

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Michelli Bressan

**ADESÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO
INICIAL DE BIOFILME EM DIFERENTES
SUPERFÍCIES DE BRÁQUETES
ORTODÔNTICOS**

Passo Fundo

2015

Michelli Bressan

**ADESÃO BACTERIANA E FORMAÇÃO
INICIAL DE BIOFILME EM DIFERENTES
SUPERFÍCIES DE BRÁQUETES
ORTODÔNTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação da profa. Dra. Paula Benetti e co-orientação do prof. Dr. Rafael Guerra Lund – UFPel – RS.

Passo Fundo

2015

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho

CIP – Catalogação na Publicação

B843a Bressan, Michelli

Adesão bacteriana e formação inicial de biofilme em diferentes superfícies de bráquetes ortodônticos / Michelli Bressan. – 2015.

83 p. : il. color. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo, 2015.
Orientadora: Profa. Dra. Paula Benetti.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund.

1. Odontologia. 2. Bráquetes ortodônticos. 3. Bactérias. 4. Biofilme bucal. I. Benetti. Paula.

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

BIOGRAFIA DO AUTOR

Michelli Bressan

Nascida em 05 de julho de 1981 em Sarandi/RS. Graduada em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo (UPF), inscrita no CRO/RS sob nº 18029, especialista em Ortodontia pela Faculdade Ingá em Passo Fundo - RS. Atua como Cirurgiã-Dentista em seu consultório particular em Passo Fundo/RS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio, o meu carinho e amor por todos, sempre estiveram ao meu lado nos momentos de tristezas e de esmorecimento frente as adversidades da vida.

Meus pais, Valmor e Mirtes, que muito puderam me oferecer ao longo da minha caminhada, minha educação, meus valores, princípios e estudos. Em especial a minha mãe pelo companheirismo, parceria na minha estada em Pelotas para a execução do experimento.

Minhas irmãs, Priscilla e Emanuelle, que mesmo distantes fisicamente, a presença sempre se fez.

Meu sobrinho Enzo pela a alegria e a demonstração da renovação da vida em um ser tão especial.

Meu amor Leandro pelo apoio, auxílio e compreensão nos momentos de estresse e ansiedade da sua maneira, sempre a me ajudar e disponível ao meu auxílio.

Minhas amigas, Kellin, Joseane, Melissa e tantos outros, todos a sua maneira, de formas diferentes, fizeram-se presente nos momentos de dúvida e angústia.

Meus colegas da turma do mestrado pela energia, garra, descontração e parceria nesses 2 anos, que se perpetuarão por muito tempo.

Meus professores, inúmeros professores que sem a inspiração e apoio de vocês essa caminhada seria muito difícil. Em especial aos professores que me receberam em suas disciplinas no estágio em docência, me mostraram que ser professor não é somente ter o conhecimento técnico e sim o empenho e a garra em ser um eterno aprendiz da vida.

A professora Luciana Ruschel dos Santos por se dispor a me auxiliar desde o início, mesmo necessitando deixar a minha orientação em virtude do seu desligamento do programa. Sempre preocupada em que eu estivesse bem e me sentindo amparada na nossa parceria.

Ao professor Rafael Guerra Lund por abrir as portas do laboratório e me apresentar o fantástico e real mundo da microbiologia.

A professora Paula Benetti, minha colega, vizinha, parceira de trabalho, por esses 14 anos de convívio. Sempre solícita ao meu auxílio e colaborar em tudo que estava a seu alcance.

Aos funcionários da universidade pela disponibilidade e disposição de vocês em muitos momentos, foi fundamental. A Fabi, me carinho especial que esteve presente durante minha graduação e agora no mestrado, não mediu esforços para o apoio.

A UFPel por proporcionar a execução do experimento de portas abertas.

Aos colegas e colaboradores do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFPel, em especial a Alexandra Rubin Cocco, Tamires Maske, Cácia Signor, Lisangela Ferreira e Carmem pelos ensinamentos, apoio e estímulo de todos vocês, foram fundamentais e fortaleceram muito meu breve tempo em terras desconhecidas.

A Fapergs pelo incentivo oferecido a parceria entre o PPGOdonto UPF e PPG Odontologia UFPel

E a tantas pessoas que cruzaram pelo meu caminho ao longo desses 2 anos que me fizeram refletir a importância do que somos, no significado da vida e da nossa missão como seres que aqui estamos de passagem.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS	19
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 Biofilme bucal	29
2.2 Microcosmo.....	32
2.3 Braquetes	33
3. PROPOSIÇÃO	37
3.1 Objetivo específico:.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Seleção dos bráquetes.....	39
4.2 Coleta e Processamento da saliva	40
4.3 Preparação das amostras.....	41
4.4 Obtenção da saliva artificial (meio DMM).....	42

4.5 Coleta e processamento da saliva	42
4.6 Formação <i>in vitro</i> de biofilme sobre os bráquetes.....	44
4.7 Avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme	46
4.8 Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície).....	49
4.9 Análise estatística	50
5. RESULTADOS.....	51
6 DISCUSSÃO.....	53
6.1 Bráquete	53
6.2 Tempo	54
6.3 Metodologia - Microcosmo	56
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES	67
APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	67
APÊNDICE 2 – PARECER DO COMITE DE ÉTICA	69
ARTIGO A SER SUBMETIDO	71

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias para os diferentes bráquetes e tempos de cultura.....</i>	<i>43</i>
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Fotografias representativas dos bráquetes utilizados no estudo: a) bráquete metálico, e b) bráquete cerâmico.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2 – Placa de cultura com os bráquetes aderidos ao fundo dos poços.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3 - Homogeneização da saliva para colocação nos poços das placas.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 4 - Colocação da saliva nos poços das placas contendo o bráquete aderido.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 5- Amostras posicionadas nas placas de cultura (a) e o conjunto posicionado em jarras de anaerobiose (b).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 6 - Ativação da placa de anaerobiose.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7 - Remoção dos bráquetes das placas.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8 – Posicionamento do bráquete no interior do microtubo de ensaio (a) e sonicação para desprendimento do biofilme das amostras (b).....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 9 - Diluição seriada e gotejamento nas placas de cultura.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 10 - Placas após 120 horas de crescimento em anaerobiose.....</i>	<i>40</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – grau Celsius

µl – nanolitro

A. naeslundii - *Actinomyces naeslundii*

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

F. nucleatum - *Fusobacterium nucleatum*

g/l – grama por litro

h – hora(s)

P. gingivalis - *Porphyromonas gingivalis*

s – segundo

S. mutans - *Streptococcus mutans*

T. denticola - *Treponema denticola*

UFC – unidade formadora de colônia

w – watts

RESUMO

Objetivo: O objetivo do trabalho foi verificar que superfície de bráquete (metálica ou cerâmica) promove maior aderência de microrganismos e formação de biofilme.

Materiais e métodos: Esse estudo avaliou a formação e adesão bacteriana sobre as diferentes superfícies de bráquetes – metálico e cerâmico – em 12 e 24 horas de incubação. Os bráquetes foram colados no fundo dos poços das placas e inoculados com saliva. Para isso, a saliva coletada do paciente foi preparada, armazenada e inoculada sobre os bráquetes. Após uma hora a saliva foi aspirada e adicionada saliva artificial (meio DMM). Em seguida, os bráquetes foram incubados em condições de anaerobiose por 12 e 24 horas a 37°C para o crescimento do biofilme. Decorrido esse período, os bráquetes foram removidos das placas com pinças esterilizadas, sonicados para a dispersão das células e realizadas diluições seriadas até 1:10⁻⁷ incubado a 37°C por 120 h para contagem das unidades formadoras de colônia. A método analítico utilizado foi Kruskal-Wallis e Dunn com significância de 5%.

Resultados: A análise estatística não mostrou diferença significativa de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os grupos.

Conclusão: Não houve diferença estatística no crescimento bacteriano em 12 e 24 horas entre os tipos de materiais.

Palavras-Chave: biofilme, microcosmo, ortodontia, bráquetes ortodônticos.

ABSTRACT¹

Objective: The objective was to determine which bracket surface (metal or ceramic) promotes higher adherence and biofilm development.

Material and Methods: This study evaluated the development and bacterial adhesion on different brackets surfaces – metal and ceramic – after 12 and 24 hours of incubation. The microcosm technique was used. The saliva collected from the patient was prepared, stored and inoculated on the brackets. After one hour, the saliva was removed and mean DMM was added in the recipient. The brackets were incubated under anaerobic conditions for 12 and 24 hours at 37°C for biofilm growth. After this period, the brackets were removed from the plate with sterilized tweezers, sonicated to disperse the cells. Serial dilutions were performed to 1:10⁻⁷ incubated at 37°C for 120 hours for count colony forming units.

Results: Statistical analysis showed no significant difference of the number of colony forming units between groups.

Conclusion: Based on the results obtained in this study and respecting the limitations, it can be concluded that, since there is no difference in bacterial growth at 12 and 24 hours, the most appropriate bracket to each case should be selected by the professional, based on aesthetic needs and the brackets mechanical behavior.

Keywords: biofilm, microcosm, orthodontics, orthodontic brackets.

