v. 25, n. 2, p. 135-148, 2006.

STAFFOLANI, N; DAMIANI, F; LILLI, C; GUERRA, M; STAFFOLANI, N.J; BELCASTRO, S; LOCCI, P. **Ion release from orthodontic appliances**. J Dent 1999; 27: 449-454.

STAMFORD, T. C. M.; PEREIRA, D. M. de S.; ALCÂNTARA, L. C. de; COUTO, G. B. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes sadios. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, Recife, v. 5, n. 1, p. 71-76, jan. / mar., 2005.

STATISTICA (data analysis software system); version 6.1, StatSoft, Inc., 2004.

STORINO; S.P. **Cariologia**: procedimentos preventivos. Rio de Janeiro: Revinter, 1993. 133p.

SUGA, S. S.; GUEDES-PINTO, A. C.; SIMIONATO, M. R. L. Avaliação in vitro da influência do polimento superficial de resina acrílica para aparelhos ortodônticos na adesão e remoção de *Streptococcus mutans*. **Rev. dent. press ortodon. ortop. facial**, Maringá, v. 10, n. 1, p. 94-107, jan./fev. 2005.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v.6, p.S311-324, 2009.

THOMÉ, T. **Análise in vitro do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão bacteriana à resina composta**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

VAN DIJK J, HERKSTROTTER J, BUSSCHER H, WEERKAMP AH, JENSEN H, ARENDS J. Surface free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs, **J Clin Periodontol**, 14(5): 300–304, 1987.

VANHAECKE, E. et al. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 788-795, 1990.

VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **J. Appl. Biomater.**, v.6, p.137-144, 1995.

VOORT, G.F.V. **Metallography and Microstructures of Metals Used in Medical Devices**. Buehler Ltd, 41 Waukegan Rd, Lake Bluff, IL 60044 USA. Microsc. Microanal 12(Supp 2), 2006. DOI: 10.1017/S1431927606061988.

WENNERHOLM, K.; BIRKHED, D.; EMILSON, C. G. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries res., Basel**, v. 29, p. 54-61, 1995.

WIATER, A.; CHOMA, A.; SZCZODRAK, J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study, **J Basic Microbiol**, 39: 265-273, 1999.

WILLIAMS, R. A. D.; ELLIOTT, J. C. Basic and applied dental biochemistry. Edinburgh: **Churchill Livingstone**, 1979, p. 180.

APÊNDICE 1

Micrografias da área de colonização na superfície do corpo de prova nas seqüências A(s/s) e B(c/s).

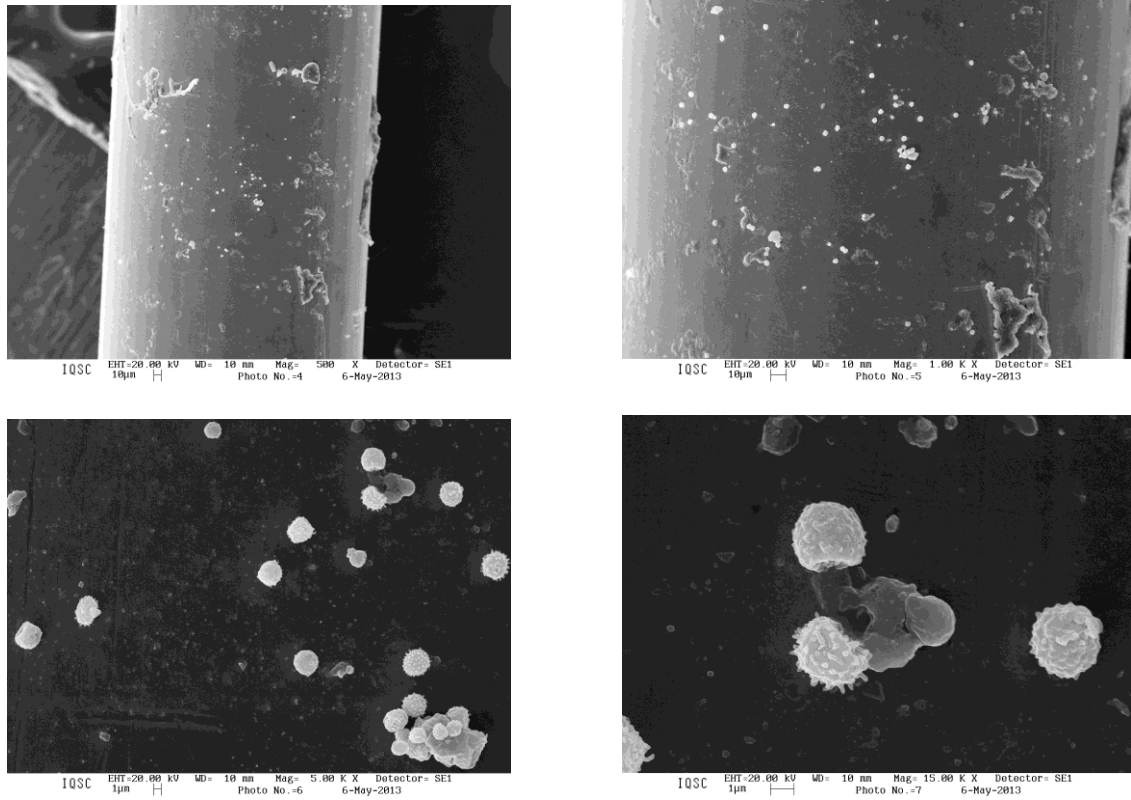


Figura 1 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A(s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

