

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**LICIA PACHECO TEIXEIRA**

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS DE NITRETO DE TITÂNIO E  
FOSFATO DE CÁLCIO NA MORFOLOGIA SUPERFICIAL E ADESÃO DE  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* EM BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

**VITÓRIA  
2019**

**LICIA PACHECO TEIXEIRA**

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS DE NITRETO DE TITÂNIO E FOSFATO DE CÁLCIO NA MORFOLOGIA SUPERFICIAL E ADESÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Malacarne-Zanon

**VITÓRIA  
2019**

**LICIA PACHECO TEIXEIRA**

**EFEITOS DA DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS DE NITRETO DE TITÂNIO E FOSFATO DE CÁLCIO NA MORFOLOGIA SUPERFICIAL E ADESÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Malacarne-Zanon  
Departamento de Prótese Dentária  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Nascimento Silva  
Departamento de Clínica Odontológica  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Batitucci dos Santos Daroz  
Departamento de Prótese Dentária  
Universidade Federal do Espírito Santo

*Para Hugo*

## AGRADECIMENTOS

Ao Hugo, por sua presença doce e iluminada. A minha família, base para tudo e que inspira a ser melhor todos os dias. Em especial, ao Gui, por todo seu carinho, incentivo, amor e apoio na nossa aventura conjunta.

À Rose e Ana, minhas fadas madrinhas que cuidam não só do consultório mas da minha família. Aos pacientes queridos, que entenderam minhas ausências e torceram pela finalização desta etapa.

Aos alunos e professores da Associação Brasileira de Odontologia (ABO-ES), pela torcida e suporte.

Aos queridos professores do mestrado em Clínica Odontológica, pela dedicação e carinho em transmitir seus valiosos conhecimentos. À Regina, sempre disposta a auxiliar.

Aos colegas de mestrado, em especial Fernanda e Paula, companheiras de risadas e cafés.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Malacarne Zanon, que tanto me ensinou durante esta orientação. Obrigada pela acolhida e direcionamentos.

Aos Prof. Dr. Adonias Ribeiro e Prof. Dr. Leonardo Gontijo do Laboratório de Plasma do IFES, que cederam suas instalações, tempo e orientação. Ao Bruno, Ricardo e Yandiará pelas contribuições e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Schuenck e ao Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana (LABCAS) pela generosa recepção e ensinamentos. À Monalessa Pereira, pela paciência, bondade e incentivo.

Ao Dr. Paulo César Rédua e ao Prof. Dr. Jaime Cury pela ajuda inestimável e doação da cepa utilizada neste trabalho.

À Katrini Guidolini pela análise estatística e conselhos.

À Melissa Fernandes, Luis Felício Fiorotti e May Anne Alves pela ajuda na coleta de dados e amizade. Aos meus amigos, em especial, Angélica, Nathália, Carol, Penha, Helena e Thiago, pelo afeto e companheirismo.

À banca examinadora pela disponibilidade e gentileza em compartilhar seus conhecimentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica e à Universidade Federal do Espírito Santo que tanto contribuíram para a minha formação profissional.

## RESUMO

As lesões de mancha branca em esmalte afetam a maior parte dos pacientes ortodônticos. O bráquete é um sítio de retenção para o biofilme, e em presença de açúcar, a desmineralização do esmalte pode ocorrer. A incorporação de agentes antimicrobianos ao bráquete é uma opção para a prevenção de cárie, independentemente da colaboração do paciente. O objetivo deste trabalho é avaliar a morfologia superficial e a ação antimicrobiana de filmes finos de fosfato de cálcio amorfo (FCA) e de nitreto de titânio (TiN) depositados em bráquetes ortodônticos. Para tanto, 24 bráquetes metálicos foram distribuídos em três grupos (n=8), de acordo com o tipo de recobrimento (SR- sem recobrimento; FOS- fosfato de cálcio; e TIT- nitreto de titânio). Os revestimentos foram depositados via gaiola catódica nos grupos FOS e TIT; e amostras de referência foram avaliadas por microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios X para caracterização dos filmes. A capacidade de aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* U159 (*S. mutans*) após 24 horas de incubação foi mensurada pela densidade óptica da biomassa do biofilme total corada em cristal violeta. Os experimentos foram realizados em triplicata, em uma única repetição biológica. Os dados foram submetidos à ANOVA 1-fator ( $\alpha=5\%$ ). A microscopia confocal revelou que a média da espessura do filme de FCA ( $105 \pm 1,47$  nm) é maior que a do filme de TiN ( $61,2 \pm 1,56$  nm). A análise por espectroscopia de energia dispersiva comprovou a deposição dos filmes de FCA e TiN na superfície dos respectivos bráquetes e a uniformidade das camadas foi evidenciada pela microscopia eletrônica de varredura. Apenas o grupo FOS apresentou partículas de tamanhos variados na canaleta do bráquete. Após 24 horas, houve formação de biofilme de *S. mutans* em todos os grupos avaliados. A densidade óptica obtida nos três grupos foi semelhante (SR= $0,347 \pm 0,042$ ; FOS= $0,238 \pm 0,055$ ; TIT= $0,226 \pm 0,057$ ), sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,06$ ). O filme fino de FCA alterou a superfície da canaleta do bráquete, enquanto a presença dos revestimentos de TiN e FCA não modificou a morfologia superficial das aletas dos bráquetes e não influenciou na formação do biofilme de *S. mutans* na superfície dos bráquetes metálicos.

Descritores (DeCS): Ortodontia. *Streptococcus mutans*. Biofilmes. Antibacterianos.

## ABSTRACT

White spot lesions affect most orthodontic patients. The bracket is a retention site for biofilm and in the presence of sugar, areas of demineralized enamel can occur. The incorporation of antimicrobial agents into the bracket is an option for caries prevention, independent of patient's compliance. The evaluation of the surface morphology and antimicrobial action of thin films of amorphous calcium phosphate (ACP) and titanium nitride (TiN) deposited in brackets is the aim of this study. Twenty four stainless steel brackets were allocated into three groups (n=8), according to coating types (NC – no coating, FOS - calcium phosphate and TIT - titanium nitride). The coatings were deposited by cathodic cage (FOS and TIT groups) and evaluated by energy dispersive X-ray spectrometry, scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Streptococcus mutans* U159 (*S. mutans*) biofilm quantification was measured by crystal violet assay after 24 hours. All experiments were performed in triplicate and in one biological replicate. Data were submitted to ANOVA One-way ( $\alpha=0.05$ ). Confocal microscopy revealed that the ACP film ( $105 \pm 1,47$  nm) is thicker than the titanium nitride film ( $61,2 \pm 1,56$  nm). Energy dispersive X-ray spectrometry analysis confirmed the deposition of ACP and TiN films on brackets surface. Scanning electron microscopy evidenced the uniformity of layers. FOS group presented particles of varying sizes on slot area. There was *S. mutans* biofilm formation in all groups evaluated. The optical density obtained was similar (NC =  $0,347 \pm 0,042$ ; FOS =  $0,238 \pm 0,055$ ; TIT =  $0,226 \pm 0,057$ ) and no statistically significant differences were observed. The ACP thin film altered the bracket slot surface morphology, while the presence of thin films of ACP and TiN did not influence the formation of the *S. mutans* biofilm on the surface of metallic brackets and did not alter the surface morphology of the wings.