¹ Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Ceramic and Metallic Orthodontic Brackets

1 INTRODUÇÃO

Os bráquetes são formados por polímeros, ligas metálicas de aço inoxidável ou por cerâmicas de alumina mono ou policristalina (99%). Apesar da melhor aparência estética inicial do que o metálico, os bráquetes formados por polímero não estão sendo amplamente utilizados por apresentarem descoloração ao longo do tempo, fratura, facilidade de distorção, sendo sua única vantagem um menor coeficiente de atrito. Os bráquetes metálicos são frequentemente empregados em Ortodontia, pois possuem baixo custo, fácil manuseio, baixo índice de descolamento das peças e as aletas apresentam alta resistência à fratura. Contudo, bráquetes cerâmicos foram desenvolvidos para suprir a demanda constante do paciente por estética. Os mesmos apresentam uma boa estabilidade de cor, resistência a fratura maior que os bráquetes plásticos (PINHEIRO *et al.*, 2013). Contudo, há necessidade de maior esclarecimento sobre o desenvolvimento de biofilme clinicamente relevante (formado por múltiplas espécies) sobre bráquetes de diferentes materiais. Portanto, a proposta deste trabalho foi verificar qual superfície dos bráquetes (metálico ou cerâmico) promove maior aderência de bactérias, pois a maior formação de biofilme fornece implicações clínicas importantes

para risco de doenças bucais em pacientes em tratamento ortodôntico, especialmente cárie e doença periodontal.

A aderência dos biofilmes sobre os materiais odontológicos é estudada nas várias áreas da Odontologia. O biofilme pode ser definido como uma comunidade bacteriana (agrupamento) de diversas espécies. Esta associação oferece às bactérias condições ou características não apresentam quando estão isoladas (HUANG *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2011). Um dos métodos utilizados para o estudo do biofilme é o microcosmo, que propõe simulação das condições existentes no meio bucal. Esse método vem sendo utilizado para estabelecer o biofilme da doença cárie e consiste na coleta de saliva de pacientes doadores, que é inoculada em meio (CENCI, 2008; BARBOSA, 2009; LEITE, 2009; BORGES *et al.*, 2014; MASKE *et al.*, 2014).

Filoché *et al.* (2007b) propuseram desenvolver um microcosmo de biofilme dental em miniplacas com vários tipos de suplementos artificiais para o crescimento bacteriano e a composição da microbiota relacionada à doença cárie. Esse modelo demonstrou a possibilidade de replicar a dinâmica populacional do desenvolvimento natural do biofilme como um modelo realista de mono e múltiplas espécies do sistema do biofilme.

A Ortodontia tem uma preocupação adicional, pois os acessórios colados ou cimentados nos dentes dificultam a higienização, facilitando a formação do biofilme, os quais levam o paciente a apresentar alterações como cárie e doença periodontal (DO *et al.*, 2013, REN *et al.*, 2014). Muitos estudos têm buscado a associação da doença cárie com a formação

do biofilme formado sobre materiais restauradores (CENCI, 2008; BARBOSA, 2009; LEITE, 2009). Ao que se refere à doença periodontal, os pacientes ortodônticos apresentam risco aumentado de desenvolver gengivite e periodontite (TEN CATE e ZAURA, 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilme bucal

As bactérias apresentam-se no meio bucal de maneira dispersa, de forma planctônica. Ao se associar sobre diversos tipos de superfícies formam o biofilme, que apresenta seus diversos níveis de complexidade. O biofilme pode ser definido como um agrupamento, uma comunidade bacteriana de diversas espécies. Esta associação oferece às bactérias características que elas não desenvolvem quando estão isoladas (HUANG *et al.*, 2011).

O biofilme é um ecossistema altamente estruturado que ocorre de maneira dinâmica (WESSEL *et al.*, 2014). As adesinas presentes nas bactérias (colonizadores primários), que promovem a adesão célula-célula por forças de Van der Waals e forças eletrostáticas, relação ácido-base, associam-se à película adquirida, que é composta de proteínas e compostos orgânicos aderidos a uma superfície, formando uma colonização reversível (KOLENBRANDER e LONDON, 1993, TEUGHELIS *et al.*, 2006). Estas células se desenvolvem e formam microcolônias, que sintetizam uma matriz de exopolissacarídeo (EPS). Os EPS

fornece substrato para aderência de outras bactérias (colonizadores secundários) promovendo a coagregação dos microrganismos. Essa é o mecanismo de formação de biofilme irreversível (SAINI *et al.*, 2011).

Os primeiros colonizadores estão entre os *Streptococcus* e *Actinomyces*, os secundários, *Prophyromonas intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga spp.* e *Fusobacterium nucleatum* estas últimas só se ligam às bactérias e não às superfícies (TEUGHELIS *et al.*, 2006).

Em meio bucal, o biofilme apresenta características particulares. Como é exposto à força de cisalhamento durante a mastigação. O biofilme bucal se apresenta de forma bastante compactada, que facilita a sua manutenção e dificulta a sua remoção (HANNING, 1999). O atrito dos movimentos mastigatórios e contato com os tecidos moles (bochecha, língua) promovem a remoção mecânica da placa (VAN GASTEL *et al.*, 2007).

Absolom *et al.* (1983) estudaram o efeito da tensão superficial comparando entre bactérias em um substrato e em suspensão em um meio líquido na adesão bacteriana. Os autores concluíram que a adesão bacteriana sugere padrões termodinâmicos bastante generalizados em diferentes cepas de bactérias, o que indica que a energia livre de superfície busca o estado de equilíbrio entre as cargas elétricas. Teughels *et al.* (2006) observaram que o crescimento das colônias de uma determinada bactéria leva à formação de micro-colônias. Quando associada às moléculas específicas da saliva, há interação entre energia livre da superfície, energia livre da superfície do líquido e a energia livre da

superfície bacteriana, promovendo a adesão. Em superfícies ásperas, as bactérias têm maior proteção às forças de cisalhamento e a relação da mudança reversível-irreversível do biofilme ocorre com mais facilidade.

Com relação à proposta dos biofilmes, ten Cate e Zaura (2012) demonstraram, utilizando a hipótese de Placa Ecológica, que o biofilme mais virulento aumenta o risco de cárie e doença periodontal. Marsh (2004) afirma que a resistência à colonização compreende uma concorrência mais efetiva por nutrientes nos locais de fixação, produção de fatores inibitórios e crescimento desfavorável por condições da microflora residente. Marsh (2005) e Chen e Wen (2011) afirmam que as bactérias ao se associar apresentam maior resistência bacteriana.

Walker e Sedlacek (2007) desenvolveram um modelo de biofilme de placa subgengival utilizando a coleta de amostras de oito pacientes saudáveis e oito pacientes com periodontite. O modelo utilizou discos de hidroxiapatita de cálcio colocadas em placas de cultura e inoculados com uma pequena quantidade de biofilme subgengival dispersa e incubadas em anaerobiose para a formação do biofilme. A partir disso, deu-se origem a um biofilme composto de bactérias gram-positivas e gram-negativas, favorecendo o estudo da placa subgengival *in vitro*, e várias espécies se assemelhando ao estado *in vivo*. Esse modelo também pode ser utilizado para investigar mecanismos de resistência bacteriana.

Para Filoche *et al.* (2010) a saúde bucal pode estar ligada à ausência de certas espécies: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *L spp.* Espécies ligadas à doença

pereiontal seriam: *Porphyromonas gengivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, e *Fusobacterium nucleatum*.

2.2 Microcosmo

A investigação e a reprodução do biofilme bucal são bastante complexas. Há uma série de fatores que influenciam o desenvolvimento de bactérias *in vitro*, como a condição de oxigênio (microrganismos aeróbios são oxigênio-dependentes e os anaeróbios sobrevivem na ausência do oxigênio), temperatura (que varia entre 25 e 40°C) e pH (entre 5 e 7,8) do meio (LINDHE, 1999). Por isso, a reprodução em laboratório de todas essas características se torna difícil.

Else *et al.* (2003), ao relacionar as condições ambientais de umidade e temperatura, observaram que em temperaturas elevadas (60-70°C) não houve a formação do biofilme. Um dos potenciais fatores para isso é a interferência da temperatura elevada na produção dos polímeros extracelulares das bactérias, portanto o equilíbrio do biofilme (condições para reprodução e adesão bacteriana) sofre influência direta do meio.

Atualmente, um dos métodos utilizados para o estudo dos microrganismos presentes no biofilme é o microcosmo, que consiste na coleta de saliva de pacientes doadores, que é inoculada em meio que propõe simulação das condições existentes no meio bucal. Este método tem sido muito utilizado para estabelecer o biofilme da doença cárie (BORGES *et al.*, 2013; MASKE *et al.*, 2014). Assim como, estudar o

efeito do biofilme junto aos implantes dentários (STEFENON, 2012; DAL AGNOL, 2013; VERARDI, 2014).

Wong e Sissions (2001) propuseram um análogo de saliva que trouxesse a realidade das taxas de crescimento do biofilme em placas de um sistema de cultura denominado “boca artificial”. O meio proposto (íons de mucina e mistura basal de aminoácidos) oferece nutrição específica necessária para o crescimento bacteriano e seus padrões gerados pelo biofilme. Portanto, a composição e os nutrientes contidos no meio oferecem os recursos necessários para as características do biofilme formado.

Filoché *et al.* (2007b) propõem estabelecer um microcosmo em miniplacas de biofilme dental com vários tipos de suplementos artificiais para o crescimento bacteriano, utilizando a composição da microbiota relacionada à doença cárie. Esse modelo demonstrou a possibilidade de replicar a dinâmica populacional do desenvolvimento natural do biofilme como um modelo realista de mono e múltiplas espécies do sistema do biofilme.