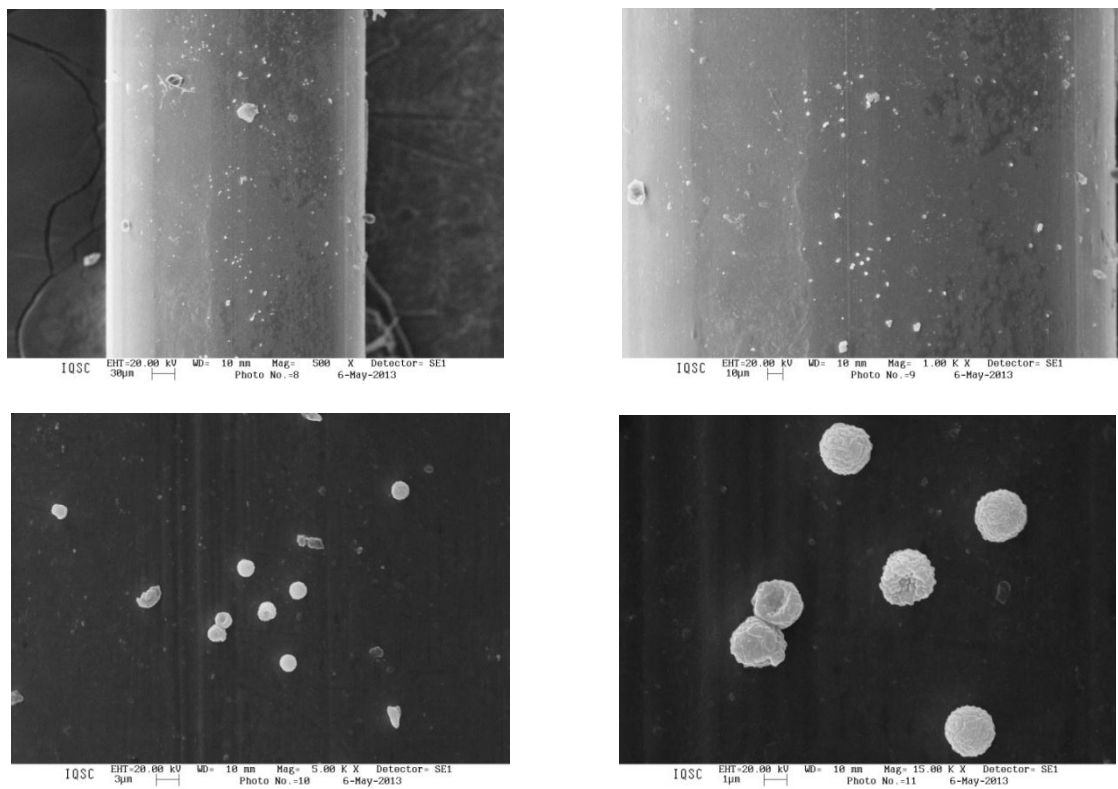


Figura 2 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

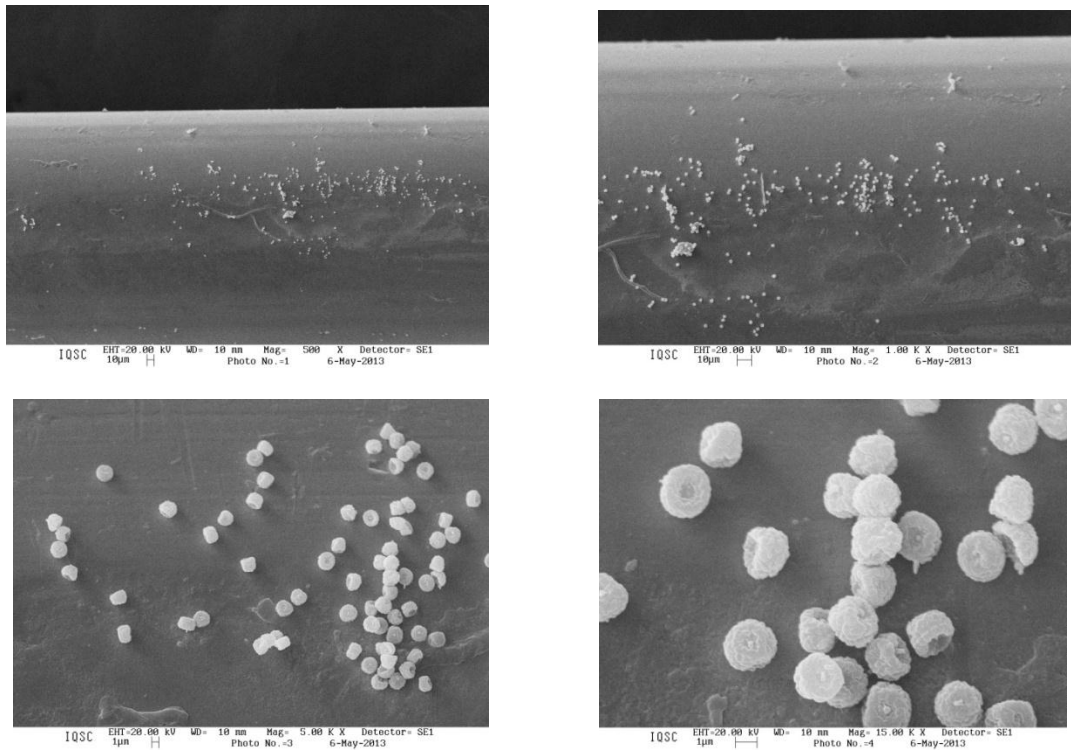


Figura 3 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

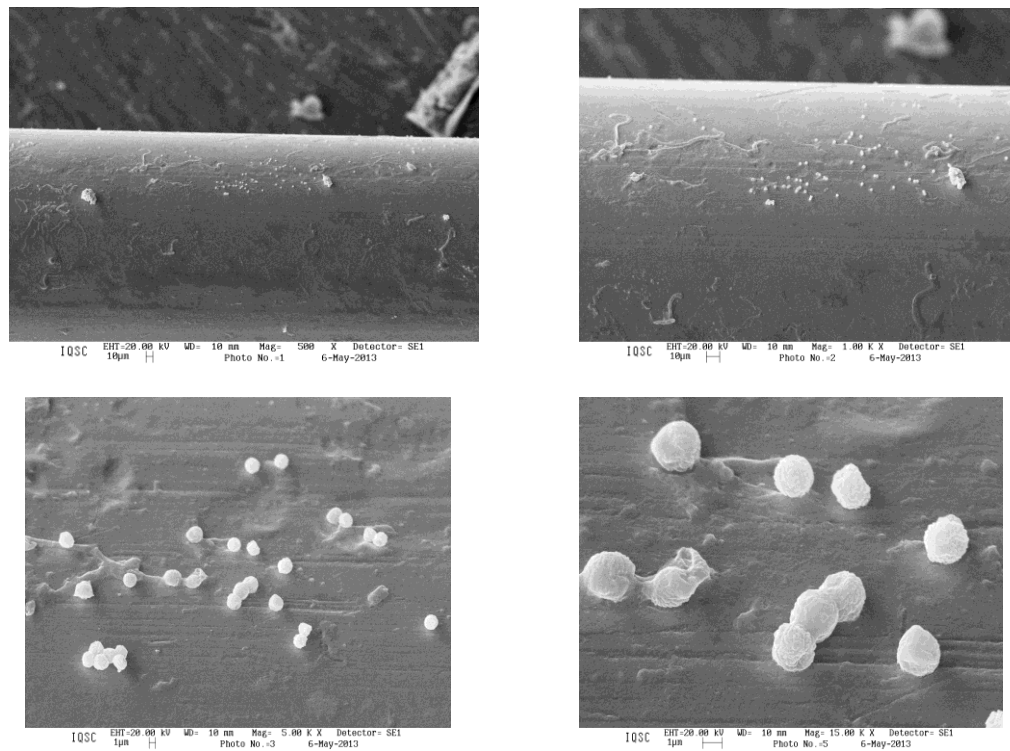


Figura 4 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

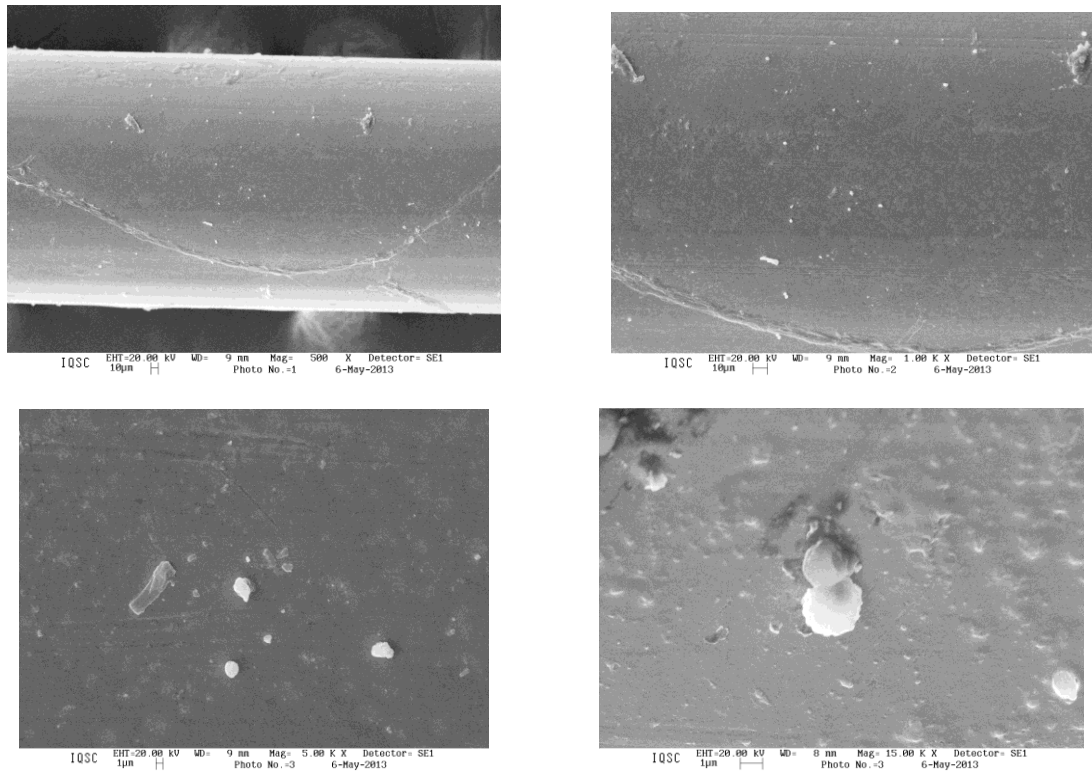


Figura 5 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A(s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

