

Aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* à Superfície de Braquetes Ortodônticos Metálicos e de Policarbonato

In Vitro Adherence of *Streptococcus mutans* to the Surface of Metallic and Polycarbonate Orthodontic Brackets

TRICIA MURIELLY PEREIRA ANDRADE DE SOUZA¹
IRLAN DE ALMEIDA FREIRES²
DENED MYLLER BARROS LIMA³
VANESSA CARVALHO JOVITO⁴
LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA⁵
RICARDO DIAS DE CASTRO⁶

RESUMO

Objetivo: Verificar a aderência do *Streptococcus mutans* à superfície de dois tipos de braquetes ortodônticos. **Material e Métodos:** foram testados braquetes metálicos (n=3) e de policarbonato (n=3), de acordo com os seguintes grupos: G1 (2 mL de caldo BHI e 140 µL do inóculo), G2 (2 mL de caldo BHI com sacarose e 140 µL do inóculo) e G3 (2 mL de caldo BHI - controle de esterilidade). Um braquete de cada material foi submergido em cada solução (G1, G2 e G3), as quais foram incubadas a 37°C/24h em microaerofilia. Posteriormente, cada braquete foi transferido para um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução fisiológica estéril, que foi submetida a diluições seriadas. Aliquotas de 0,02 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em placas de Petri contendo meio de cultura MSB pela técnica da gota. As placas foram incubadas a 37°C/48h em microaerofilia para contagem das UFC/mL. **Resultados:** As médias do número de UFC/mL para os braquetes incubados em G1 foram 6,3.10² (metálico) e 1.10² (policarbonato). Para G2 as médias foram 5,6.10⁵ (metálico) e 2,4.10⁵ (policarbonato). Houve diferença quanto ao número de UFC/mL aderidas aos braquetes incubados em G1. Entretanto, não se verificou diferença para as amostras incubadas em G2. **Conclusão:** Os achados do presente estudo permitem concluir que, na ausência de sacarose, houve maior aderência de *S. mutans* às superfícies dos braquetes metálicos. Todavia, quando na presença de sacarose, não houve diferença na aderência bacteriana aos braquetes metálicos e de policarbonato.

DESCRIPTORIOS

Aderência Bacteriana. Biofilmes. Braquetes Ortodônticos.

ABSTRACT

Objective: to verify *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) adherence to the surface of two types of orthodontic brackets. **Material and Methods:** Three metal and three polycarbonate brackets were used and testes according to the following groups: G1 (2 mL of BHI broth plus 140 µL of inoculum), G2 (2 mL of BHI broth containing sucrose plus 140 µL of inoculum) and G3 (2 mL of BHI broth - sterility control). A bracket of each type was immersed in each solution (G1, G2 or G3). All solutions were incubated at 37°C/24h, microaerophilic. Then, each bracket was transferred to a test-tube containing 2 mL of sterile saline solution, which underwent serial dilutions. Aliquots of 0.02 mL from each dilution were inoculated in triplicate on Petri-plates containing MSB culture medium through drop technique. Plates were incubated at 37°C, microaerophilics. After 48h, it was performed the CFU/mL counting. **Results:** CFU/mL means for the brackets immersed in G1 were 6.3x10² (metal) and 1x10² (polycarbonate). For G2, the means were 5.6x10⁵ (metal) and 2.4x10⁵ (polycarbonate). Difference was found for the number of CFU/mL adhered to the surfaces of brackets incubated in G1. Nevertheless, no difference was verified for the group incubated in G2. **Conclusion:** It is estimated that there are differences between metal and polycarbonate brackets' surfaces. Presence of sucrose enhanced adherence of microorganisms to the surfaces evaluated.

DESCRIPTORS

Bacterial Adhesion. Biofilms. Orthodontic Brackets.

1 Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil.