2.3 Bráquetes

Os bráquetes são suportes de ancoragem para a ativação dos movimentos que se deseja realizar sobre os dentes, através de fios e amarrações. Estes podem ser constituídos por ligas metálicas, polímeros ou cerâmicas. Os metálicos são, frequentemente, constituídos por uma liga de aço inoxidável austenítico, tendo em sua composição o cromo e o

níquel, responsáveis pela resistência à corrosão. Os bráquetes poliméricos (plásticos) são constituídos de policarbonato, podendo ser reforçados com metal ou vidro (PINHEIRO *et al.*, 2013). Com relação aos cerâmicos, são compostos de alumina mono ou policristalina (99%), apresentam alta dureza e resistência a temperaturas elevadas. Graber e Vanarsdall (2000) afirmam que os bráquetes cerâmicos combinam a estética dos poliméricos e a confiabilidade dos metálicos. Entretanto, apresentam dificuldades na determinação no nível de força adequada e no controle de ancoragem, pois apresentam uma maior e menos previsível resistência friccional entre o fio ortodôntico e o *slot* do bráquete do que o metálico.

Os bráquetes cerâmicos apresentam menor longevidade do que os metálicos, pois são mais frágeis (característica intrínseca das cerâmicas), e possuem maior risco de fratura principalmente em arcos mais calibrosos, com maior preenchimento do *slot* (KARAMOUZOS *et al.*, 1997).

A fabricação dos bráquetes cerâmicos difere pela sua composição: os bráquetes policristalinos são compostos por partículas de óxido de alumínio e aglutinantes, assim são moldados e posteriormente, cortados para que se obtenham o formato desejado do bráquetes, após é feita a queima da cerâmica. Esse método de fabricação pode produzir poros, imperfeições, favorecendo trincas e por consequência fraturas. Já o bráquete de alumina monocristalina é produzido com base em uma massa fundida de oxido de alumínio e realizada a queima do material. Pelo processo oferecer maior controle do resfriamento, há a diminuição das falhas na estrutura da cerâmica, portanto, menos riscos de falhas dos bráquetes. (SOBREIRA *et al.*, 2007)

Por apresentarem maior resistência de união e não permitirem deformação, os bráquetes cerâmicos podem promover fratura do esmalte na região de adesão ou desgaste dos dentes antagonistas. Sua remoção é mais complexa, pois não permitem a torção, facilitando assim a fratura da peça, e/ou da estrutura do esmalte onde está aderido (GRABER e VANARSDALL, 2000).

Muitos estudos relacionados aos bráquetes comparam sua composição e sua configuração (desenho) (ELIADES *et al.*, 1995, BRUSCA *et al.*, 2007, VAN GASTEL *et al.*, 2007, VAN GASTEL *et al.*, 2009, LINDEL *et al.*, 2011). Eles podem ser apresentados de maneira convencional, no qual o fio é amarrado com acessórios (ligaduras metálicas ou elásticas), ou os mais atuais, os auto-ligados, que apresentam em sua constituição acessórios que prendem o fio sem a necessidade de estruturas adicionais (PROFFIT *et al.*, 2007). Contudo, vários trabalhos indicam que bráquetes autoligados apresentam um maior potencial de adesão bacteriana (VAN GASTEL *et al.*, 2007; VAN GASTEL *et al.*, 2009).

Anhoury *et al.* (2002) compararam a retenção de biofilme em bráquetes metálicos e cerâmicos. Os autores identificaram semelhança no crescimento de *S mutans* e *L acidophilus* entre os dois materiais estudados. Contudo, os bráquetes metálicos apresentaram maiores contagens médias de *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*, *Streptococcus anginosus* e *Eubacterium nodatum*. Além disso, uma maior contagem de *Eikenella corrodens*, *Campylobacter showae* e *Selenomonas*

noxia foi encontrada em bráquetes cerâmicos. E não apresentou padrão de colonização sem favorecer qualquer tipo de material de bráquete.

O estudo de Peros *et al.* (2011) avaliou a influência da aparatologia fixa nas alterações fisiológicas bucais, como a taxa de fluxo salivar, o pH e a capacidade tampão da saliva e os níveis de *S mutans* e *L spp.* Os autores identificaram o pico das alterações salivares na 12^a semana após a instalação de aparatologia fixa.

Lindel *et al.* (2011) concluíram que os bráquetes cerâmicos tiveram uma menor formação de biofilme, para a associação de *S mutans* com *C albicans*. Entretanto, Brusca *et al.* (2007) concluíram que os bráquetes metálicos tem menor poder de adesão das leveduras, quando comparados com bráquetes cerâmicos e plásticos, sendo que os últimos apresentam os maiores valores. Portanto, a formação de biofilme sobre diferentes superfícies de bráquetes ainda apresenta resultados conflitantes e necessita de maior esclarecimento, especialmente, com relação ao desenvolvimento de bactérias presentes no biofilme bucal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi verificar que tipo de material de bráquete (metálico ou cerâmico) promove maior aderência e formação de biofilme.

3.1 Objetivo específico:

Esse estudo pretende avaliar a formação e adesão bacteriana sobre as diferentes superfícies, metálica e cerâmica de bráquetes em 12 e 24 horas de incubação. As hipóteses testadas são: H1) os bráquetes metálicos e cerâmicos não apresentam diferença significativa na formação de biofilme, e H2) o período de incubação de 12h fornecerá menor crescimento bacteriano que em 24h.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi encaminhado para o comitê de ética da Universidade de Passo Fundo (UPF) e aprovado com o parecer nº 546.484 em 3 de março de 2014.

4.1 Seleção dos bráquetes

Para o estudo, foram selecionados bráquetes ortodônticos para incisivos com dimensões de 2,6mm x 1,5 mm para os cerâmicos e 2,8 mm x 0,95 mm para os metálicos e slot de 0,022” x 0,300” (Figura 1). Foram utilizados 30 bráquetes metálicos fabricados pela injeção de liga de aço inoxidável (prescrição Roth, Premium aço inox, Orthometric, Marília, São Paulo, Brasil) e 30 bráquetes cerâmicos de alumina policristalina obtidos por injeção (prescrição Roth, Inceram, Orthometric, Marília, São Paulo, Brasil). A definição por bráquetes cerâmicos policristalinos se deu pelo método de fabricação utilizado, pois é o mesmo que dos bráquetes metálicos, respeitando a diferença dos materiais.

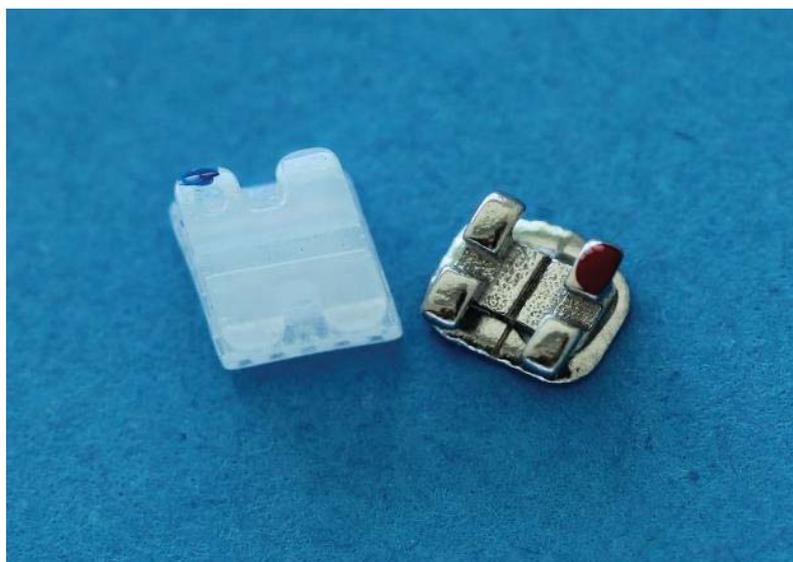


Figura 1 – Fotografia representativa dos bráquetes utilizados no estudo: bráquete cerâmico (a esquerda) e bráquete metálico (a direita).

4.2 Coleta e processamento da saliva

Para coleta da saliva, o voluntário foi selecionado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foi realizado este estudo. O voluntário era portador de doença periodontal, não fumante e não esteve sob terapia antibiótica por 1 ano. O doador permaneceu sem higiene oral nas 24 horas prévias à coleta da saliva. Após a coleta, o paciente foi submetido ao tratamento periodontal.

4.3 Preparação das amostras

Os bráquetes foram esterilizados em autoclave e colados no fundo plano da placa de cultura de 24 poços, as quais só foram expostas ao meio no momento da colagem, pois as mesmas não permitem esterilização em autoclave (Figura 2) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil). A colagem foi realizada de com adesivo fotopolimerizável Transbond Plus XT (3M Unitek, St. Paul, MN, EUA). O adesivo foi aplicado na base dos bráquetes cobrindo toda a malha. O conjunto foi posicionado e fixado no centro do fundo da placa sob pressão. O excesso do compósito foi removido com um instrumento manual estéril. Em seguida, o compósito foi fotoativado (Radium-cal, SDI, Baywater, Victoria, Australia) por 30 segundos na porção inferior externa da placa.

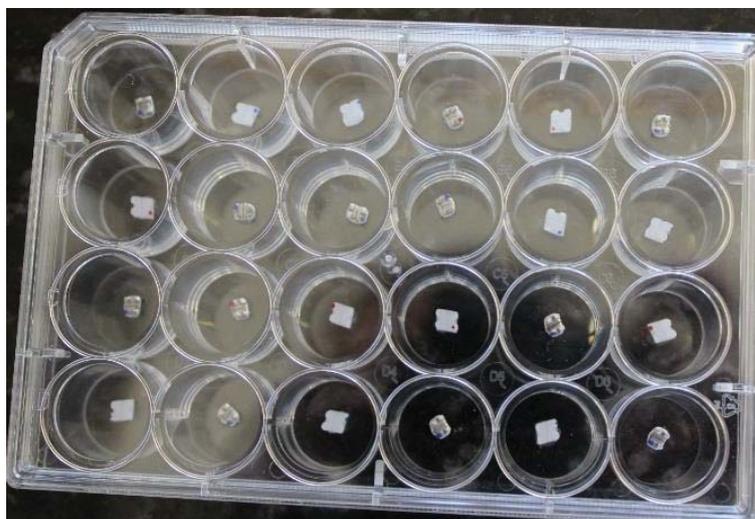


Figura 2 – Placa de cultura com os bráquetes aderidos ao fundo dos poços.