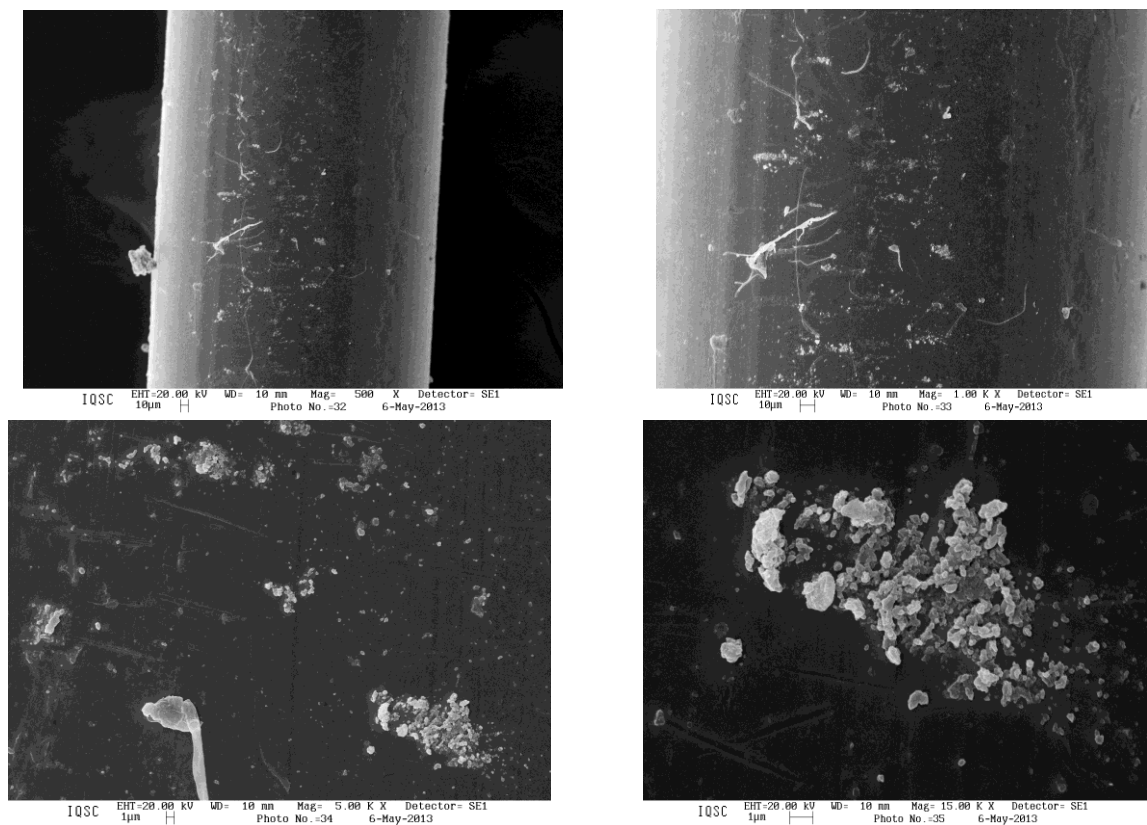


Figura 6 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

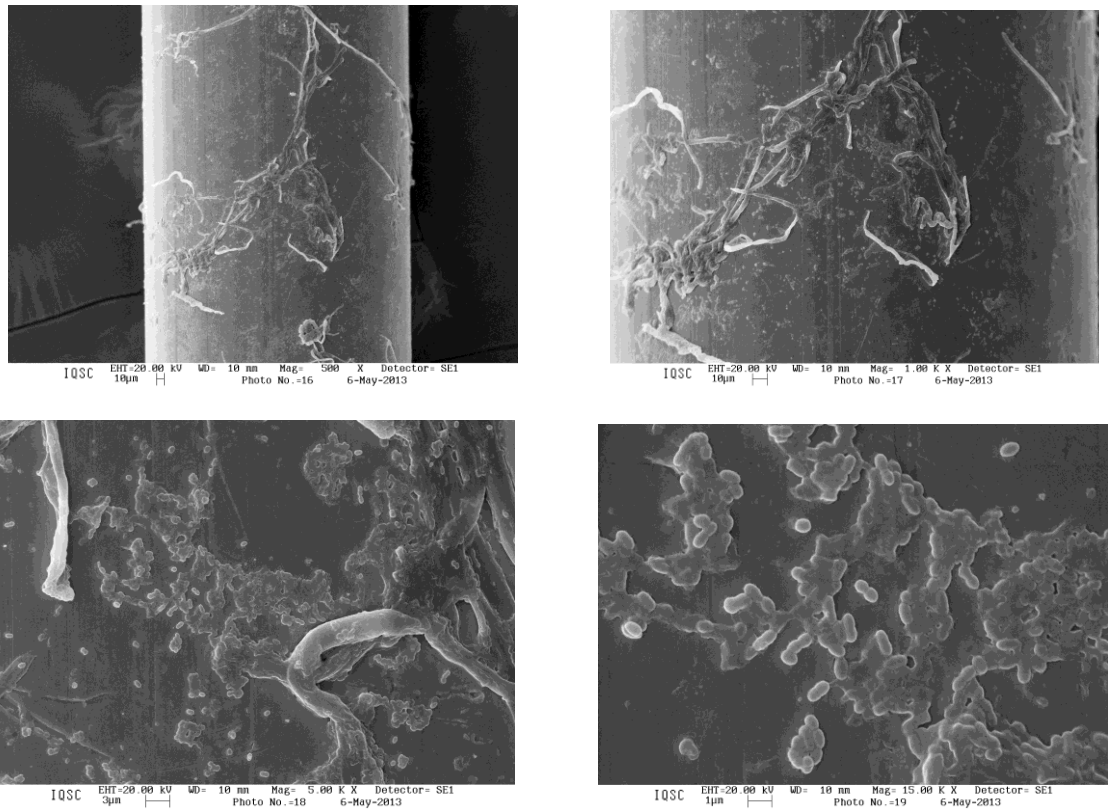


Figura 7 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

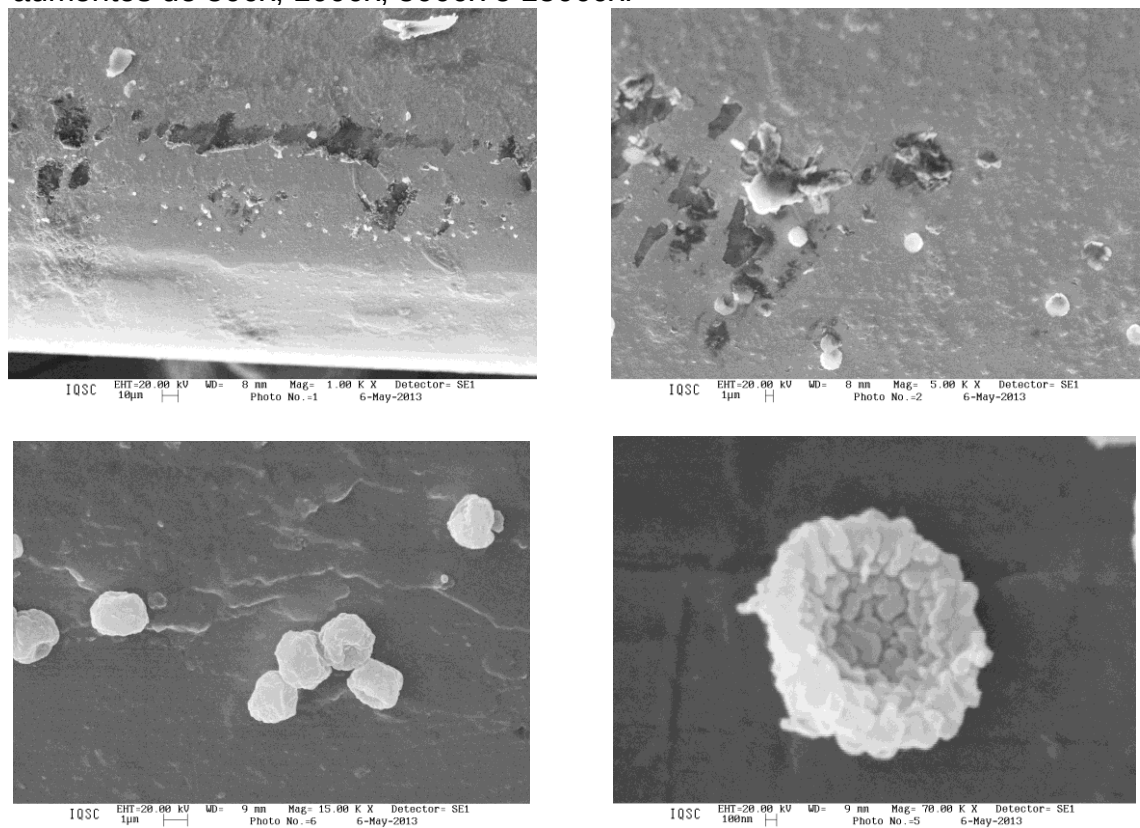


Figura 8 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