Keywords (MeSH): Orthodontic brackets; *Streptococcus mutans*; Biofilms; Antibacterial agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fluxograma da metodologia empregada.
- Quadro 1 - Composição nominal dos bráquetes metálicos.
- Figura 2 - Representação esquemática em corte do reator de nitretação iônica na configuração de gaiola catódica (A), mostrando no detalhe a gaiola (B).
- Figura 3 - Gaiolas catódicas em posição no reator (A), com a vista superior da tampa da gaiola catódica em detalhe (B).
- Figura 4 - Aspecto visual da formação do plasma na superfície da gaiola em função da pressão de trabalho.
- Figura 5 - Micropoços com bráquetes imersos em suspensão padronizada de *S. mutans* em caldo BHI.
- Figura 6 - Coloração do biofilme com solução aquosa de cristal violeta 0,1%.
- Figura 7 - Processo de descoloração do biofilme com solução de ácido acético 33%.
- Figura 8 - Aparelho de espectrofotômetro utilizado para a leitura das amostras.
- Figura 9 - Aspecto visual dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT após a deposição dos filmes finos correspondentes via gaiola catódica (quando aplicado).
- Figura 10 - Microscopia confocal da lâmina de vidro com filme de fosfato de cálcio.
- Figura 11 - Microscopia confocal da lâmina de vidro com filme de nitreto de titânio, em detalhe com aumento de 20  $\mu\text{m}$ .
- Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo SR, com aumento de 1000x.
- Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo FOS, com aumento de 1000x.
- Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo TIT, com aumento de 1000x.
- Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo SR, com aumento de 1000x.
- Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo FOS, com aumento de 1000x.
- Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo TIT, com aumento de 1000x.
- Figura 18 - Densidade óptica média obtida para cada grupo na presença de *S. mutans* após 24 horas de incubação.



## **LISTA DE TABELA**

Tabela 1 - Composição e concentração dos elementos químicos presentes nos bráquetes dos diferentes grupos de acordo com a análise de EDS.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Ampère

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Ag – Prata

Ag-Pt – Prata-Platina

Ag-TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio-prata

AIISI - *American Iron and Steel Institute*

atm - atmosfera

BHI - *Brain heart infusion*

°C – graus Celsius

C – Carbono

Ca - Cálcio

Ca<sup>+2</sup> - íons Cálcio

cm – Centímetro

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Cr- Cromo

Cu - Cobre

CuO - Óxido de cobre

DO - Densidade óptica

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

EPS - Exopolissacarídeos

FCA - Fosfato de cálcio amorfo

Fe - Ferro

H<sub>2</sub> - Hidrogênio molecular

IFES - Instituto Federal do Espírito Santo

kV – Quilovolt

*L. acidophilus* - *Lactobacillus acidophilus*

µL – Microlitro

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mL - Mililitro

mm - Milímetro

Mn - Manganês

N<sub>2</sub> - Nitrogênio molecular

Ni - Níquel

nm – Nanômetro

O - Oxigênio

P - Fósforo

pH - Potencial hidrogeniônico

*P. gingivalis* - *Porphyromonas gingivalis*

$(\text{PO}_4)^{-3}$  – íon Fosfato

rpm - Rotações por minuto

S - Enxofre

sccm - Centímetros cúbicos padrão por minuto (do inglês, *standard cubic centimeter per minute*)

SE – elétrons secundários

Si - Silício

SiO<sub>2</sub> - Dióxido de silício

*S. mutans* - *Streptococcus mutans*

Ti – Titânio

TiN - Nitreto de titânio

TiO<sub>2</sub> - Dióxido de titânio

Torr - Torricelli

UFC - Unidade formadora de colônias

V - Volt

ZnO - Óxido de Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	CÁRIE DENTÁRIA	15
2.2	LESÃO DE MANCHA BRANCA EM PACIENTES ORTODÔNTICOS	17
<b>2.2.1</b>	<b>Métodos de prevenção</b>	<b>19</b>
2.3	TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE METAIS	20
<b>2.3.1</b>	<b>Nitreto de titânio</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Fosfato de cálcio amorfo</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS	27
4.2	DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS POR GAIOLA CATÓDICA EM BRÁQUETES METÁLICOS	28
4.3	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	30
<b>4.3.1</b>	<b>Microscopia confocal</b>	<b>30</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>31</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Espectroscopia de energia dispersiva de raios x</b>	<b>31</b>
4.4	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	31
<b>4.4.1</b>	<b>Linhagem utilizada e meio de cultura</b>	<b>32</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Seleção dos bráquetes</b>	<b>32</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta</b>	<b>32</b>
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES FINOS DEPOSITADOS	36
<b>5.1.1</b>	<b>Microscopia confocal</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura</b>	<b>37</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Espectroscopia de energia dispersiva de raios X</b>	<b>40</b>
5.2	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	41
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>59</b>
APÊNDICE A	ARTIGO PARA SUBMISSÃO EM PERÍÓDICO	59
	<b>ANEXOS</b>	<b>70</b>
ANEXO A	NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA THE ANGLE ORTHODONTIST	70

## 1 INTRODUÇÃO<sup>1</sup>

A lesão de mancha branca no esmalte dentário pode acometer até 70% dos pacientes em tratamento ortodôntico (JULIEN et al., 2013). A dificuldade de higienização pelo uso do aparelho fixo, associada ao consumo de açúcar e à mudança na microbiota, favorecem o desenvolvimento destas lesões, que ocorrem devido à desmineralização do esmalte pelos ácidos orgânicos produzidos pelo biofilme. Os componentes do aparelho ortodôntico também funcionam como substrato adequado para a retenção dos microrganismos, devido à sua rugosidade superficial e estrutura irregular (GUZMAN-ARMSTRONG et al., 2010).

Vários métodos podem reduzir ou prevenir o surgimento de lesões de mancha branca: melhora da higiene oral, modificação do padrão alimentar com redução do consumo de carboidratos e tratamentos com aplicação tópica de fluoreto (GUZMAN-ARMSTRONG et al., 2010; ENAIA et al., 2011). Entretanto, estes métodos dependem da colaboração do paciente e medidas preventivas que não dependam desta cooperação tendem a ser mais efetivas (WANG et al., 2015).

A preservação do esmalte dentário, a redução do risco de cárie e o controle da formação de biofilme são objetivos constantes durante o tratamento ortodôntico. A presença da cárie impede a continuidade do tratamento, com consequente aumento do tempo e complexidade de trabalho (BISHARA; OSTSBY, 2008). A possibilidade de utilização de materiais ortodônticos com atividade antimicrobiana facilitaria de sobremaneira a prevenção primária da doença cárie em pacientes não colaboradores, através da inibição da formação de biofilme. As recentes descobertas da nanotecnologia mostraram que o tratamento de superfície de metais pela deposição de filmes finos teria efeito inibidor no crescimento de microrganismos e os resultados sugerem uma ampla gama de possibilidades de utilização (GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2001; YOSHINARI et al., 2001; SHAH et al., 2011; CAO et al., 2013; TUPINAMBÁ, 2014; RAMAZANZADEHM et al., 2015; RYU et al., 2012; FATANI et al., 2017, CAO et al., 2016, GHASEMI et al., 2017. ARANYA et al. 2017).

<sup>1</sup> Este texto seguiu as normas ABNT NBR 14724:2011 para normalização de trabalhos acadêmicos. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 14724:** informação e documentação – trabalhos acadêmicos. Rio de Janeiro, 2011.