4.4 Obtenção da saliva artificial (meio DMM)

A obtenção do meio DMM (meio definido enriquecido com mucina) foi realizada seguindo protocolo descrito por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5g/l), uréia (1.0mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl₂, 1,0; MgCl₂, 0,2; KH₂PO₄, 3,5; K₂HPO₄, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH₄Cl, 2,0), 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio possui aminoácidos para o equivalente em proteína/peptídeo (em mmol/l) às concentrações encontradas na saliva humana: alanina (1,95 g/100 ml), arginina (1,30 g/100 ml), asparagina (1,73 g/100 ml), ácido aspártico (1,52 g/100 ml), cisteína (0,05 g/100 ml), ácido glutâmico (5,41 g/100 ml), glutamina (3,03 g/100 ml), glicina (1,95 g/100 ml), histidina (1,08 g/100 ml), isoleucina (2,38 g/100 ml), leucina (3,68 g/100 ml), serina (3,46 g/100 ml), treotonina (1,08 g/100 ml), triptofano (0,43 g/100 ml), tirosina (2,17 g/100 ml), valina (2,38 g/100 ml), e caseína (5,0 g/l).

4.5 Coleta e processamento da saliva

Foi realizada coleta de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"[®], American Nacional CanTM, Chicago, Illinois, EUA) até que atingisse 5 ml de saliva no tubo coletor (VERARDI, 2014). O doador portador de doença periodontal, não se alimentou por 2 horas previamente à coleta da saliva. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril, que foi transportado envolto em gelo ao laboratório de Microbiologia (FO

– UFPel). A saliva contida no recipiente estéril foi homogeneizada em vortex (Figura 3) (Filoche *et al.*, 2007a).



Figura 3 – Homogeneização da saliva para colocação nos poços das placas.

4.6 Formação *in vitro* de biofilme sobre os bráquetes

Após a preparação do inóculo bacteriano, 400 µl de saliva foi aplicado em cada micro poço da placa (Figura 4).

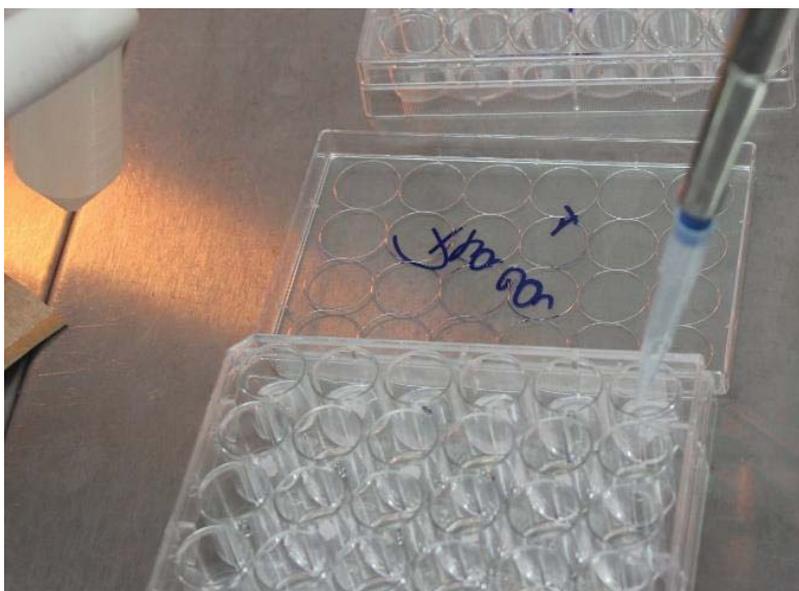


Figura 4 – Colocação da saliva nos poços das placas contendo o bráquete aderido.

Após 1 hora transcorrida, foi aspirada a saliva dos poços e adicionado 1,8 ml de saliva artificial (meio DMM) em cada poço. As placas foram incubadas por 12 e 24 horas a 37°C em jarras de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) (Probac do Brasil produtos bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP - Figura 5) com geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac - Figura 6) e mantidas em repouso na incubadora. Trabalhos anteriores observaram que o maior crescimento ocorre nas 12

e 24 horas dos estudos (STEFENON, 2012; DAL AGNOL, 2013; VERARDI, 2014)

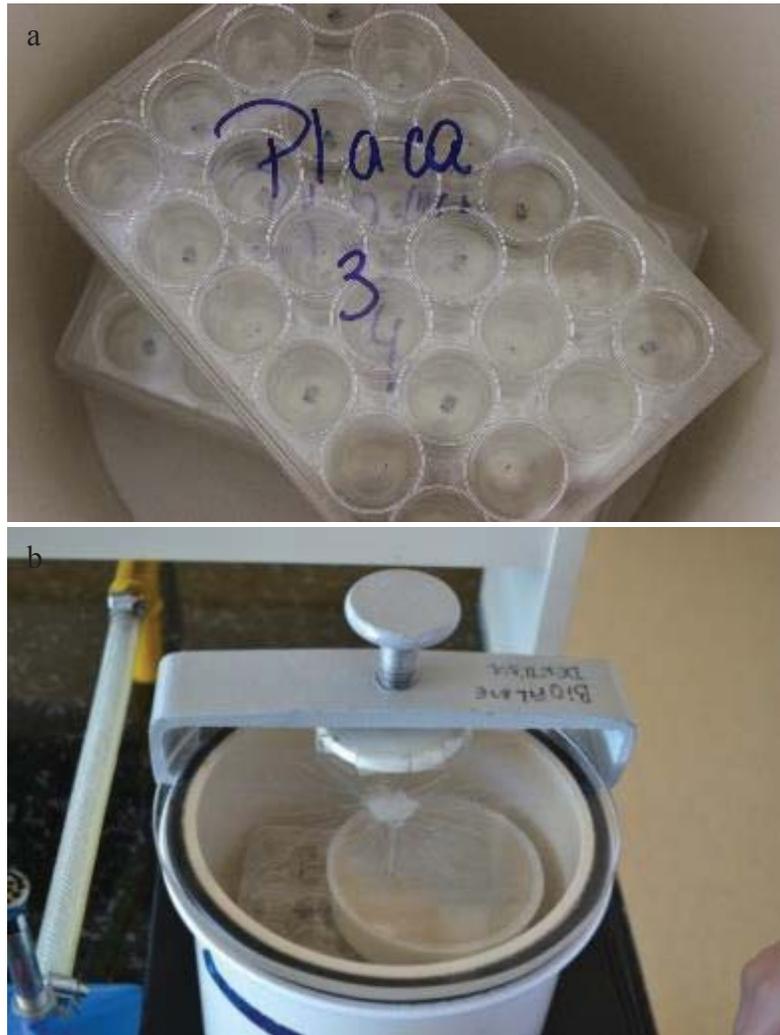


Figura 5 – Amostras posicionadas nas placas de cultura (a) e o conjunto posicionado em jarras de anaerobiose (b).



Figura 6 – Ativação da placa de anaerobiose.

4.7 Avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme

Os bráquetes foram removidos da placa com pinças esterilizadas após os devidos tempos de observação, 12 e 24 h de crescimento (Figura 7) e introduzidos em microtubos contendo 1 ml de solução salina estéril (Figura 8a). Os microtubos contendo as amostras foram sonicados (Figura 8b) a 30W e amplitude de 5%, usando 3 pulsos de 10s cada para obtenção do biofilme de suspensão homogênea. Com intervalo de pulso entre cada pulso de 5s (STEFENON, 2012).

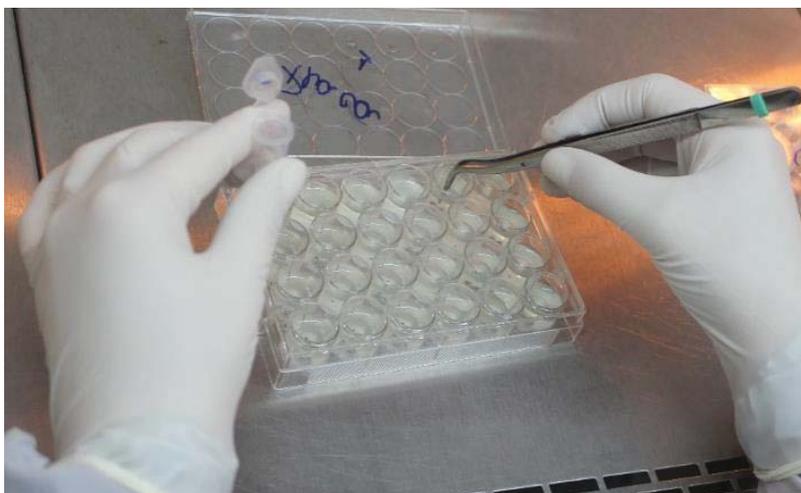


Figura 7 – Remoção dos bráquetes das placas.