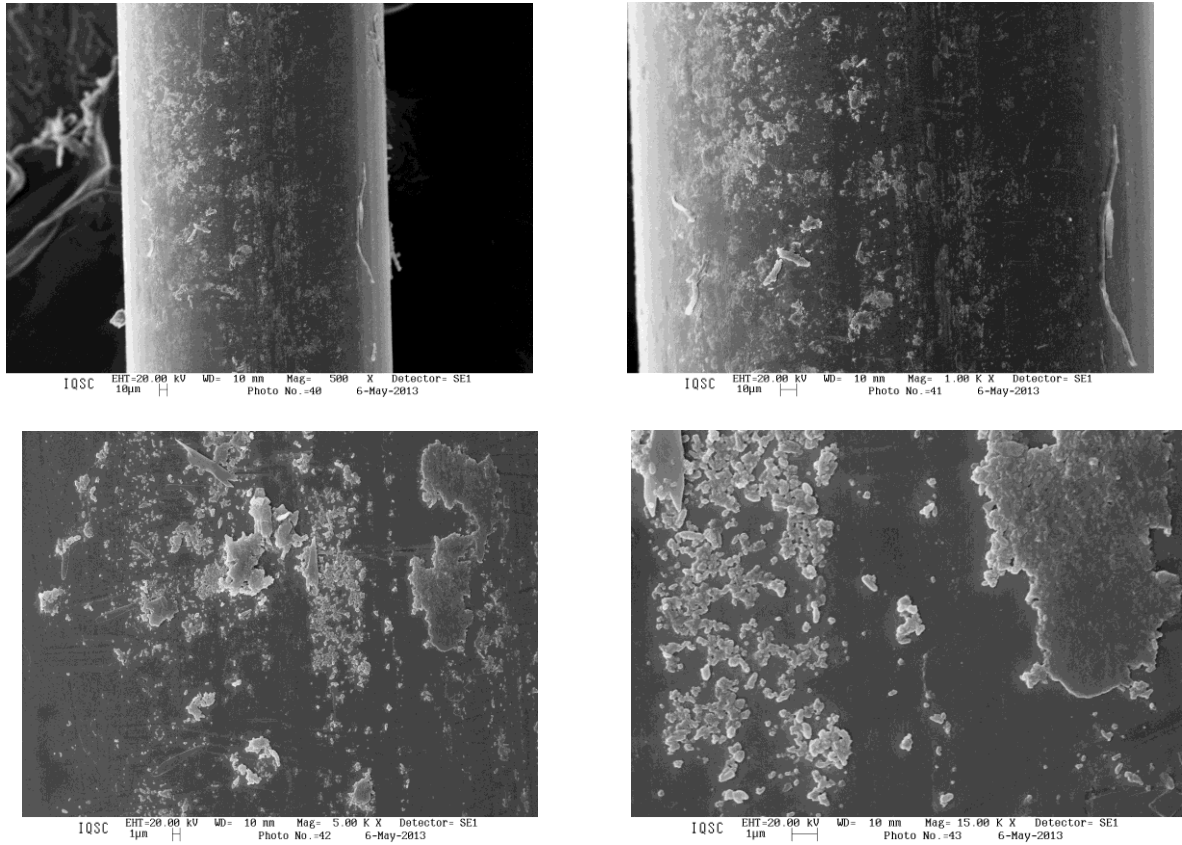


Figura 9 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

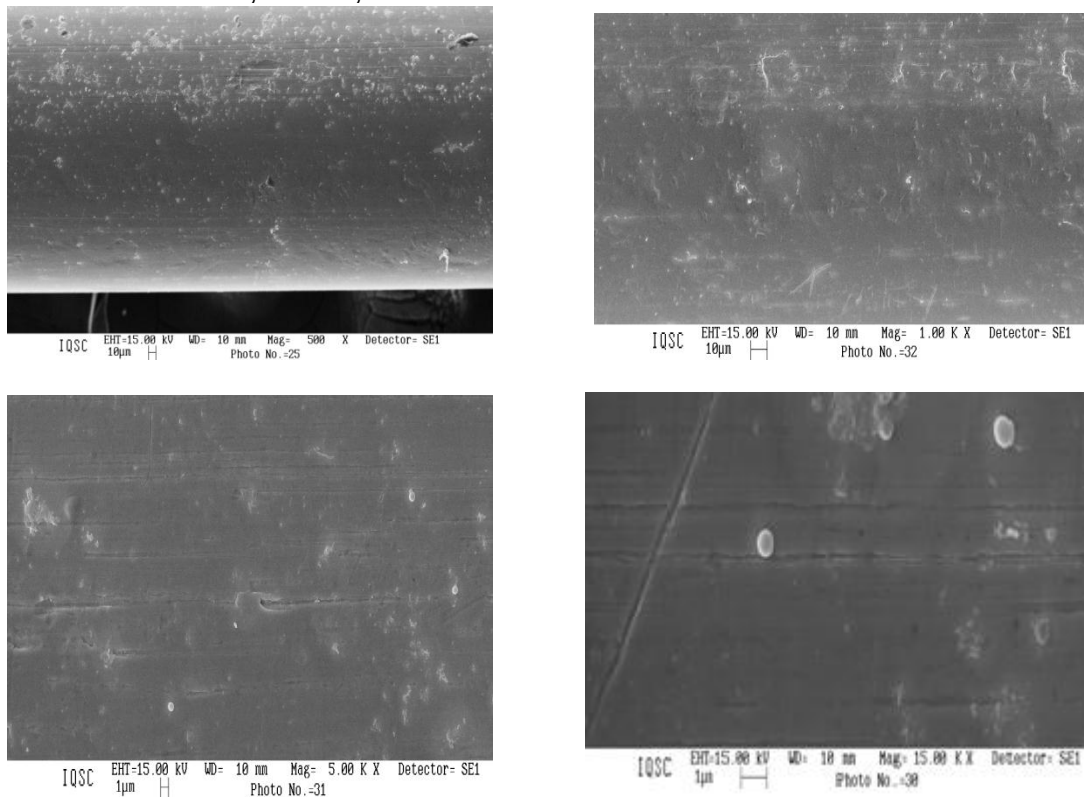


Figura 10 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência A (s/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