O revestimento com nitreto de titânio (TiN) é utilizado na Odontologia desde a década de 1980, mas foi descrito apenas em 1992 por Metzger e Creugers. O objetivo inicial era aumentar a dureza do aço inoxidável, sua resistência à abrasão, reduzir a corrosão e a rugosidade. Foi somente a partir de 2000 que o potencial antimicrobiano do TiN passou a ser estudado, especialmente em implantes dentários (GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2001; YOSHINARI et al., 2001; JABBARI et al., 2012). Em Ortodontia, a deposição de TiN em bráquetes não alterou as propriedades friccionais e anticorrosivas desses dispositivos (KAO et al.; 2002; LIU et al., 2007; KAO et al., 2011). Na presente revisão bibliográfica, não foram encontrados trabalhos que avaliassem a possível ação antimicrobiana do revestimento em bráquetes ortodônticos.

O fosfato de cálcio amorfo (FCA) é um intermediário biocompatível na formação da hidroxiapatita. Ele fornece uma liberação sustentada de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) quando o pH salivar cai abaixo de 5,8 (UYSAL et al., 2010a). Os íons cálcio e fosfato liberados interferem no processo cariogênico ao reduzir a desmineralização do esmalte e potencializar a remineralização (HAMMAD et al., 2013).

Originalmente o FCA foi adicionado em dentifrícios, colutórios e géis tópicos (COCHRANE et al., 2010). Em seguida, a substância foi incorporada com bons resultados laboratoriais em materiais dentários como compósitos, adesivos e cimentos como uma alternativa à prevenção secundária da cárie, graças ao seu potencial remineralizante (UYSAL et al., 2010b). Recentemente, Aranya et al. (2017) observaram efeito inibitório no crescimento de microrganismos em implantes dentários de titânio recobertos com FCA.

Dentre todos os materiais ortodônticos, o bráquete desempenha um papel significativo na retenção de biofilme e, em consequência, na desmineralização do esmalte por estar colado ao dente durante todo o período do tratamento ortodôntico. Além disto, seu desenho complexo impõe um ambiente de difícil limpeza (SHAH et al., 2011), favorecendo a proliferação de bactérias acidogênicas em detrimento de outras, com conseqüente alteração da harmonia da microbiota (FREITAS et al., 2014). A possibilidade de deposição de uma película de revestimento com propriedades antibacterianas no bráquete abre um novo horizonte na prevenção primária da cárie em pacientes ortodônticos, independentemente da colaboração dos mesmos.

Em relação aos fatores associados à progressão da doença cárie, o desafio atual busca o controle da formação e adesão do biofilme através do desenvolvimento de substâncias, mecanismos e barreiras que dificultem a formação do biofilme, tanto nas superfícies dentárias, quanto nos aparelhos ortodônticos (SUDJALIM et al., 2007). A adesão bacteriana possui características especiais e dependentes da interação direta do biofilme com a superfície do substrato com o qual este se relaciona. Fatores como presença da película adquirida do esmalte, polaridade, rugosidade, molhabilidade e energia de superfície, desempenham papéis críticos neste relacionamento, interferindo não só na facilidade de adesão como nas características da formação do biofilme (TUPINAMBÁ, 2014).

A modificação das características de superfície dos biomateriais, com a deposição de filmes que possam dificultar ou até mesmo impedir a adesão e reprodução bacteriana, abre nova perspectiva no controle da formação de biofilmes em meio bucal (GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2001; MONTEIRO et al., 2009). Este tipo de prática, bastante comum na Implantodontia (YOSHINARI et al., 2001; GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2004; GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2009), serve de inspiração para que estas estratégias também possam ser utilizadas na Ortodontia. Ainda há carência de estudos na literatura a respeito do controle da adesão do biofilme durante o tratamento ortodôntico através da ação antimicrobiana de revestimentos depositados na superfície dos bráquetes ortodônticos.

À luz da literatura pesquisada, os resultados sugerem haver aplicabilidade para o desenvolvimento de bráquetes ortodônticos com propriedades antimicrobianas. A possibilidade de prevenção primária da doença cárie em pacientes não colaboradores, através da inibição da formação de biofilme solucionaria um importante problema dentro da prática ortodôntica.

Neste sentido, o presente trabalho propõe avaliar o efeito da deposição de filmes finos de TiN e FCA na morfologia superficial e adesão bacteriana em bráquetes ortodônticos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÁRIE DENTÁRIA

A cárie dentária é uma doença multifatorial causada pela modificação ecológica, induzida pelo acúmulo de biofilme na superfície dentária e caracterizada pela desmineralização dos tecidos dentais por ácidos produzidos pela atividade metabólica bacteriana (FEJERSKOV, 2004; CARLETTO-KÖRBER et al., 2015). A destruição progressiva da estrutura dentária ocorre a partir da associação do biofilme acumulado com a regular exposição ao açúcar (CURY et al., 2016).

Portanto, a cárie é uma doença dependente do binômio biofilme-açúcar, sendo a sacarose o açúcar de maior potencial cariogênico (BOWEN, 2002). O acúmulo de biofilme é o fator necessário e a exposição ao açúcar, o fator determinante para a progressão da cárie em qualquer superfície dentária, intacta ou restaurada. A cada exposição ao açúcar, há produção de ácido pelas bactérias do biofilme, com conseqüente queda do pH. O pH é a força motriz que rege a perda ou ganho de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) da estrutura mineral dos dentes (CURY et al., 2016). Enquanto o pH permanece abaixo de 6,5 para a dentina e 5,5 para o esmalte, os minerais destes tecidos são dissolvidos (desmineralização). Após cerca de 20 a 30 minutos, o pH se eleva novamente e a saliva tenta reparar a perda de ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), através do processo denominado remineralização. No entanto, a saliva por si só pode não ser completamente eficaz para reparar todos os íons ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) perdidos durante o processo de desmineralização. O equilíbrio em direção à desmineralização ou à remineralização dependerá da frequência diária de ingestão de açúcares e do biofilme acumulado (HIRATA, 2006).

A etiologia da cárie dentária é considerada um distúrbio do equilíbrio microecológico da placa dental (MARSH, 2006). O biofilme oriundo da placa dental acumulada cresce em todas as superfícies da cavidade oral, incluindo os dentes, a mucosa e todos os materiais ali inseridos (WANG et al., 2016).

A necessidade da formação da película adquirida é o que torna o biofilme dental único. O biofilme dental necessita das glicoproteínas salivares do hospedeiro para se aderir. A formação da película adquirida é baseada na lei de entalpia livre



Gibbs, na qual mais energia é liberada quando as glicoproteínas estão ligadas à superfície do dente ou biomaterial (HUANG et al., 2011).

O biofilme dental é formado por uma sequência organizada de eventos. Após a formação da película adquirida, há a adesão reversível das bactérias planctônicas. Esta adesão é mantida por interações físico-químicas não específicas e constitui o alicerce para o crescimento do biofilme (MARSH, 2006). Os primeiros microrganismos que se ligam aos componentes da película adquirida são chamados de pioneiros ou colonizadores primários. A maioria destes microrganismos são considerados comensais e convivem em relativa harmonia com o hospedeiro. A adesão dos colonizadores primários à película adquirida se dá por ligações fracas, como interações de Van der Waals. A escovação diária desorganiza e remove estes microrganismos aderidos, evitando a progressão da formação do biofilme (HOJO et al., 2009).