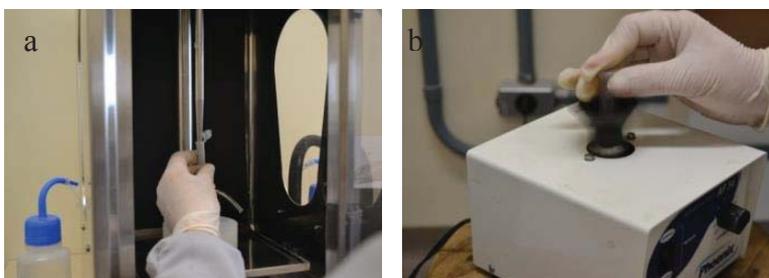


Figura 8 – Posicionamento do bráquete no interior do microtubo de ensaio (a) e sonicação para desprendimento do biofilme das amostras (b).

Os tubos foram mantidos envoltos em gelo durante o processo para que não ocorresse o aquecimento da amostra e perda do material biológico. Após o desprendimento, foram realizadas diluições seriadas das suspensões dos biofilmes para contagem de microrganismos totais.

As suspensões foram diluídas em solução salina em séries de até $1:10^{-7}$ (Figura 9) e imediatamente inoculadas em duplicata em Agar sangue para contagem de microrganismos totais. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (jarra com 80% N_2 , 10% CO_2 e 10% H_2) a $37^\circ C$ por 120h (Figura 10). As unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/área da placa (FILOCHE *et al.*, 2007b).



Figura 9 – Diluição seriada e gotejamento nas placas de cultura.



Figura 10 – Placas após 120 horas de crescimento em anaerobiose.

4.8 Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície)

Após a diluição seriada da suspensão bacteriana, foram pipetados 10 μ L em duplicata e gotejados em placa de Petri contendo Agar sangue. As placas de Petri foram tampadas, revestidas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 horas de incubação, as colônias

foram contadas e o resultado para cada diluição foi registrado e multiplicado pelo fator da diluição.

4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente teste Kruskal-Wallis e Dunn com significância de 5%

5 RESULTADOS

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos, quando comparados os dois tempos de cultura ($p = 0,364$), ou quando comparados os diferentes tipos de materiais ($p = 0,769$). Não houve interação entre os fatores estudados ($p = 0,535$).

*Tabela 1. Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias para os diferentes bráquetes e tempos de cultura.**

Grupo	Material	Tempo (h)	Média de UFC	DP	Mediana	25 %	75 %
C12	Cerâmica	12	22.9	26	8	4	42
C24	Cerâmica	24	20.7	32.5	11.3	5.5	20
M12	Metal	12	29.7	35.5	11.5	4.1	60.9
M24	Metal	24	18.3	15.1	12.5	9.6	25

* Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

6.1 Bráquete

Os diferentes materiais de confecção dos bráquetes não influenciaram o número de unidades formadoras de colônias, aceitando a primeira hipótese do estudo (H1). Os resultados deste trabalho corroboram com outros estudos realizados com metodologias diferentes e diferentes materiais de bráquetes (ANHOURY *et al.*, 2002; VAN GASTEL *et al.*, 2007; BRUSCA *et al.*, 2007; VAN GASTEL *et al.*, 2009; LINDEL *et al.*, 2011)

A energia livre de superfície é diferente para cada material (ANHOURY *et al.*, 2002). Materiais metálicos apresentam uma tensão superficial maior do que a cerâmica, portanto reduz a capacidade de retenção bacteriana (ELIADES *et al.*, 1995). Essa característica ocasionaria um potencial aumento no potencial de fixação das bactérias, que não foi confirmado no presente estudo.

Muitos fatores estão relacionados à adesão bacteriana em materiais, como: interações eletrostáticas, forças de van der Waals, energia livre de superfície (ELIADES *et al.*, 1995, BRUSCA *et al.*, 2007, VAN GASTEL *et al.*, 2007, A mensuração da rugosidade superficial dos bráquetes é difícil de ser obtida pela área reduzida e detalhamento da configuração (desenho) que os bráquetes apresentam. Para evitar discrepâncias significativas de superfície entre os bráquetes, foi padronizado o modo de fabricação do bráquetes. Utilizando bráquetes obtidos por injeção, problemas relacionados às ranhuras de superfície provocadas por usinagem foram evitados.

6.2 Tempo

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes de crescimento bacteriano entre os dois tempos de incubação das amostras (12 e 24 h), rejeitando a segunda hipótese (H2) do estudo. Os dados apresentados mostram um crescimento bacteriano numericamente maior nas 12 horas iniciais de observação, o que está de acordo com o estudo de Sissons (1997), que demonstra pico de crescimento bacteriano entre 3-7 h de incubação.

A ausência de aumento no crescimento bacteriano observado no período de observação de 24h pode ter resultado da metodologia empregada no estudo, que não prevê renovação do meio de cultura após as 12h iniciais, mas somente após 24h de incubação (FILOCHE *et al.*, 2007b; WALKER e SEDLACK, 2007; BORGES *et al.*, 2014; TABENSKI *et al.*, 2014). Dalagnol (2013) efetuou a troca do meio a cada

24 horas e observou crescimento bacteriano. Stefenon (2007) observou que a maior formação do biofilme ocorreu em 24 e 48 horas, sendo estes tempos a serem observados mais indicado para este estudo. Essa metodologia é sustentada pela observação da formação de micro-colônias em 24h de incubação (WALKER e SEDLACK, 2007). Embora, segundo a literatura, a renovação do meio no período de tempo analisado não seja necessária, acredita-se que a troca do meio após 12h poderia fornecer um aporte de substrato necessário para um maior crescimento bacteriano em 24h.

Park *et al.* (2014) observaram que o período de observação de 24 h de crescimento de um biofilme multi-espécies é adequado, pois evita contaminação, forma um biofilme mais espesso, complexo e apresentando resistência bacteriana maior do que a inoculação de única espécie.

Portanto, maior período de observação é desnecessário para as comparações realizadas no presente estudo. Além disso, os estudos mostram que os microrganismos anaeróbios apresentam seu maior crescimento dentro do período de 24 h (SISSONS, 1997; HANNING, 1999).

Sanchez *et al.* 2011 avaliaram a formação de biofilme em diferentes tempos de coleta e constataram que após 12 h de inoculação houve a formação de uma grande população de células organizadas de células únicas ou de cadeia curta como estreptococos, correspondendo aos formadores iniciais e primários do biofilme. Assim como a fixação inicial

em uma superfície dura em um meio líquido é essencial para a formação do biofilme.

Além disso, Lindel *et al.* (2011) observaram que os bráquetes cerâmicos tiveram uma menor formação de biofilme em comparação com os metálicos, para a associação de *S. mutans* com *C. albicans*.

Pacientes submetidos a tratamento ortodôntico apresentam aumento nos níveis de *Prophyromonas gengivalis*, *Tannerella forsythia* e *Eubacterium nodatum*, além de elevação de *Campylobacter recto*, *Parvimonas micra* e *Actinomyces odontolyticus* (IRELAND *et al.*, 2014).

6.3 Metodologia - Microcosmo

Os colonizadores iniciais também oferecem influência na formação e estrutura do biofilme, pois eles que oferecem a estrutura necessária para agregação das bactérias subsequentes. Quando trabalhamos com o microcosmo, não temos o conhecimento e controle dos microrganismos que compõem o biofilme. Em contra-partida, temos uma melhor e mais acertada reprodução do meio oral. Trabalhos controlados com determinados tipos de bactérias não nos proporcionam a realidade da complexa e diversa estrutura da flora bucal (SISSONS, 1997, MARSH, 2005, WESSEL *et al.*, 2013, MASKE *et al.*, 2014, PARK *et al.*, 2014, REN *et al.*, 2014, TABESKI *et al.*, 2014).

Sabe-se que não há uma exata reprodução *in vitro* dos microrganismos existentes no meio oral. Muitos não se reproduzem fora do

seu habitat (Marsh, 1995). Portanto, a metodologia de microcosmo é quem mais se aproxima da realidade, pois o essencial é ter o conhecimento o crescimento ocorre nas superfícies e de que forma isso se apresenta, não havendo muito valor a descrição ou exploração dos microrganismos existentes no biofilme.

A instalação de aparatologia fixa promove alteração da flora bucal (LINDEL *et al.*, 2011, PEROS *et al.*, 2011, REN *et al.*, 2014) O risco de cárie aumenta, pois há elevação dos níveis de *S. mutans* (BRUSCA *et al.*, 2007). Outros microrganismos que alteram seus níveis é a *P. gingivalis* e *P. intermédia*, frequentemente relacionados ao desenvolvimento de doença periodontal (ANHOURY *et al.*, 2002), assim como alterações nos níveis de *T denticola* são observados durante o tratamento ortodôntico e sua queda após a remoção das peças ortodônticas (IRELAND *et al.*, 2014). A presença dos microrganismos da flora bucal não implica necessariamente em manifestação de doenças. Há, porém, maior necessidade de cuidados de higiene bucal, pois os acessórios instalados (bandas, bráquetes, fios, amarração de fios) agem como fatores retentivos de placa, dificultando sua remoção.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pelo presente estudo e respeitando suas limitações é possível concluir que por não se observou diferença estatística significativa no crescimento bacteriano nos diferentes materiais dos bráquetes. Assim como, não houve diferença no crescimento bacteriano em 12 e 24 horas. Por apresentarem semelhança no crescimento bacteriano, caberá ao profissional fazer a escolha do bráquete mais adequado para o caso e ao paciente, observando os potenciais riscos de doença periodontal e cárie.

8 REFERÊNCIAS

ABSOLOM, D. R.; LAMBERTI, F. V.; POLICOVA, Z.; ZINGG, W.; VAN OSS, C. V.; NEUMANN, A. W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 46, n. 1, p. 90-97, 1983.