2 Mestrando do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba/SP, Brasil.

3 Graduando do curso de Medicina da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

4 Cirurgiã-Dentista

5 Doutoranda pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara/SP, Brasil.

6 Professor Doutor do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

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

Devido às características físicas e propriedades mecânicas que foram intensamente pesquisadas ao longo dos anos, os braquetes metálicos continuam sendo os mais utilizados (MENEZES *et al.*, 2004). Estes apresentam baixo custo, resistência à fratura, estabilidade dimensional e resistência de colagem adequada à superfície dentária (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Entretanto, na busca por braquetes ortodônticos esteticamente aceitáveis e que permitissem movimentação dentária semelhante aos braquetes metálicos, as indústrias de materiais desenvolveram os braquetes de policarbonato (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MALTAGLIATI *et al.*, 2006).

As principais características e propriedades físicas do policarbonato, que permitiram sua aplicabilidade clínica, são: atoxicidade, resistência à abrasão e ao impacto relativamente altas; coloração e translucidez adequados; além disso, trata-se de um material inodoro e insípido (MALTAGLIATI *et al.*, 2006).

Apesar do melhoramento nas propriedades inerentes aos materiais, os braquetes enquanto áreas retentivas de superfícies sólidas são regiões preferenciais de colonização de determinados microrganismos formadores do biofilme dentário (HEINTZE, 1996, SUGA, GUEDES-PINTO, SIMIONATO, 2005) e atuam como retentores de alimentos que favorecem o crescimento e desenvolvimento microbiano, levando a desmineralizações do esmalte, causando manchas brancas, lesões de cárie dentária e gengivite (GWINNETT, CEEN, 1979, HEINTZE, 1996, ANHOURY *et al.*, 2002, FALTERMEIER, BURGERS, ROSENTRITT, 2008).

A presença de braquetes também dificulta a higiene oral (FALTERMEIER, BURGERS, ROSENTRITT, 2008, OLYMPIO *et al.*, 2006). Essa mudança no meio bucal altera a natureza do biofilme dentário levando a

um aumento significativa da população microbiana de estreptococos e lactobacilos (BEYTH *et al.*, 2003).

Dentre os estreptococos, o *Streptococcus 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. Estes polissacarídeos extracelulares 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).

Destarte, o presente estudo teve por objetivo verificar *in vitro* a aderência do *S. mutans* à superfície de braquetes ortodônticos metálicos e de policarbonato.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado como microrganismo teste uma cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fornecida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), situado na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Preparou-se uma suspensão da cepa teste em solução salina estéril, a qual foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da Escala Nefelométrica de McFarland (PROBAC DO BRASIL®, São Paulo, SP, Brasil) correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

A aderência bacteriana foi testada em braquetes ortodônticos metálicos (Braquete Roth Light) (n=3) e de policarbonato (Braquete Roth Morelli Composite) (n=3), ambos da marca Morelli® (Sorocaba, SP, Brasil) para dentes incisivos superiores. Os braquetes foram autoclavados (121°C, 20 min) previamente à realização do experimento.

Um braquete de cada material foi avaliado de acordo com diferentes soluções contendo meio de cultura com/sem sacarose e inóculo bacteriano, conforme especificado no quadro 1.

QUADRO 1. Descrição dos grupos de acordo com a composição das soluções para o teste de aderência de <i>S. mutans</i> .	
GRUPOS	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO
G1	2 mL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion – HIMEDIA®, Mumbai, Índia) e 140 µL do inóculo bacteriano
G2	2 mL de caldo nutritivo BHI adicionado de 15% de sacarose p.a. (Synth®, Diadema, SP, Brasil) e 140 µL do inóculo bacteriano
G3	2 mL de BHI caldo (controle de esterilidade do meio de cultura e das amostras)

Os braquetes foram inseridos individualmente nos tubos de ensaio e incubados em estufa bacteriológica a 37°C, em microaerofilia, por um período de 24 horas.

Após esse tempo, cada braquete foi transferido para um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução salina estéril, a qual foi agitada por 3 minutos em aparelho Vortex. A solução obtida após a agitação foi considerada como a primeira diluição (10^{-1}). A partir dessa, foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} e 10^{-3}) e alíquotas de 0,02 mL de cada diluição foram inoculadas em placas contendo meio de cultura Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (GOLD, JORDAN, VAN HOUTE, 1973) (MSA - DIFCO®, São Paulo, SP, Brasil) pela técnica da gota (MILES, MISRA, IRURN, 1938). Para cada braquete foi utilizada uma placa de Petri dividida em três partes iguais. Em cada terço, foram inoculadas 3 alíquotas de 0,02 mL de cada diluição, totalizando 9 alíquotas por placa. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em microaerofilia para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva, a partir do programa estatístico Graphpad Prism 5.0.