As colônias que não foram imediatamente retiradas da superfície pela escovação podem ancorar-se de forma mais permanente, através de moléculas de adesão celular, de modo a ocorrer interações estáveis entre as proteínas da película adquirida com proteínas da superfície bacteriana, as chamadas adesinas (HOJO et al., 2009).

A segunda fase da formação do biofilme dental consiste na transição do estágio reversível da adesão para o irreversível, através dos receptores específicos de adesinas. Em seguida, microrganismos colonizadores secundários se associam às células já aderidas. As bactérias passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Na quarta fase há o início da formação de microcolônias e do desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro. A quinta e última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável à sua manutenção, e há o descolamento do biofilme maduro em forma de agregados celulares ou células planctônicas. Após desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes (MARSH, 2006).

Bactérias em biofilmes dentais produzem ácido láctico e exopolissacarídeos (EPS). Quando o equilíbrio do biofilme é perturbado, o acúmulo de ácido láctico terá um papel fundamental no desenvolvimento da cárie dentária. Constituintes da matriz, como os EPS, podem afetar a difusão de substâncias dentro e fora do

biofilme, favorecendo o desenvolvimento de uma gama diversificada de microambientes dentro do biofilme (KOO et al., 2013).

O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em humanos e fatores de virulência tais como a composição de sua superfície celular (sorotipo) e a produção de bacteriocinas (mutacinas) tem sido investigados em relação à sua cariogenicidade. *S. mutans* está presente em mais de 90% da população mundial e afeta a todos os níveis sócio-econômicos. O microrganismo pode ser classificado em quatro sorotipos (*c*, *e*, *f*, *k*), sendo o sorotipo *c* o mais comumente prevalente (SPOLIDORIO et al., 2015).

A simples presença de *S. mutans* não é indicativa de doença no indivíduo. Este e outros patógenos estão presentes mesmo em condições de saúde do hospedeiro, e se mantem em quantidade reduzida ao longo do tempo (homeostase microbiana). Na cárie dentária, há uma mudança em direção à dominância da comunidade por bactérias de espécies acidogênicas e acidúricas, como *S. mutans* e *lactobacilli*, embora outras espécies possam estar envolvidas. É necessário uma modificação ecológica (presença de açúcar, baixo fluxo salivar, baixo pH etc), para que tais patógenos superem a microflora residente e atinjam a dominância numérica necessária para que a doença ocorra (MARSH, 2006).

## 2.2 LESÃO DE MANCHA BRANCA NO ESMALTE DENTAL EM PACIENTES ORTODÔNTICOS

A lesão de mancha branca permanece um problema durante o tratamento ortodôntico. (TUFEKCI et al., 2011). A primeira evidência clínica da desmineralização da superfície do esmalte é a lesão de mancha branca. Ela representa o primeiro estágio da formação da cárie (LUCHESE; GHERLONE, 2013). As lesões de mancha branca podem acometer qualquer superfície dentária. O padrão de higiene do paciente, dieta, fluxo salivar, níveis de fluoreto, cálcio, fosfato e bicarbonato, além da susceptibilidade genética podem influenciar no seu desenvolvimento (MOUNT; HUME, 2005).

A descalcificação do esmalte é uma sequela da queda do pH gerada pelo acúmulo prolongado de biofilme associado à exposição de açúcar (FEJERSKOV, 2004; BOWEN, 2002; CURY et al., 2016). O biofilme se torna ácido (pH<5) e a hidroxiapatita do esmalte é dissolvida (ØILO; BAKKEN, 2015). O aspecto opaco da

lesão de mancha branca é um fenômeno óptico causado pela perda de mineral na superfície do esmalte e sob o mesmo (GUZMAN-ARMSTRONG et al., 2010).

A ampla variação (de 2 a 96%) da frequência de lesões de mancha branca em pacientes ortodônticos encontrada na literatura pode ser explicada pelos diversos métodos de avaliação utilizados (inspeção visual, microscopia, avaliação ao início ou final do tratamento, etc) (BISHARA; OSTSBY, 2008; HEYMANN; GRAUER, 2013; JULIEN et al., 2013; KAVVADIA et al., 2018). Entretanto, a meta-análise de Sundararaj et al. (2015) confirmou que a incidência (45,8%) e a prevalência (68,4%) de lesões de mancha branca são elevadas em pacientes ortodônticos.

Clinicamente, a lesão de mancha branca pode apresentar rápida progressão. Øgaard et al. (1988) e Chapman et al. (2010) relataram descalcificação a partir da quarta semana de tratamento ortodôntico com aparelho fixo, na presença de higiene oral deficiente. Os dentes mais acometidos são os molares inferiores e incisivos laterais superiores (LUCHESE; GHERLONE, 2013; YAGCI et al., 2019).

O aparelho ortodôntico dificulta a higiene adequada e cria áreas de estagnação do biofilme (GUZMAN-ARMSTRONG et al., 2010). A superfície irregular de bráquetes, bandas e arcos limita o mecanismo de autolimpeza pela musculatura oral e saliva, facilitando a colonização por bactérias acidúricas (MOUNT; HUME, 2005; LUCHESE; GHERLONE, 2013).

Além disso, a colocação da aparelhagem ortodôntica modifica o equilíbrio da microbiota bucal. Há uma modificação na flora, com queda do pH e consequentemente aumento das bactérias acidogênicas (CHATTERJEE; KLEINBERG, 1979; LUNDSTRÖM; KRASSE, 1987). É observado um aumento na quantidade de *mutans streptococci* no biofilme dentário após a instalação de aparelhos ortodônticos e um decréscimo após a remoção (HUSER et al., 1990; ROSENBLOOM; TINANOFF, 1991). O aumento de *S. mutans* e *lactobacilli*, associado à pobre higiene oral e ao regular consumo de açúcar faz com que o progresso da doença cárie seja mais veloz em pacientes ortodônticos do que em pacientes sem aparelho fixo (LIPTAK et al., 2018). A revisão sistemática de Freitas et al. (2014) mostrou moderada evidência de que a presença de aparelhos ortodônticos influencia a quantidade e a qualidade da microbiota bucal. A mudança no equilíbrio do biofilme é ressaltada por Lucchese et al. (2018) como o principal fator no aumento da cariogenicidade do paciente ortodôntico.

Sabe-se que as propriedades das superfícies dos materiais podem influenciar na adesão de biofilmes (TEUGHELIS et al., 2006). O desenho, as dimensões, a energia de superfície e a rugosidade da aparelhagem ortodôntica, bem como o tempo de permanência em boca são cruciais na perturbação do equilíbrio do ecossistema bucal. Aparelhos removíveis (alinhadores e funcionais) tem menor impacto na microbiota oral que os aparelhos ortodônticos fixos, mesmo quando utilizados por períodos acima de 22 horas por dia (FREITAS et al., 2014).

### **2.2.1 Métodos de prevenção**

A atividade antimicrobiana de algumas substâncias tem sido largamente estudada com o objetivo de reduzir a formação do biofilme e consequente desenvolvimento da lesão de mancha branca e cárie. Em pacientes ortodônticos as ações preventivas ficavam restritas ao âmbito das orientações de higiene oral, fluoretação, aplicação de vernizes e fluoretos.

No estudo prospectivo randomizado controlado de Kirschneck et al. (2016), a aplicação de verniz de flúor pelo ortodontista não resultou em uma maior prevenção de lesões de mancha branca no esmalte dentário. Entretanto, Benson et al. (2013) obtiveram 70% de redução na incidência de lesões iniciais de cárie em pacientes ortodônticos com a aplicação de verniz fluoretado a cada seis semanas.