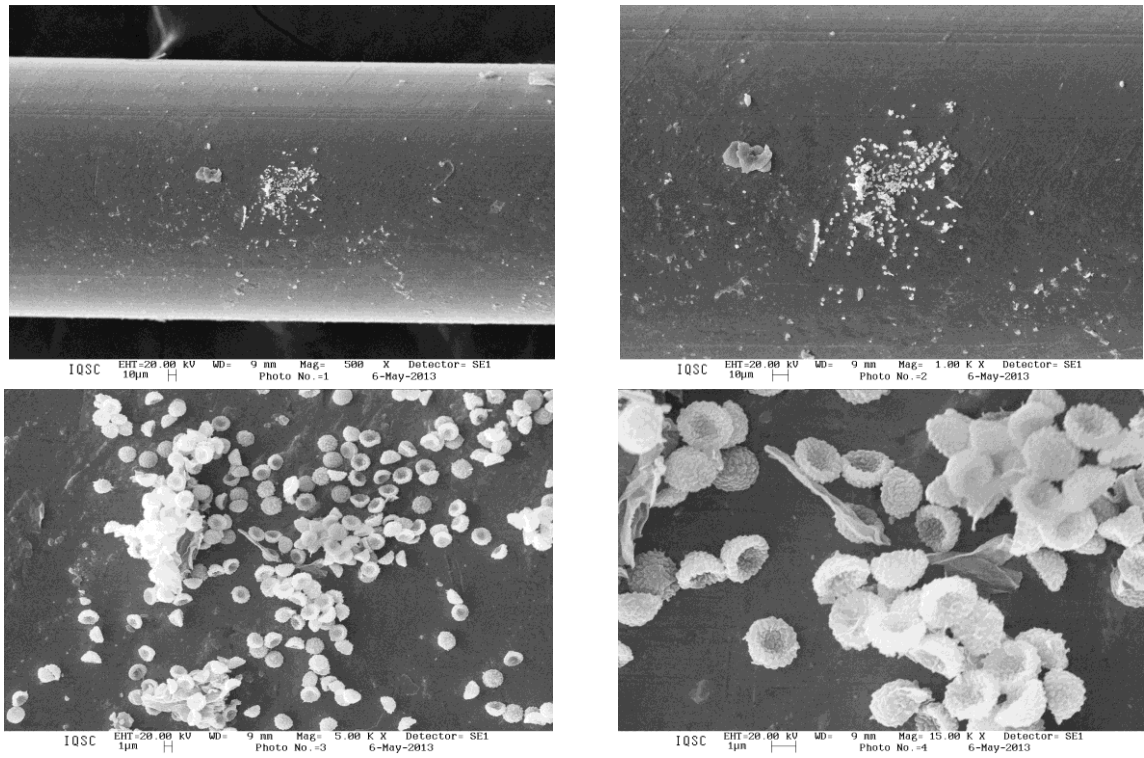


Figura 1 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

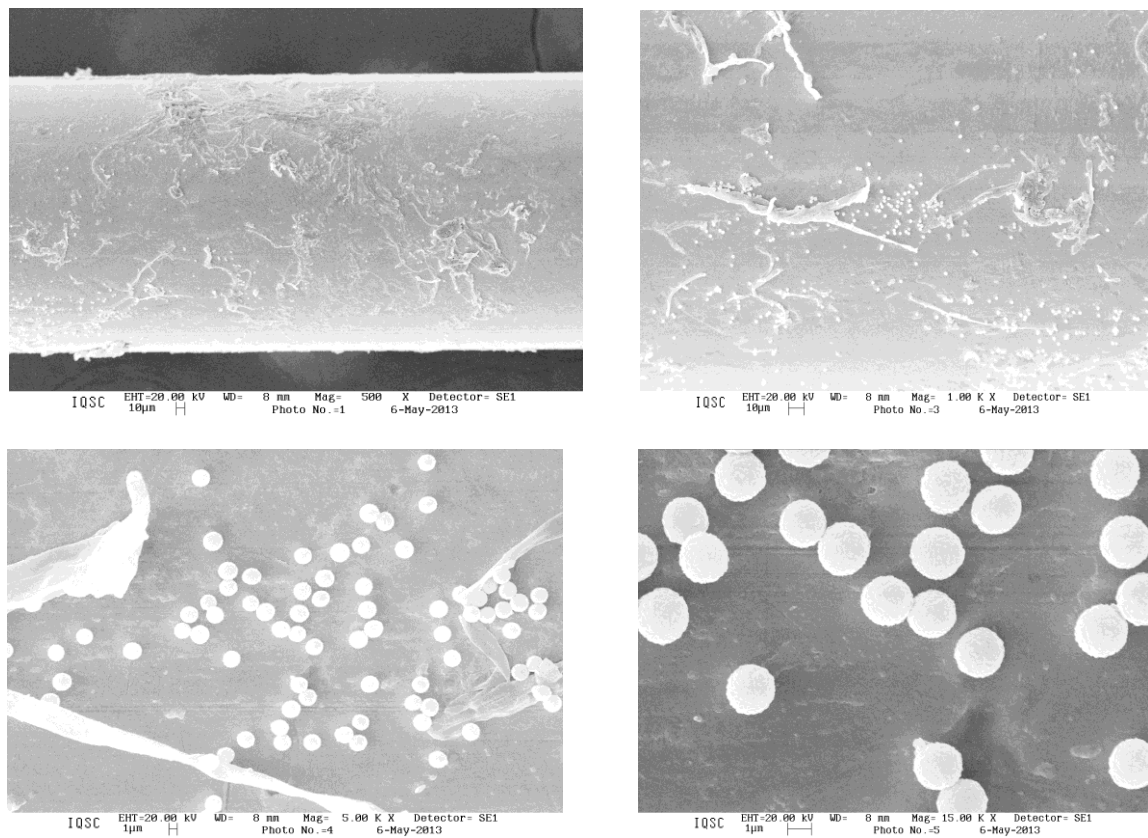


Figura 2 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

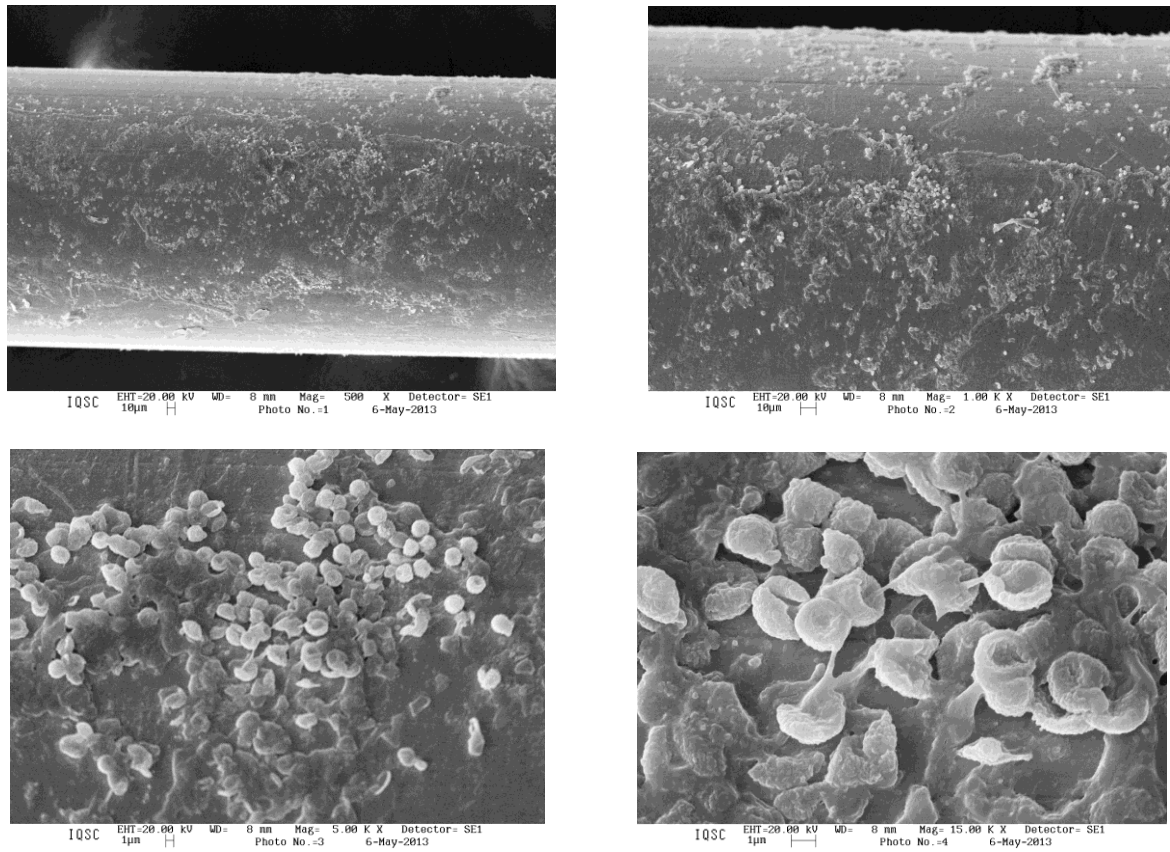


Figura 3 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