ANHOURY, P.; NATHANSON, D.; HUGHES, C. V.; SOCRANSKY, S.; FERES, M.; CHOU, L. L. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthodontist.* v. 72, n. 4, p. 338-343, 2002.

BARBOSA, R. P. S. *Efeito do acúmulo de biofilme in situ sobre restaurações: associação entre fendas marginais e cárie secundária.* 2009. Tese (Doutorado em Odontologia/Dentística) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

BORGES, F. B.; LIMA, E. L. K.; MACHADO, F. W.; BOSCATO, N.; VAN DER SANDE, F. H.; MORAES, R. R.; CENCI, M. S. Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. *J Appl Oral Sci.* v. 22, n.1, p. 68-72, 2014.

BRUSCA, M. I.; CHARAB, O.; STERIN-BORDAC, L.; ROSAD, A. C. Influence of different orthodontics brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthodontist.* v. 77, n. 2, p. 331-336, 2011.

CENCI, M. S. *Avaliação da associação entre infiltração marginal e cárie adjacente a restaurações dentárias.* 2008. 63 f. Tese (Doutorado em Odontologia/Cariologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2008.

CHEN, L.; WEN, Y.-M.; The role of bacterial biofilm in persistent in and control strategies. *Int J Oral Sci* v. 3, n. 2, p. 66-73, 2011.

DAL AGNOL, C. Z. *Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de titânio com diferentes topografias*. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013. 151p.

DO, T.; DEVINE, D.; MARSH, P.D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* v. 2015 n. 5. p. 11-19, 2013.

ELIADES, T.; ELIADES, G.; BRANTLEY, W. A. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* v. 108, n.4, p. 351-360, 1995.

ELSE, T. A.; PANTLE, C. R.; AMY, P. S. Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 69, n. 8, p. 5006-5010. 2003.

FILOCHE, S.; L. WONG, L.; SISSONS, C. H. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. *J Dent Res* v. 89, n.1, p. 8-18, 2010.

FILOCHE, S.K.; COLEMAN, M.J.; ANGKER, L.; SISSONS, C.H. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J. Microbiological Meth.*, v.69, n.3, p. 489-496, 2007a.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* v. 22, n. 2, p. 73-79, 2007b.

GRABER, T. M.; VANARSDALL, R. L. JR. *Ortodontia Princípios e Técnicas Atuais*. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 920p.

HANNING, M. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo*. *Eur. J. Oral Sci.* v. 107, n. 1, p. 55-64, 1999.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* v. 2, n. 5, p. 435-444, 2011.

IRELAND, A. J.; SORO, V.; SPRAGUE, S. V.; HARRADINE, N. W. T.; DAY, C.; AL-ANEZI, S.; JENKINSON, H. F.; SHERRIFF, M.; DYMOCK, D.; SANDY, J. R. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res.* v. 17, n. 2, p. 115-123, 2014.

KARAMOUZOS, A.; ATHANASIOS, A. E.; PAPADOPOULOS, M. A. Clinical characteristics and properties brackets: A comprehensive review. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* v. 112, n.1, p. 34-40, 1997.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* v. 175, n. 11, 3247-3252, 1993.

LEITE, F. H. V. S. *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores.* 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

LINDEL, I. D.; ELTER, C.; HEUER, W.; HEIDENBLUT, T.; STIESCH, M.; SCHWESTKA-POLLY, R.; DEMLIN, A. P. Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. *Angle Orthodontist.* v. 81, n. 5, p. 907-914, 2011.

LINDHE, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.* 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720p.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.

MARSH, P. D. Dental plaque: significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Preiodontol.* v. 32, supl. 6, p. 7-15, 2005.

MASKE, T. T.; ISOLAN, C. P.; VAN DE SANDE, F. H.; PEIXOTO, A. C.; FARIA-E-SILVA, A. L.; CENCI, M. S.; RAFAEL R. MORAES, R. R. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization *Clin Oral Invest*, 17 de outubro de 2014.

PARK, J. H.; LEEL, J.-K.; UML, H.-S.; CHANGL, B.-S.; LEE, S.-Y.; A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J periodontal Implant Sci.* v. 44, n. 2, p. 79-84, 2014.

PEROS, K.; MESTROVIC, S.; ANIC-MILOSEVIC, S.; SLAJ, M. Salivary microbial and nonmicrobial parameters in children with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthodontist*. v. 81, n. 5, p. 901-906, 2011.

PINHEIRO, E. C.; JANOVICH, C. A.; SILVA, P. R. F.; DIAMANTINO, A. G.; ARANTES, V. L. Materiais empregados na fabricação de bráquetes ortodônticos. <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_0778_0958_01.pdf>. Acesso em 21 de agosto de 2013.

PROFFIT, W. R.; FIELDS, H. W. JR.; SARVER, D. M. *Ortodontia Contemporânea*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REN, Y.; JONGSMA, M. A.; MEI, L.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation – a potential public health threat? *Clin Oral Invest*. v. 18, n. 7, p. 1711 – 1718, 2014.

RUDNEY, J.D.; CHEN, R.; LENTON, P.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *Journal of Applied Microbiology*. v. 113, n. 6, p. 1540-1553, 2012.

SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. Biofilm: A dental microbial infection *J Nat Sci Biol Med*. v. 2, n. 1, p. 71-75, 2011.

SANCHEZ, M. C.; LLAMA-PALACIOS, A.; BLANC, V.; LEÓN, R.; HERRERA, D.; SANZ, M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res* v. 46, n. 2, p. 252-260, 2011.

SCHWARZ, F.; BIELING, K.; BONSMANN, M.; LATZ, T.; BECKER J. Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Investig*, v. 10, n. 4, p. 279-288, 2006.

SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res April*. v. 11, n. 1, p. 110-126, 1997.

SOBREIRA, C. R.; LORIATO, L. B.; OLIVEIRA, D. D. bráquetes estéticos: características e comportamento clínico. *Rev. Clin. Ortodon. Dental Press*, v. 6, n. 1, p. 94-102, 2007.

STEFENON, L. *Desenvolvimento de modelo experimental de biofilme supra e subgingival em esmalte/dentina e titânio*. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

TABENSKI, L.; MAISCH, T.; SANTARELLI, F.; HILLER, K.-A.; SCHMALZ, G. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Arch Microbiol.* v. 196, n. 11, p. 819-828, 2014.

TEN CATE, J. M.; ZAURA, E. The numerous microbial species in oral biofilms: how could antibacterial therapy be effective? *Adv Dent Res.* v. 24, n. 3, p. 108-111, 2012.

TEUGHEL, W.; VAN ASSCHE, N.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Impl. Res.* v. 17, supl. 2, p. 68-81, 2006.

VAN GASTEL, J.; MARC QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, M.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; CARELS, C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *Angle Orthodontist.* v. 79, n. 5, p. 915-921, 2009.

VAN GASTEL, J.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; COUCKE, W.; CARELS, C. Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *J Clin Periodontol.* v. 34, n. 5, p. 423-431, 2007.

VERARDI, G. *Ação de antissépticos frente a biofilme formado por microcosmo em superfície de titânio*. 2014. 161 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

WALKER, C.; SEDLACEK, M.J. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* v. 22, p. 152-1, 2007.

WESSEL, S. W.; CHEN, Y.; MAITRA, A.; VAN DEN HEUVEL, E. R.; SLOMP, A. M.; BUSSCHER H. J.; VAN DER MEI, H. C. Adhesion

Forces and Composition of Planktonic and Adhering Oral Microbiomes.
J Dent Res v. 93: n. 1, p. 84-88, 2014.

WONG, L.; SISSIONS, C. H. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology*, v. 46, n. 6, p. 477-486, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Adesão do Biofilme Formado por Microcosmo em Diferentes Bráquetes Ortodônticos” de responsabilidade de Michelli Bressan, aluna do Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo. O objetivo dessa pesquisa é avaliar a adesão bacteriana sobre diferentes tipos de material de bráquetes.

A sua participação vai se dar pela coleta de saliva no momento em que for diagnosticada doença periodontal. A coleta será realizada por examinadores da UFPel, acompanhados da pesquisadora responsável, nessa instituição. A coleta é realizada com você cuspidor em um recipiente esterilizado por alguns minutos, e essa saliva será utilizada como inóculo para pesquisa no desenvolvimento de bactérias. Sendo que após a coleta você está liberado de qualquer compromisso com a pesquisa. Esse procedimento não traz desconforto ou risco à saúde. E em qualquer momento você poderá receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida ou eventual desconforto, podendo ter acesso aos seus dados em qualquer etapa da pesquisa.

Ao participar dessa pesquisa você receberá as orientações sobre a doença periodontal e será encaminhado para tratamento adequado na instituição (UFPEL). Sua participação na pesquisa não é obrigatória e você pode desistir em qualquer momento retirando seu consentimento. Caso tenha alguma despesa relacionada à pesquisa essa será ressarcida, porém você não receberá pagamento pela participação no estudo. As suas informações e informações geradas a partir da sua saliva serão mantidas em sigilo. Você não será identificado em nenhum momento da pesquisa e da divulgação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas ou se considera prejudicado(a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com a pesquisadora Michelli Bressan (54) 81119602, com o curso de Mestrado em Clínica Odontológica da UPF, com a Coordenação da Pós-Graduação da UFPEL ou também consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF pelo telefone (54) 33168370.

Dessa forma, concordo em participar da pesquisa de acordo com as explicações e orientações acima. Desde já agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua autorização, que será assinada em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com a pesquisadora.