A revisão sistemática de Fernandez-Ferrer et al. (2018) analisou as terapias de remineralização do esmalte para tratamento de manchas brancas após o tratamento ortodôntico. Os autores concluíram que nenhum dos tratamentos propostos foi capaz de remineralizar completamente a lesão já instalada, embora o verniz fluoretado 5% possa auxiliar este processo. Semelhante resultado foi encontrado na meta-análise de Höchli et al. (2017). Ainda que o verniz fluoretado seja considerado efetivo, os resultados clínicos não foram considerados satisfatórios pelos autores. Desta forma, ressalta-se a importância de medidas preventivas que evitem a instalação da doença e o desenvolvimento de manchas brancas em pacientes ortodônticos.

O uso de gel dental com altíssima concentração de flúor (5000 ppm) em pacientes ortodônticos mostra 30% de redução no surgimento de novas lesões de mancha branca, porém há apenas um ensaio clínico a este respeito (SONESSON et

al., 2014). Entretanto, nem sempre a requerida cooperação do paciente com alto risco de cárie é obtida (GUZMAN-ARMSTRONG et al., 2010).

Para Borzahadi-Farahani et al. (2014), a fim de evitar a adesão bacteriana e a desmineralização do esmalte durante a terapia ortodôntica, a maior parte dos estudos atuais aborda duas estratégias gerais: a incorporação de nanopartículas em adesivos, cimentos ou resina acrílica (Ag, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, hidroxiapatita, fluorapatita, fluorhidroxiapatita) e o revestimento de materiais ortodônticos com substâncias antimicrobianas. A adição de elementos nos materiais de colagem de bráquetes, como resina composta e adesivo ainda apresenta resultados dúbios segundo a meta-análise de Almeida et al. (2018). Embora sejam observados relevantes avanços nos ensaios laboratoriais, a piora das propriedades mecânicas ainda é uma importante barreira a ser superada para sua aplicação clínica. A incorporação de substâncias antimicrobianas ao bráquete é uma alternativa de prevenção independentemente da colaboração do paciente ortodôntico.

### 2.3 TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE METAIS

A modificação das propriedades físico-químicas de superfície em metais, visando entre outros fatores, modificar sua molhabilidade e assim modular o desenvolvimento de organismos vivos que entram em contato com estas superfícies, tem sido utilizada em diversas áreas, especialmente nas áreas médica e odontológica (CORTIZO et al., 2012).

O aumento da hidrofobicidade, a redução da rugosidade e a deposição de filmes são modificações na superfície dos bráquetes que podem ser empregadas com o objetivo de reduzir a adesão bacteriana. Um filme fino é uma camada de material que varia de frações de nanômetros (monocamada) a vários micrômetros de espessura. A síntese de filmes finos é realizada através de processos de deposição e tem variada aplicação em ótica, eletrônica, embalagens e biomedicina. O processo de deposição de filmes finos pode ser químico ou físico, a depender do produto original/precursor a ser depositado no substrato (TUPINAMBÁ, 2014).

O tratamento da superfície com a deposição de filmes finos que possam dificultar ou até mesmo impedir a adesão e reprodução bacteriana, é uma perspectiva interessante no controle da formação de biofilmes em meio bucal (GRÖSSNERSCHREIBER et al., 2001; YOSHINARI et al., 2001; MONTEIRO et al.,

2009; SHAH et al., 2011; CAO et al., 2013; TUPINAMBÁ, 2014; RAMAZANZADEHM et al., 2015;).

O revestimento de bráquetes com substâncias antimicrobianas apresenta resultados promissores nos estudos experimentais. Diversos materiais e métodos de deposição de filmes tem sido testados com objetivo de prevenir a formação de lesões de mancha branca no paciente ortodôntico (AHN et al., 2009; BABONI et al., 2010; BORZAHADI-FARAHANI et al., 2014; ALMEIDA et al., 2018).

.Shah et al. (2011) observaram uma menor aderência de *Lactobacillus acidophilus* após 24 horas de incubação nos bráquetes revestidos com dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), graças ao seu efeito fotocatalítico.

Cao et al. (2013) utilizaram filmes finos de  $\text{TiO}_2$  dopados com nitrogênio ( $\text{TiO}_{(2-x)}\text{N}_{(y)}$ ) e encontraram uma redução de 95,19% das colônias de *S. mutans* nos braquêtes metálicos revestidos. A ação antibacteriana do  $\text{TiO}_{(2-x)}\text{N}_{(y)}$  também foi observada contra *L. acidophilus*, *Actinomyces viscosus* e *Candida albicans*, porém em menor escala.

Yuan et al. (2015) avaliaram a resistência à corrosão de bráquetes metálicos revestidos de  $\text{TiO}_{(2-x)}\text{N}_{(y)}$  em saliva artificial com solução de flúor fosfato acidulado a 1,23%. Os resultados apontam para uma melhora da resistência à corrosão, com aumento da resistência à polarização.

A associação de filmes finos de dióxido de titânio e prata ( $\text{Ag-TiO}_2$ ) foi avaliada por Zhang et al. (2015) e Fatani et al. (2017). Fatani et al. (2017) encontraram biocompatibilidade superior nos bráquetes revestidos além de menor adesão dos microrganismos testados (*Porphyromonas gingivalis* e *S. mutans*). Zhang et al. (2015) compararam filmes finos de Ag e  $\text{Ag-TiO}_2$ , depositados pelo método *spin-on*. O filme fino de nano  $\text{Ag-TiO}_2$  apresentou redução de 79% das colônias de bactérias orais (*S. mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinobacillus actinomycesstemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia*) após 20 minutos.

Em seu estudo preliminar, Ghasemi et al. (2017) avaliaram o efeito antimicrobiano e a lisura superficial de bráquetes metálicos revestidos com Ag e óxido de titânio por deposição física a vapor. As colônias foram contadas após 3, 6, 24 e 48 horas. Os bráquetes revestidos apresentaram redução do crescimento bacteriano, porém o revestimento com óxido de titânio também reduziu a lisura superficial.

A deposição de filmes finos de  $\text{TiO}_2$  também é factível em bráquetes estéticos, como demonstraram Cao et al. em 2016. Para evitar o escurecimento esperado na pulverização catódica, os autores utilizaram a deposição por molhamento sol-gel. Os bráquetes cerâmicos revestidos apresentaram menor contagem de colônias de *L. acidophilus* e *C. albicans*. Entretanto, os melhores resultados foram encontrados nos bráquetes com cinco camadas de revestimento.

Metin-Gürsoy et al. (2016) avaliaram os efeitos do filme fino de Ag em bráquetes *in vivo*. Os bráquetes foram colados nos incisivos mandibulares de ratos albinos Wistar e os animais foram sacrificados após 75 dias. A concentração de nanop prata aferida no sangue e na saliva sofreu elevação a partir do sétimo dia e houve redução do biofilme a partir do 30º dia.

Ramazanzadehm et al. (2015) compararam o comportamento de filmes finos de óxido de zinco (ZnO), óxido de cobre (CuO) e ZnO/CuO em culturas de *S. mutans*. As amostras foram avaliadas após 2, 4, 6 e 24 horas. Os bráquetes com revestimentos de ZnO/CuO e CuO não apresentaram crescimento bacteriano após 2 horas.