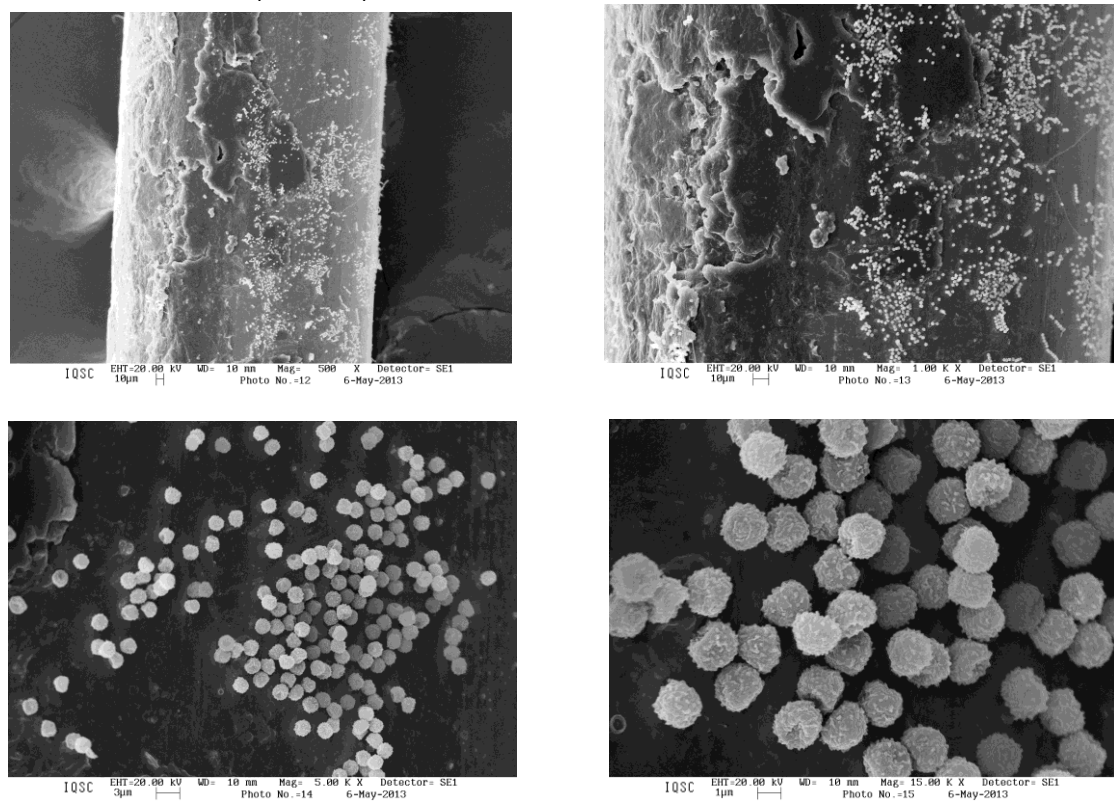


Figura 4 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

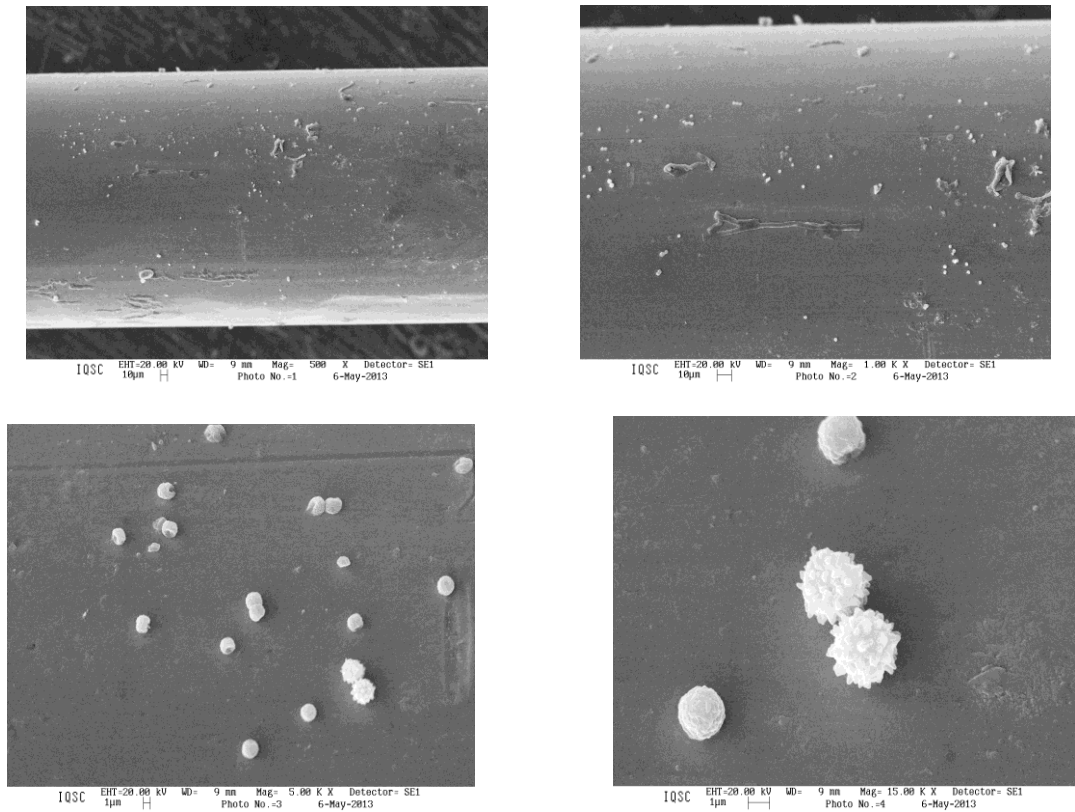


Figura 5 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

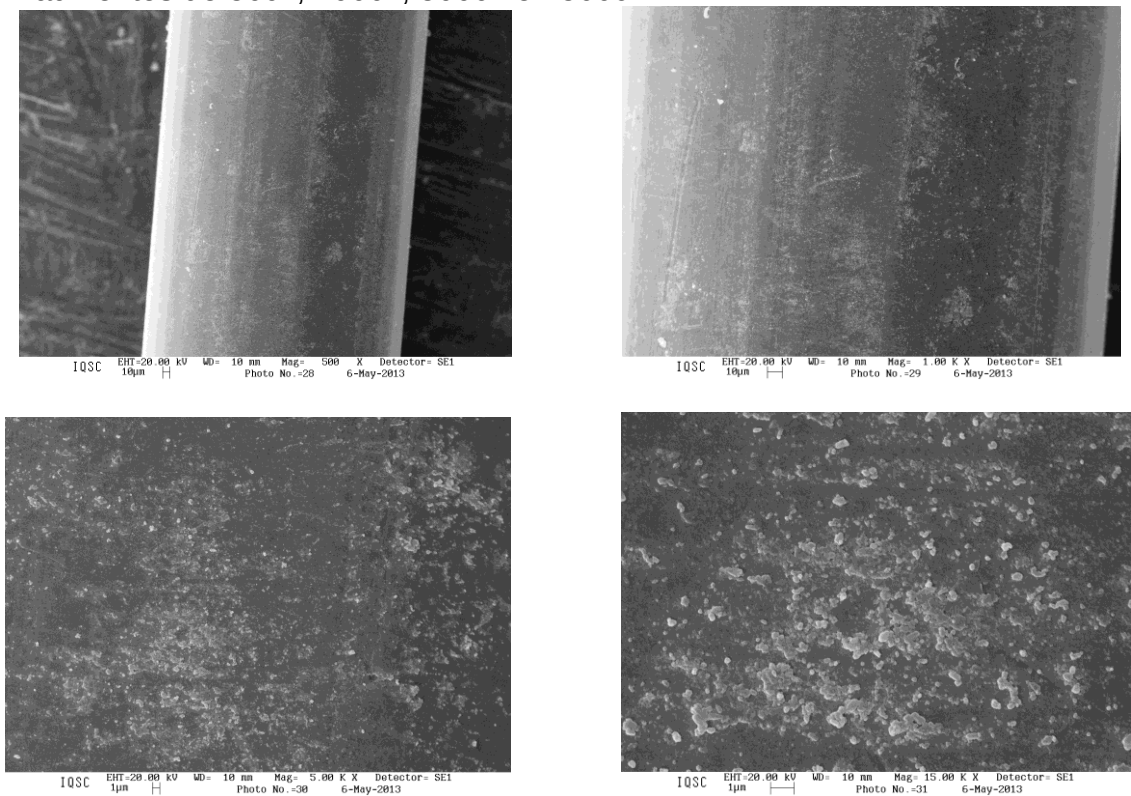