Pelotas, ____ de _____ de 2014.

Nome do participante:

RG: _____

Assinatura: _____

Michelli Bressan

RG: 1651569

APÊNDICE 2 – PARECER DO COMITE DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Formação de Biofilme por Microcosmo Braquetes Ortodônticos

Pesquisador: LUCIANA RUSCHEL DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26193113.8.0000.5342

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 546.484

Data da Relatoria: 03/03/2014

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 546.484

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PASSO FUNDO, 05 de Março de 2014

Assinador por:
Nadir Antonio Pichler
(Coordenador)

ARTIGO A SER SUBMETIDO

Artigo a ser submetido na *Angle Orthodontics*

Introdução

A aderência dos biofilmes sobre os materiais odontológicos é estudada nas várias áreas da Odontologia. O biofilme pode ser definido como uma comunidade bacteriana (agrupamento) de diversas espécies. Esta associação oferece às bactérias condições ou características que elas não apresentam quando estão isoladas^{1,2}. Um dos métodos utilizados para o estudo do biofilme é o microcosmo, que propõe simulação das condições existentes no meio bucal. Esse método vem sendo utilizado para estabelecer o biofilme da doença cárie e consiste na coleta de saliva de pacientes doadores, que é inoculada em meio^{3,4}.

A proposta para desenvolver um microcosmo de biofilme dental em miniplacas com vários tipos de suplementos artificiais para o crescimento bacteriano e a composição da microbiota relacionada à doença cárie. Esse modelo demonstrou a possibilidade de replicar a

dinâmica populacional do desenvolvimento natural do biofilme como um modelo realista de mono e múltiplas espécies do sistema do biofilme⁵.

A Ortodontia tem uma preocupação adicional, pois os acessórios colados ou cimentados nos dentes dificultam a higienização, facilitando a formação do biofilme, os quais levam o paciente a apresentar alterações como cárie e doença periodontal^{6,7}. Ao que se refere à doença periodontal, os pacientes ortodônticos apresentam risco aumentado de desenvolver gengivite e peridontite⁸.

Os bráquetes são formados por polímeros, ligas metálicas de aço inoxidável ou por cerâmicas de alumina mono ou policristalina (99%). Apesar da melhor aparência estética inicial do que o metálico, os bráquetes formados por polímero não estão sendo amplamente utilizados por apresentarem descoloração ao longo do tempo, fratura, facilidade de distorção, sendo sua única vantagem um menor coeficiente de atrito. Os bráquetes metálicos são frequentemente empregados em Ortodontia pois, são de alta resistência a fratura das aletas, baixo custo, fácil manuseio e baixo índice de descolamento das peças. Contudo, bráquetes cerâmicos foram desenvolvidos para suprir a demanda constante do paciente por estética. Os bráquetes cerâmicos apresentam uma boa estabilidade de cor, resistência a fratura maior que os bráquetes plásticos⁹. Contudo, há necessidade de maior esclarecimento sobre o desenvolvimento de biofilme clinicamente relevante (formado por múltiplas espécies) sobre bráquetes de diferentes materiais. Portanto, a proposta deste trabalho foi verificar qual superfície dos bráquetes (metálico ou cerâmico) promove maior aderência de bactérias, pois a maior formação de biofilme, fornece implicações clínicas importantes para risco de doenças bucais em

pacientes em tratamento ortodôntico, especialmente cárie e doença periodontal. Esse estudo avaliou formação e adesão bacteriana sobre as diferentes superfícies, metálica e cerâmica de bráquetes em 12 e 24 horas de incubação. As hipóteses testadas são: H1) os bráquetes metálicos e cerâmicos não apresentam diferença significativa na formação de biofilme, e H2) o período de incubação de 12h fornecerá menor crescimento bacteriano que em 24h.

Materiais e Métodos

O projeto foi encaminhado para o comitê de ética da Universidade de Passo Fundo (UPF) e aprovado com o parecer n° 546.484 em 3 de março de 2014.

Para coleta da saliva, o voluntário foi selecionado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), onde foi realizado este estudo. O voluntário era portador de doença periodontal, não fumante e não esteve sob terapia antibiótica por 1 ano. O doador permaneceu sem higiene oral nas 24 horas prévias à coleta da saliva. Após a coleta, o paciente foi submetido ao tratamento periodontal.

Seleção dos bráquetes

Para o estudo, foram selecionados bráquetes ortodônticos para incisivos com dimensões de 2,6mm x 1,5 mm para os cerâmicos e 2,8 mm x 0,95 mm para os metálicos e slot de 0,022” x 0,300” (Figura 1). Foram

utilizados 30 bráquetes metálicos fabricados pela injeção de liga de aço inoxidável (prescrição Roth, Premium aço inox, Orthometric, Marília, São Paulo, Brasil) e 30 bráquetes cerâmicos de alumina policristalina obtidos por injeção (prescrição Roth, Inceram, Orthometric, Marília, São Paulo, Brasil).

Preparação das amostras

Os bráquetes foram esterilizados em autoclave e colados no fundo plano da placa de cultura de 24 poços, as quais só foram expostas ao meio no momento da colagem, pois as mesmas não permitem esterilização em autoclave (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil). A colagem foi realizada de com adesivo fotopolimerizável Transbond Plus XT (3M Unitek, St. Paul, MN, EUA). O adesivo foi aplicado na base dos bráquetes cobrindo toda a malha. O conjunto foi posicionado e fixado no centro do fundo da placa sob pressão. O excesso do compósito foi removido com um instrumento manual estéril. Em seguida, o compósito foi fotoativado (Radii-cal, SDI, Baywater, Victoria, Austrália) por 30 segundos na porção inferior externa da placa.

Obtenção da saliva artificial (meio DMM)

A obtenção do meio DMM (meio definido enriquecido com mucina) foi realizada seguindo protocolo descrito por Wong & Sissons (2001).

Coleta e processamento da saliva

Foi realizada coleta de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm “M”[®], American Nacional CanTM, Chicago, Illinois, EUA) até quem atingisse 5 ml de saliva no tubo coletor. O doador portador de doença periodontal, não se alimentou por 2 horas previamente à coleta da saliva. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril, que foi transportado envolto em gelo ao laboratório de Microbiologia (FO – UFPel). A saliva contida no recipiente estéril foi homogeneizada em vortex¹⁰.

Formação *in vitro* de biofilme sobre os bráquetes

Após a preparação do inóculo bacteriano, 400 µl de saliva foi aplicado em cada micro poço da placa.

Após 1 hora transcorrida, foi adicionado 1,8 ml de saliva artificial (meio DMM) em cada poço. As placas foram incubadas por 12 e 24 horas a 37°C em jarras de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) (Probac do Brasil produtos bacteriológicos Ltda, Santa Cecília, SP - Figura 5) com geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac - Figura 6) e mantidas em repouso na incubadora.

Avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme

Os bráquetes foram removidos da placa com pinças esterilizadas após os devidos tempos de observação, 12 e 24 h de crescimento e introduzidos em microtubos contendo 1 ml de solução salina estéril. Os microtubos contendo as amostras foram sonicados a 30W e amplitude de

5%, usando 3 pulsos de 10s cada para obtenção do biofilme de suspensão homogênea. Com intervalo de pulso entre cada pulso de 5s.

Os tubos foram mantidos envoltos em gelo durante o processo para que não ocorresse o aquecimento da amostra e perda do material biológico. Após o desprendimento, foram realizadas diluições seriadas das suspensões dos biofilmes para contagem de microrganismos totais. As suspensões foram diluídas em solução salina em séries de até $1:10^{-7}$ e imediatamente inoculadas em duplicata em Agar sangue para contagem de microrganismos totais. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (jarra com 80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) a 37°C por 120h (Figura 10). As unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/área da placa (Filoche, 2007b).

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente teste Kruskal-Wallis e Dunn com significância de 5%.

Resultados

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos, quando comparados os dois tempos de cultura ($p = 0,364$), ou quando comparados os diferentes tipos de materiais ($p = 0,769$). Não houve interação entre os fatores estudados ($p = 0,535$).

Tabela 1. Resultado da contagem de unidades formadoras de colônias para os diferentes bráquetes e tempos de cultura.

Grupo	Material	Tempo (h)	Média	DP	Mediana	25 %	75 %
C12	Cerâmica	12	22.9	26	8	4	42
C24	Cerâmica	24	20.7	32.5	11.3	5.5	20
M12	Metal	12	29.7	35.5	11.5	4.1	60.9
M24	Metal	24	18.3	15.1	12.5	9.6	25

Discussão

Bráquete

Os diferentes materiais de confecção dos bráquetes não influenciaram o número de unidades formadoras de colônias, aceitando a primeira hipótese do estudo (H1). Os resultados deste trabalho corroboram com outros estudos realizados com metodologias diferentes e diferentes materiais de bráquetes^{11, 12, 13, 14, 15}.

A energia livre de superfície é diferente para cada material¹¹. Materiais metálicos apresentam uma tensão superficial maior do que a cerâmica, portanto reduz a capacidade de retenção bacteriana¹⁶. Essa característica ocasionaria um potencial aumento no potencial de fixação das bactérias, que não foi confirmado no presente estudo.

Muitos fatores estão relacionados à adesão bacteriana em materiais, como: interações eletrostáticas, forças de van der Waals, energia livre de superfície^{12, 13, 16}. A mensuração da rugosidade superficial dos bráquetes é difícil de ser obtida pela área reduzida e detalhamento da configuração (desenho) que os bráquetes apresentam. Para evitar discrepâncias significativas de superfície entre os bráquetes, foi padronizado o modo de fabricação do bráquetes. Utilizando bráquetes obtidos por injeção, problemas relacionados às ranhuras de superfície provocadas por usinagem foram evitados.