O efeito antibacteriano do recobrimento de Prata-Platina através da deposição física a vapor em aço inoxidável foi demonstrado por Ryu et al. (2012). Os autores observaram redução significativa da colonização por *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans* após incubação por 8 e 16 horas, respectivamente. A liberação iônica de Ag não afetou negativamente a avaliação da citotoxicidade do material.

A grande variabilidade metodológica observada na literatura evidencia a busca pelo método e material ideais para o revestimento de bráquetes com filmes finos.

### **2.3.1 Nitreto de titânio**

A partir da década de 1980, os revestimentos aderentes de TiN começaram a ser aplicados nos materiais odontológicos usados em Implantodontia, Ortodontia, Endodontia, Prótese dentária e Periodontia. A adição de filmes de TiN permite a obtenção de uma maior dureza superficial, resistência à abrasão, resistência à corrosão, menor atrito, bem como maior interação benéfica com os substratos biológicos e materiais adjacentes (JABBARI et al., 2012).

Apesar da miríade de metodologias possíveis, a maioria dos estudos relaciona a espessura do revestimento entre 1  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ , embora a faixa de 0,06  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  possa ser utilizada (JABBARI et al., 2012). Além da melhora das propriedades mecânicas, em alguns trabalhos, o recobrimento com TiN demonstrou ter efeito inibidor na formação de colônias (YOSHINARI et al., 2001). A revisão de Jabbari et al. (2012) ressalta que os revestimentos de nitreto de titânio parecem ter um efeito benéfico, ao inibir a formação de placa bacteriana e minimizar os efeitos adversos da peri-implantite na longevidade dos implantes.

A aderência de *S. mutans* e *S. sanguinis* foi significativamente reduzida nas superfícies de TiN em comparação com as polidas na avaliação de Grössnerschreiber et al. (2001). Em Scarano et al. (2003), implantes revestidos com TiN apresentaram uma quantidade menor da superfície coberta por bactérias após uma exposição de 24 horas à cavidade oral. O efeito positivo do revestimento de TiN também foi observado por Grössnerschreiber et al. (2004) em lamínulas de vidro mesmo após 60 horas de avaliação.

Anunziata et al. (2011) obtiveram uma redução de 50% na rugosidade superficial de implantes após o revestimento com TiN pela perfilometria confocal ótica. A adesão e proliferação de *Streptococcus pyogenes* e *S. sanguinis* também foi menor nos implantes revestidos quando comparados com o grupo controle.

Em contraste, três estudos *in vitro* avaliaram a atividade antibacteriana de revestimentos de TiN e concluíram que não há diferença entre titânio e titânio nitrificado para a aderência de *S. mutans*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* (YOSHINARI et al., 2000; YOSHINARI et al., 2001; TAMURA et al., 2002). Seo et al. (2017) avaliaram a adesão de *Porphyromonas gingivalis* em implantes dentários de titânio revestidos com TiN e uma maior adesão da bactéria nos implantes revestidos a plasma foi observada.

Em Ortodontia, Kao et al. (2002) não encontraram diferenças nas propriedades anticorrosivas após imersão em saliva artificial ácida ao comparar bráquetes convencionais com revestidos de nitreto de titânio. Kao et al. (2011) não observaram diferenças no coeficiente de atrito de bráquetes revestidos com TiN.

### **2.3.2 Fosfato de cálcio amorfo**



Os fosfatos de cálcio são biocerâmicas constituídas por diferentes composições e amplamente investigadas na área de biomateriais (FOSTER et al., 2008; HAMMAD et al., 2013). O FCA é a fase sólida inicial que precipita de uma solução de fosfato de cálcio altamente supersaturada e possui a capacidade de converter-se em fases cristalinas estáveis como fosfato octacálcico ou produtos apatíticos. O FCA possui melhor osteocondutividade *in vivo* que a hidroxiapatita, melhor biodegradabilidade que o fosfato tricálcico, além de boa bioatividade e ausência de citotoxicidade. Suas propriedades biológicas permitem diversas aplicações. Em Odontologia, o FCA é utilizado principalmente como material remineralizante (UYSAL et al., 2010a; ZHAO et al., 2011; LIU et al., 2018).

O FCA interfere no processo cariioso ao reduzir a desmineralização e potencializar a remineralização. Este mecanismo físico-químico ocorre a cada queda de pH após a ingestão de açúcar. Se há íons de fosfato e cálcio supersaturando a solução salivar, a quantidade de mineral dissolvido é reduzida porque parte do  $(Ca^{+2})$  e  $(PO_4)^{-3}$  perdidos como hidroxiapatita retornam ao dente (HIRATA, 2006).

Como o esmalte é composto principalmente por cálcio e fosfato, o pH e a atividade iônica de  $(Ca^{+2})$  e  $(PO_4)^{-3}$  no fluido do biofilme são determinantes da estabilidade da superfície mineral. Com a queda no pH, a fase mineral torna-se instável causando a dissolução do esmalte, processo este chamado desmineralização. Nessa situação, os ácidos orgânicos difundem-se para o interior do esmalte, via espaços interprismáticos e dissolvem os cristais de apatita. Tal processo é caracterizado pela perda de  $(Ca^{+2})$  e  $(PO_4)^{-3}$  do esmalte para o meio. A desmineralização irá prosseguir até que o pH e a atividade de força iônica do cálcio e fosfato alcancem níveis que tornem a fase mineral estável. O fluido do biofilme, sob condições normais, tem o pH próximo ao neutro e contém excesso de íons  $(Ca^{+2})$  e  $(PO_4)^{-3}$ , criando condições de supersaturação com relação à fase mineral do esmalte. Durante estas condições, ocorre precipitação de minerais para reparar o dano causado durante períodos de desmineralização. Este processo é chamado por remineralização. A formação de uma lesão de cárie e o seu progresso ocorre quando os períodos de desmineralização são mais freqüentes do que os de remineralização. Desta forma a doença se caracteriza por um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização, em função da ingestão de açúcar e do desequilíbrio microbiológico (BOWEN, 2002; CURY et al., 2016).

O FCA é um biomaterial utilizado para reposição e regeneração dentária. Sua adição em materiais de colagem ortodônticos se traduz como uma alternativa de prevenção secundária da cárie, especialmente em pacientes não colaboradores com alto potencial cariogênico. Diversos trabalhos relatam seu efeito positivo na remineralização ao redor da área periférica ao bráquete (SKRTIC et al., 2003; PASCHOS et al., 2016; ZHANG et al., 2016; LIU et al., 2018).

Em caso de desmineralização do esmalte oriunda em resposta a mudanças no ambiente bucal causadas por acúmulo de biofilme, os íons  $(Ca^{+2})$  e  $(PO_4)^{-3}$  liberados dos compósitos com fosfato de cálcio amorfo, podem ser depositados nas estruturas dentárias como um mineral de apatita (UYSAL et al., 2010b).

A resistência de união obtida com a colagem com adesivo acrescido de FCA é menor do que a com adesivo convencional (FOSTER et al., 2008). A resistência de união obtida durante a colagem deve ser suficientemente alta para prevenir descolagens acidentais, resistir aos esforços mastigatórios e permitir o correto alinhamento e nivelamentos dos dentes. Descolagens acidentais acarretam em maior número de consultas, maior tempo clínico e atrasam o final do tratamento. Entretanto, no acompanhamento clínico de 12 meses de Hammad et al. (2013), a resistência de união obtida durante a colagem com adesivo acrescido de FCA foi considerada suficiente.