RESULTADOS

Ao compararem-se os braquetes incubados na solução G1 (sem sacarose), verificou-se diferença quanto ao número de UFC aderidas às superfícies dos braquetes metálicos e de policarbonato. Entretanto, não se verificou diferença entre esses dois tipos de braquetes incubados em meio de cultura BHI com sacarose G2). Os valores das médias de UFC por tipo de braquete encontram-se explicitados na tabela 1.

Quanto à solução G3, após o período de incubação, não se observou crescimento bacteriano nas

superfícies de nenhum tipo de braquete, confirmando a esterilidade das amostras e meio de cultura utilizados.

DISCUSSÃO

No presente estudo, optou-se por utilizar braquetes metálicos em virtude da larga utilização desse dispositivo na prática ortodôntica, e braquetes de policarbonato porque, dos materiais que compõem a ortodontia estética, estes são os mais viáveis economicamente e permitem a realização de um procedimento ortodôntico convencional (MALTAGLIATI *et al.*, 2006).

Enquanto isso, 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).

No presente estudo, não houve diferença nos níveis de aderência bacteriana entre os braquetes metálicos e de policarbonato na presença de sacarose. Neste sentido, ANHOURY *et al.*, (2002) compararam a contagem de microrganismos em braquetes metálicos e cerâmicos, na região de incisivos e pré-molares superiores, obtidos no momento da remoção do aparelho, ao final do tratamento, após períodos não relatados de permanência na cavidade bucal. De acordo com os resultados obtidos, o tipo de material do braquete não influenciou na contagem de microrganismos. Além disso, PAPAIOANNOU *et al.* (2007), analisaram *in vitro* a diferença na aderência de *S. mutans* a três tipos de braquetes ortodônticos: aço inoxidável, policarbonato e cerâmico, não sendo encontrada diferença consistente na aderência dessa bactéria aos três tipos de braquetes.

TABELA 1. Médias, medianas e desvios-padrão das UFC de *S. mutans*/mL recuperadas das superfícies dos braquetes.

GRUPO	DADOS	BRAQUETE METÁLICO	BRAQUETE DE POLICARBONATO
1	Média	$6,3 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$
	Desvio-padrão	$2,3 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^2$
2	Média	$5,6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$
	Desvio-padrão	$1,9 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
3	Média	0	0
	Desvio-padrão	0	0

Foi observado um aumento expressivo da colonização por *S. mutans* na superfície dos braquetes submersos na solução que continha BHI caldo adicionado de sacarose, tendo esse grupo apresentado maior média de UFC/mL em ambos os tipos de braquetes em relação às amostras incubadas em meio de cultura sem acréscimo desse dissacarídeo (tabela 1). 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. 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.

Em contrapartida, também houve colonização microbiana na superfície dos braquetes incubados na ausência de sacarose (G1). 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).

Houve diferença em relação à quantidade de UFC aderidas aos braquetes submetidos à G1, com maior colonização dos braquetes metálicos. 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 braquetes metálicos apresentaram a maior tensão superficial crítica e pode vir a ter uma maior capacidade de retenção de placa.

A presente pesquisa, que deve ser interpretada como estudo piloto, apresenta como limitação a utilização de apenas um microrganismo. Contudo, dependendo do tipo de análise a ser realizada, os fatores inerentes à microbiota bucal necessitam ser minimizados para a análise mais detalhada de cada fenômeno (BARBIERE, 2005). Mas, sendo *S. mutans* uma espécie que interage *in vivo* com uma grande variedade de bactérias, faz-se necessário realizar estudos de aderência a braquetes ortodônticos em um modelo de biofilme microbiano. Além disso, destaca-se a necessidade de utilização de um maior número de corpos de prova (braquetes) em cada grupo avaliado, possibilitando, assim, a realização de um análise estatística inferencial, necessária para produção de inferência científicas.