Tempo

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes de crescimento bacteriano entre os dois tempos de incubação das amostras (12 e 24 h), confirmando a segunda hipótese (H2) do estudo. Os dados apresentados mostram um crescimento bacteriano numericamente maior nas 12 horas iniciais de observação, o que está de acordo com o estudo¹⁷, que demonstra pico de crescimento bacteriano entre 3-7 h de incubação.

O decréscimo no crescimento bacteriano observado no período de observação de 24h pode ter resultado da metodologia empregada no estudo, que não prevê renovação do meio de cultura após as 12h iniciais, mas somente após 24h de incubação^{3, 10, 18, 19}. Essa metodologia é sustentada pela observação da formação de micro-colônias em 24h de incubação¹⁸. Embora, segundo a literatura, a renovação do meio no período de tempo analisado não seja necessária, acredita-se que a troca do meio após 12h poderia fornecer um aporte de substrato necessário para um maior crescimento bacteriano em 24h.

O período de observação de 24 h de crescimento de um biofilme multi-espécies é adequado, pois evita contaminação, forma um biofilme mais espesso, complexo e apresentando resistência bacteriana maior do que a inoculação de única espécie²⁰.

Portanto, maior período de observação é desnecessário para as comparações realizadas no presente estudo. Além disso, os estudos mostram que os microrganismos anaeróbios apresentam seu maior crescimento dentro do período de 24 h^{17, 21}.

A formação de biofilme em diferentes tempos de coleta e constataram que após 12 h de inoculação houve a formação de uma grande população de células organizadas de células únicas ou de cadeia curta como estreptococos, correspondendo aos formadores iniciais e primários do biofilme. Assim como a fixação inicial em uma superfície dura em um meio líquido é essencial para a formação do biofilme²².

Além disso, observou-se que os bráquetes cerâmicos tiveram uma menor formação de biofilme em comparação com os metálicos, para a associação de *S. mutans* com *C. albicans*¹⁵.

Pacientes submetidos a tratamento ortodôntico apresentam aumento nos níveis de *Prophyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Eubacterium nodatum*, além de elevação de *Campylobacter recto*, *Parvimonas micra* e *Actinomyces odontolyticus*²³.

Metodologia - Microcosmo

Os colonizadores iniciais também oferecem influencia na formação e estrutura do biofilme, pois ele que oferecem a estrutura necessária para agregação das bactérias subsequentes. Quando trabalhamos com o microcosmo, não temos o conhecimento e controle dos microrganismos que compõe o biofilme. Em contra partida, temos uma melhor e mais acertada reprodução do meio oral. Trabalhos controlados com determinados tipos de bactérias não nos proporcionam a realidade da complexa e diversa estrutura da flora bucal^{17, 24, 25, 4, 20, 7, 19}.

Sabe-se que não há uma exata reprodução *in vitro* dos microrganismos existem no meio oral. Muitos não se reproduzem fora do seu habitat²⁴. Portanto, a metodologia de microcosmo é quem mais se aproxima da realidade.

A instalação de aparatologia fixa promove alteração da flora bucal^{15, 26, 7}. O risco de cárie aumenta, pois há elevação dos níveis de *S. mutans*¹³. Outros microrganismos que alteram seus níveis é a *P. gingivalis* e *P. intermédia*, frequentemente relacionados ao desenvolvimento de doença periodontal¹¹, assim como identifica-se mais brevemente alterações também dos níveis de *T. denticola* durante o tratamento ortodôntico e sua queda após a remoção das peças ortodônticas²³. A presença dos microrganismos da flora bucal não implica necessariamente em manifestação de doenças. Há, porém, maior necessidade de cuidados de higiene bucal, pois os acessórios instalados (bandas, bráquetes, fios, amarração de fios) agem como fatores retentivos de placa, dificultando sua remoção.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos pelo presente estudo e respeitando suas limitações é possível concluir que por não haver diferença no crescimento bacteriano em 12 e 24 horas. Por apresentarem semelhança no crescimento bacteriano, caberá ao profissional fazer a escolha do bráquete mais adequado para o caso e ao paciente, observando os potenciais riscos de doença periodontal e cárie.

Referências

1. HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* v. 2, n. 5, p. 435-444, 2011.
2. SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. Biofilm: A dental microbial infection *J Nat Sci Biol Med.* v. 2, n. 1, p. 71-75, 2011.
3. BORGES, F. B.; LIMA, E. L. K.; MACHADO, F. W.; BOSCATO, N.; VAN DER SANDE, F. H.; MORAES, R. R.; CENCI, M. S. Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. *J Appl Oral Sci.* v. 22, n.1, p. 68-72, 2014.
4. MASKE, T. T.; ISOLAN, C. P.; VAN DE SANDE, F. H.; PEIXOTO, A. C.; FARIA-E-SILVA, A. L.; CENCI, M. S.; RAFAEL R. MORAES, R. R. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization *Clin Oral Invest*, 17 de outubro de 2014.

5. FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* v. 22, n. 2, p. 73-79, 2007.
6. DO, T.; DEVINE, D.; MARSH, P.D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry* v. 2015 n. 5. p. 11-19, 2013.
7. REN, Y.; JONGSMA, M. A.; MEI, L.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation – a potential public health threat? *Clin Oral Invest.* v. 18, n. 7, p. 1711 – 1718, 2014.
8. TEN CATE, J. M.; ZAURA, E. The numerous microbial species in oral biofilms: how could antibacterial therapy be effective? *Adv Dent Res.* v. 24, n. 3, p. 108-111, 2012.
9. PINHEIRO, E. C.; JANOVICH, C. A.; SILVA, P. R. F.; DIAMANTINO, A. G.; ARANTES, V. L. Materiais empregados na fabricação de bráquetes ortodônticos. <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/RE_0778_0958_01.pdf>. Acesso em 21 de agosto de 2013.
10. FILOCHE, S.K.; COLEMAN, M.J.; ANGKER, L.; SISSONS, C.H. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J. Microbiological Meth.*, v.69, n.3, p. 489-496, 2007.
11. ANHOURY, P.; NATHANSON, D.; HUGHES, C. V.; SOCRANSKY, S.; FERES, M.; CHOU, L. L. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthodontist.* v. 72, n. 4, p. 338-343, 2002.
12. VAN GASTEL, J.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W.; COUCKE, W.; CARELS, C. Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *J Clin Periodontol.* v. 34, n. 5, p. 423-431, 2007.
13. BRUSCA, M. I.; CHARAB, O.; STERIN-BORDAC, L.; ROSAD, A. C. Influence of different orthodontics brackets on adherence of

microorganisms in vitro. . *Angle Orthodontist*. v. 77, n. 2, p. 331-336, 2011.

14. VAN GASTEL, J.; MARC QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, M.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; CARELS, C. Microbial adhesion on different bracket types in vitro. *Angle Orthodontist*. v. 79, n. 5, p. 915-921, 2009.

15. LINDEL, I. D.; ELTER, C.; HEUER, W.; HEIDENBLUT, T.; STIESCH, M.; SCHWESTKA-POLLY, R.; DEMLIN, A. P. Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. *Angle Orthodontist*. v. 81, n. 5, p. 907-914, 2011.

16. ELIADES, T.; ELIADES, G.; BRANTLEY, W. A. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. v. 108, n.4, p. 351-360, 1995.

17. SISSONS, C. H. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res April*. v. 11, n. 1, p. 110-126, 1997.

18. WALKER, C.; SEDLACEK, M.J. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. v. 22, p. 152-1, 2007.

19. TABENSKI, L.; MAISCH, T.; SANTARELLI, F.; HILLER, K.-A.; SCHMALZ, G. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Arch Microbiol*. v. 196, n. 11, p. 819-828, 2014.

20. PARK, J. H.; LEEL, J.-K.; UML, H.-S.; CHANGL, B.-S.; LEE, S.-Y.; A periodontitis-associated multispecies model of an oral biofilm. *J periodontal Implant Sci*. v. 44, n. 2, p. 79-84, 2014.

21. HANNING, M. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo*. *Eur. J. Oral Sci*. v. 107, n. 1, p. 55-64, 1999.

22. SANCHEZ, M. C.; LLAMA-PALACIOS, A.; BLANC, V.; LEÓN, R.; HERRERA, D.; SANZ, M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res* v. 46, n. 2, p. 252-260, 2011.

23. IRELAND, A. J.; SORO, V.; SPRAGUE, S. V.; HARRADINE, N. W. T.; DAY, C.; AL-ANEZI, S.; JENKINSON, H. F.; SHERRIFF, M.; DYMOCK, D.; SANDY, J. R. The effects of different orthodontic appliances upon microbial communities. *Orthod Craniofac Res.* v. 17, n. 2, p. 115-123, 2014.
24. MARSH, P. D. Dental plaque: significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Preiodontol.* v. 32, suppl. 6, p. 7-15, 2005.
25. WESSEL, S. W.; CHEN, Y.; MAITRA, A.; VAN DEN HEUVEL, E. R.; SLOMP, A. M.; BUSSCHER H. J.; VAN DER MEI, H. C. Adhesion Forces and Composition of Planktonic and Adhering Oral Microbiomes. *JDent Res* v. 93: n. 1, p. 84-88, 2014.
26. PEROS, K.; MESTROVIC, S.; ANIC-MILOSEVIC, S.; SLAJ, M. Salivary microbial and nonmicrobial parameters in children with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthodontist.* v. 81, n. 5, p. 901-906, 2011.