No recente trabalho de Aranya et al. (2017), as superfícies de titânio de implantes dentários revestidas de FCA apresentaram propriedades antibacterianas. O revestimento de FCA demonstrou ter efeito inibidor na formação de colônias de *P. gingivalis* quando comparado a superfícies de titânio não tratadas na avaliação de 24 horas.

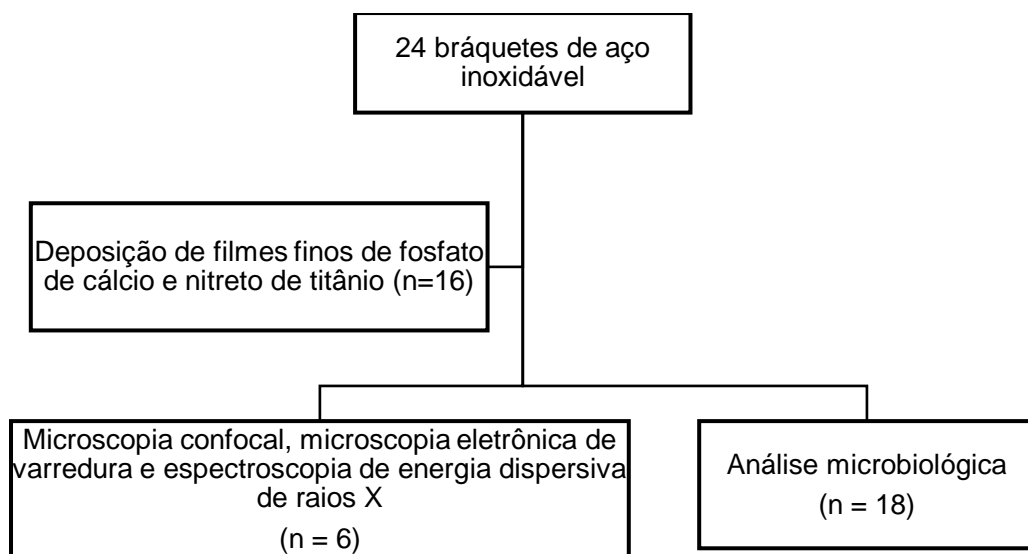
### 3 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a morfologia superficial de bráquetes ortodônticos metálicos, após a deposição de filmes finos de fosfato de cálcio e nitreto de titânio, e a capacidade de aderência *in vitro* de *S. mutans* em suas superfícies.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo experimental *in vitro*, bráquetes ortodônticos foram revestidos por deposição em gaiola catódica com filmes finos de fosfato de cálcio e de nitreto de titânio. As alterações de superfície após a adição dos filmes, bem como a caracterização dos mesmos foi realizada na primeira etapa da pesquisa. Em seguida, o potencial antimicrobiano destes filmes foi avaliado pela quantificação da biomassa total do biofilme através de coloração por cristal violeta. A atividade antimicrobiana dos bráquetes revestidos foi comparada ainda com a de bráquetes não revestidos, nas mesmas condições citadas anteriormente. As etapas da metodologia empregada podem ser observadas esquematicamente na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma da metodologia empregada.



### 4.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Vinte e quatro bráquetes metálicos de incisivos inferiores de aço inoxidável austenítico AISI 304, prescrição *Edgewise*, da marca Morelli® (Sorocaba, SP, Brasil) foram utilizados nesta pesquisa. As informações sobre a composição nominal dos bráquetes, segundo seu fabricante, encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1 - Composição nominal dos bráquetes metálicos.

Material	Fabricante	Composição nominal	Lote e nº de fabricação
24 bráquetes metálicos	Morelli	Carbono (0,008% máximo), Cromo (18-20%), Níquel (8-11%), Manganês (2% máximo), Silício (1% máximo)	2158981

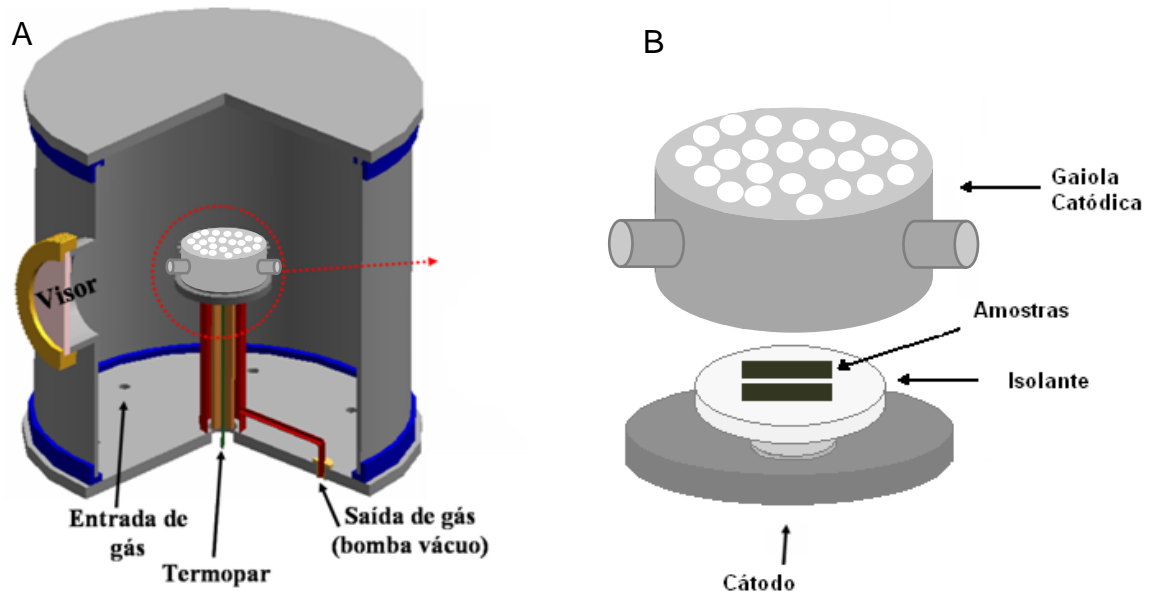
Os bráquetes foram distribuídos em três grupos, de acordo com o recobrimento recebido. Os bráquetes do grupo SR-sem recobrimento (n=8) não receberam qualquer tipo de deposição. Nos grupos fosfato de cálcio-FOS (n=8) e nitreto de titânio-TIT (n=8), os bráquetes foram recobertos com FCA e TiN respectivamente, através do método de deposição por descarga em gaiola catódica. Dois bráquetes de cada grupo foram utilizados para a caracterização da amostra, enquanto o restante foi utilizado na avaliação microbiológica.

#### 4.2 DEPOSIÇÃO DE FILMES FINOS POR GAIOLA CATÓDICA EM BRÁQUETES METÁLICOS

A deposição dos filmes finos foi realizada no Laboratório de Plasma do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES). A técnica de deposição por descarga em gaiola catódica é um método dual, que permite tanto a nitretação como a deposição de filmes (DAUDT, 2012).

Os bráquetes metálicos foram utilizados como substrato para deposição. O reator operado consiste em uma câmara de vácuo cilíndrica com 30 cm de diâmetro e 40 cm de altura, confeccionada em aço inoxidável, com uma janela de quartzo. Na porção inferior da câmara há um sensor de pressão, entrada e saída de gás. A temperatura é medida por um termopar acoplado ao cátodo do reator. A fonte de tensão utilizada é contínua e possui voltagem e corrente máximas de 1500V e 2A, respectivamente. O fluxo de gases é monitorado por meio de controladores de fluxo (MKS MFC1179A). O reator de deposição por descarga em gaiola catódica é apresentado na Figura 2.