Figura 6 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

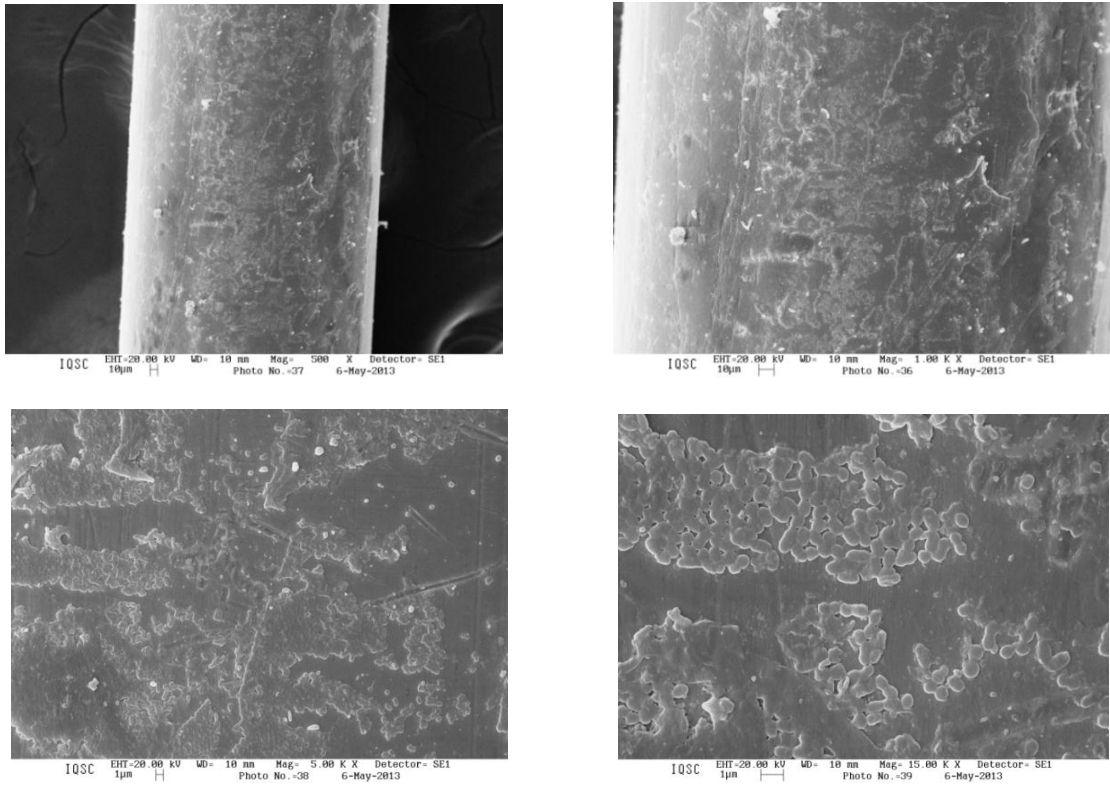


Figura 7 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

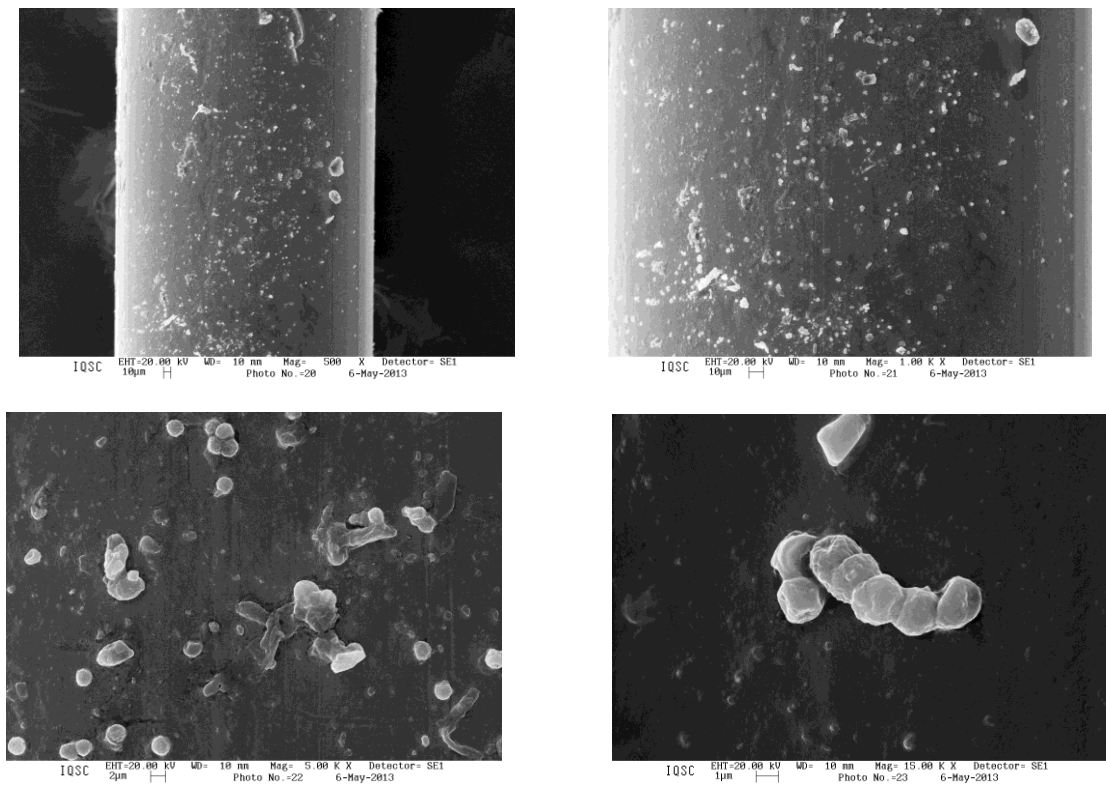


Figura 8 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

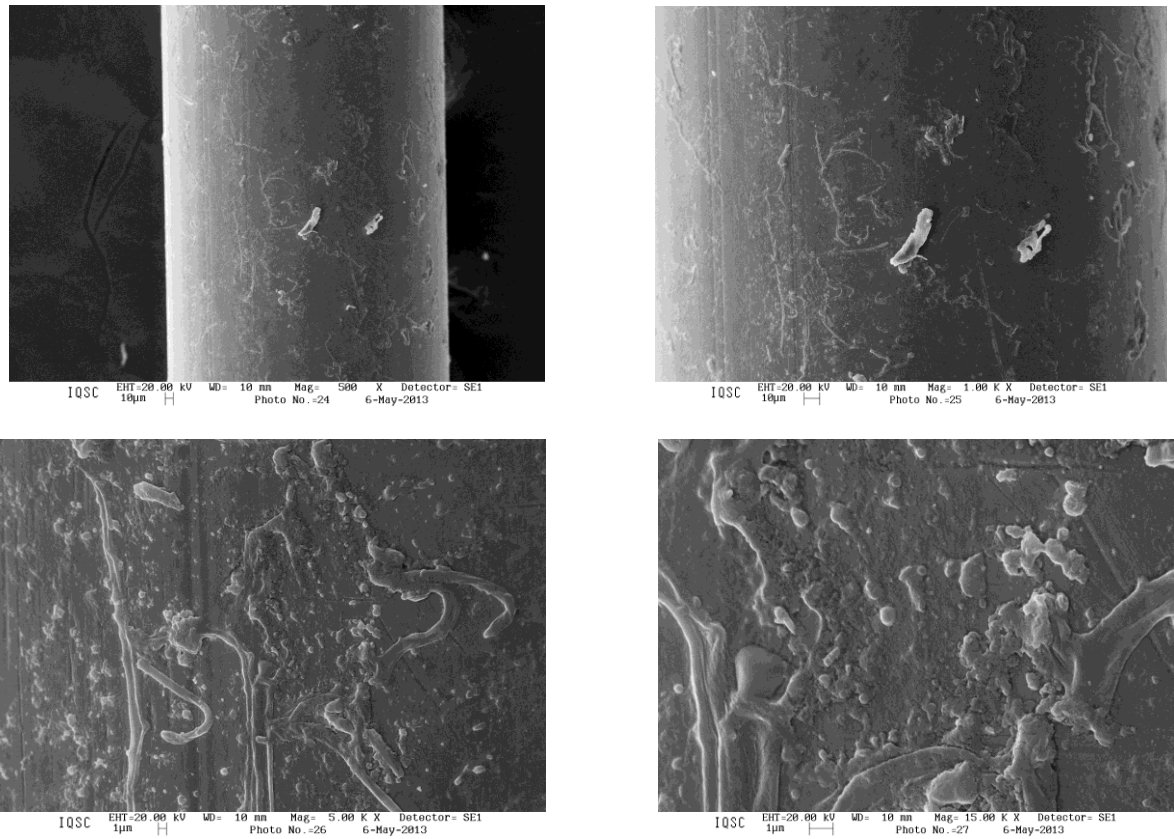