A ausência de condições que mimetizam aquelas encontradas na cavidade bucal, como a presença de saliva, também se constitui uma limitação. A saliva, segundo FOURNIER, PAYANT, BOUCLIN (1998), causa diminuição da afinidade de *S. mutans* a braquetes ortodônticos, sejam esses metálicos, plásticos ou cerâmicos. Assim, em estudos posteriores sugere-se o emprego de saliva artificial.

CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo permitem concluir que, na ausência de sacarose, houve maior aderência de *S. mutans* às superfícies dos braquetes metálicos. Todavia, quando na presença de sacarose, não houve diferença significativa na aderência bacteriana aos braquetes metálicos e de policarbonato.

REFERÊNCIAS

1. ANHOURY P, NATHANSON D, HUGHES CV, SOCRANSKY S, FERES M, CHOU LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod*, 72(4): 338-343, 2002.
2. BARBIERI DSV. Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005. 124p.
3. BEYTH N, REDLICH M, HARARI D, FRIEDMAN M, STEINBERG D. Effect of sustained-release chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 123(3): 345-348, 2003.
4. BORGES MF, CASTILHO ARF, PEREIRA CV. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*. *Rev Odonto Ciênc*, 23(4): 360-364, 2008.
5. 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.
6. FALTERMEIERA, BURGERS R, ROSENTRITTM. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 133(4): 99-103, 2008.
7. FLEISCHMANN LA, SOBRAL MC, SANTOS JÚNIOR GC, HABIB F. Estudo comparativo de seis tipos de braquetes ortodônticos quanto à força de adesão. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial*, 13(4): 107-116, 2008.
8. GOLD OD, JORDAN HV, VAN HOUTE J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol*, 18(4): 1357-1364, 1973.
9. GWINNETT AJ, CEEN RF. Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study. *Am J Orthod*, 75(6): 667-677, 1979.
10. HEINTZE SD. A profilaxia individual em pacientes com aparelhos fixos: recomendações para o consultório. *Ortodontia*, 29(2): 4-15, 1996.
11. 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.
12. KOLENBRANDER PE, LONDON J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*, 175(11): 3247-3252, 1993.
13. MALTAGLIATILA, FERES R, FIGUEIREDO MA, SIQUEIRA DF. Braquetes estéticos – considerações clínicas. *Rev clín ortodon dental press*, 5(3): 89-95, 2006.
14. 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.
15. MENEZES, L. M. et al. Hypersensitivity to metals in Orthodontics. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 126(1): 58-64, 2004.
16. MILES AA, MISRA SS, IRURN JO. The estimation of the bacterial power of the blood. *J Hyg*, 38(6): 732-749, 1938.
17. NYVAD B, KILLIAN M. Comparison of initial streptococcal microflora on dental enamel. *Caries res*, 24(4): 267-272, 1990.
18. OLIVEIRA MV, PITHON MM, RUELLAS ACO, ROMANO FL. Estudo comparativo da resistência ao cisalhamento de braquetes ortodônticos de policarbonato. *Ortodontia SPO*, 40(3): 197-201, 2007.
19. OLYMPIO KPK, BARDAL PA, BASTOS JRM, BUZALAF MA. Effectiveness of chlorhexidine dentifrice in orthodontic patients: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*, 33(6): 421-426, 2006.
20. PAPAIOANNOU W, GIZANI S, NASSIKAC M, KONTOUD E, NAKOUE M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to Different Types of Brackets. *Angle Orthod*, 77(6): 1090-1095, 2007.
21. SANTOS SFS, JORGE AOC. Biofilme dentário. In: JORGE AOC, *Microbiologia Bucal*, 3. ed., São Paulo: Santos, 2007, p.53-70.
22. SUGA SS, GUEDES-PINTO AC, SIMIONATO MRL. 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*, 10(1): 94-107, 2005.
23. 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.

24. WENNERHOLM K, BIRKHED D, EMILSON CG. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. *Caries Res*, 29(1): 54-61, 1995.

Correspondência

Ricardo Dias de Castro
Avenida Cajazeiras, 475, apt. 102,
Bairro: Manaíra
João Pessoa – Paraíba – Brasil
CEP: 58038-040.
E-mail: ricardodiasdecastro@yahoo.com.br