Figura 9 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s). nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.

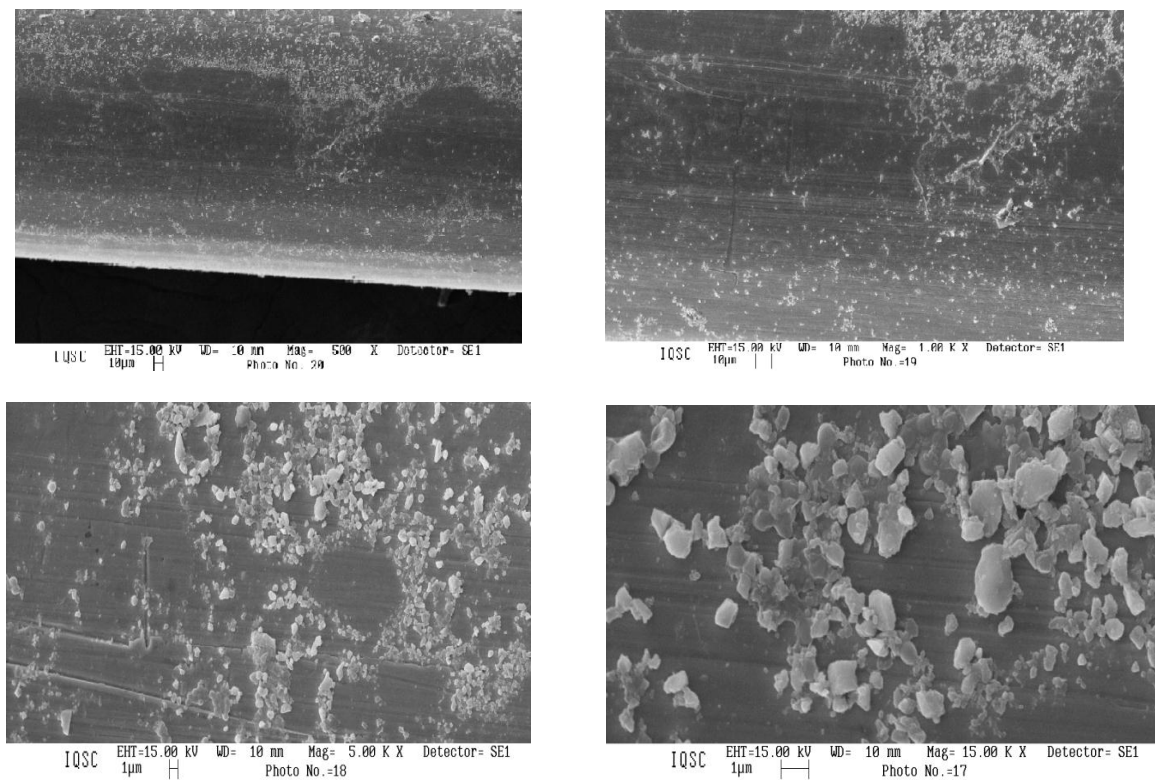


Figura 10 - Observação da aderência de *S. mutans* na sequência B(c/s) nos aumentos de 500x, 1000x, 5000x e 15000x.