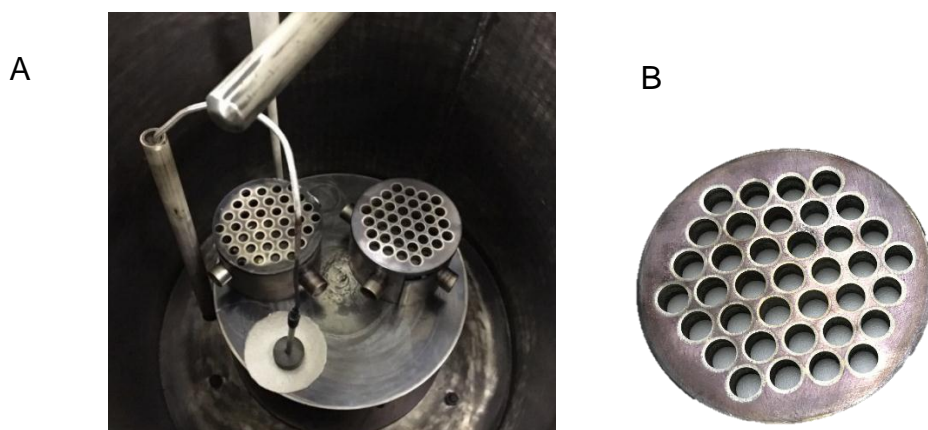
Figura 2 - Representação esquemática em corte do reator de nitretação iônica na configuração de gaiola catódica (A), mostrando no detalhe a gaiola (B).



Fonte: Adaptado de Daudt (2012).

Os bráquetes foram depositados sobre uma folha de mica (isolante), dentro da gaiola (Figura 3). O termopar e a gaiola foram posicionados sobre o cátodo. O plasma é formado na gaiola catódica, que funciona como cátodo (a parede da câmara é o ânodo), e não diretamente na superfície da amostra, que permanece em potencial flutuante. A gaiola foi confeccionada em titânio comercialmente puro grau II, com 100 mm de diâmetro, 64 mm de altura e 1 mm de espessura, com 4 furos de 25 mm de diâmetro. A tampa da gaiola possui diâmetro de 100 mm, 10 mm de espessura e 37 furos circulares de 9 mm de diâmetro cada (Figura 3).

Figura 3 - Gaiolas catódicas em posição no reator (A), com a vista superior da tampa da gaiola catódica em detalhe (B).



Antes da deposição foi feita uma etapa de limpeza no reator utilizando uma atmosfera de plasma de  $H_2$  (200 sccm) por 30 minutos a  $175^\circ C$ , na pressão de 0,8 Torr. Após a limpeza, a duração de cada pulso elétrico é ajustada de 10 em 10 minutos até que se obtenha a pressão desejada para o tratamento.

As deposições foram realizadas na atmosfera de plasma de 20%  $N_2$  e 80% de  $H_2$ , por 330 minutos com a pressão e temperatura constantes de 0,8 Torr e  $240^\circ C$  ( $\pm 5^\circ C$ ), respectivamente (Figura 4). Os valores de pressão, temperatura, fluxo de gases, tensão média e corrente média foram registrados a cada cinco minutos. Ao final da deposição, o reator e a bomba de vácuo foram desligados e aguardou-se o completo resfriamento da câmara para sua abertura.

Figura 4 - Aspecto visual da formação do plasma na superfície da gaiola em função da pressão de trabalho.



#### 4.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

As análises de microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) foram realizadas no Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

#### **4.3.1 Microscopia confocal**

Em face da complexa geometria dos bráquetes ortodônticos, não foi possível realizar a análise do filme diretamente sobre eles, no microscópio confocal. Assim, lâminas de vidro borossilicato (26 mm de altura x 76 mm de comprimento x 1mm de espessura, Precision®) foram colocadas na gaiola catódica, juntamente com os bráquetes, como substrato para a deposição dos filmes finos. Previamente às deposições, uma gota de solução de dióxido de titânio em álcool isopropílico foi dispensada sobre a superfície das lâminas. Desta forma, terminadas as deposições, a gota era removida, deixando um degrau entre a região limpa da lâmina, que estava sob a gota e a região recoberta com o filme. Este procedimento permitiu a avaliação da espessura média (5 medidas por amostra) dos filmes de fosfato de cálcio e de nitrato de titânio por microscopia confocal (DCM 3D, Leica®, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha).

#### **4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia superficial dos bráquetes dos três grupos foi analisada através das imagens obtidas via microscópio eletrônico de varredura EV0 MA (Carl Zeiss®, Jena, Thüringen, Alemanha).

Em cada grupo, duas regiões dos bráquetes foram examinadas (canaleta e aleta) com magnificação de 1000x. A obtenção das imagens foi realizada com elétrons secundários (SE), sob tensão de aceleração de 20 kV e distância de trabalho entre 6,5 e 8,0 mm.

#### **4.3.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X**

A análise de espectroscopia dispersiva de raios X (EDS) foi realizada na EDAX instalada no microscópio eletrônico de varredura modelo EV0 MA (Carl Zeiss®, Jena, Thüringen, Alemanha) e permitiu a identificação dos elementos químicos presentes nos bráquetes, através da interação entre o feixe primário de raios X e as amostras.



#### 4.4 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, todos os bráquetes foram esterelizados previamente em autoclave Stericlan 12 Sandersmedical® (Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil) a 121°C, 1 atm por 30 minutos. Todas as soluções preparadas tiveram sua esterilidade checada após incubação por 24 horas a 36°C. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana (LABCAS), da Universidade Federal do Espírito Santo.

##### 4.4.1 Linhagem utilizada e meio de cultura

A cepa de *S. mutans* U159 foi utilizada e seu estoque foi conservado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol a -80°C. Uma alíquota desta cultura de *S. mutans* foi inoculada em 5 mL de caldo de BHI estéril e incubada por 24 horas a 100 rpm, 37°C e 5% de pressão parcial de CO<sub>2</sub>. A partir do inóculo foram preparadas suspensões padronizadas de 10<sup>8</sup> UFCs/mL (DO<sub>630</sub>=1.0).

##### 4.4.2 Seleção dos bráquetes

Os bráquetes foram divididos em três grupos (n=6), de acordo com o tipo de recobrimento (SR-sem recobrimento; FOS-fosfato de cálcio; e TIT-nitreto de titânio) e avaliados após 24 horas de incubação. Cada experimento foi conduzido com 3 espécimes por material, em uma repetição independente, totalizando 18 testes.

Os controles brancos consistiram dos bráquetes submetidos às mesmas condições experimentais, porém sem microrganismos. Todas as avaliações foram realizadas por uma única examinadora treinada.

##### 4.4.3 Quantificação da biomassa total do biofilme por coloração com cristal violeta

Os bráquetes foram imersos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato contendo alíquotas de 100 µL da suspensão de *S. mutans* em caldo de BHI padronizada (ou apenas BHI, para o controle branco) por 24 horas a 37°C e 5%

pressão parcial de CO<sub>2</sub> (Figura 5). Os meios de cultura não receberam qualquer adição de açúcar ou sacarose.

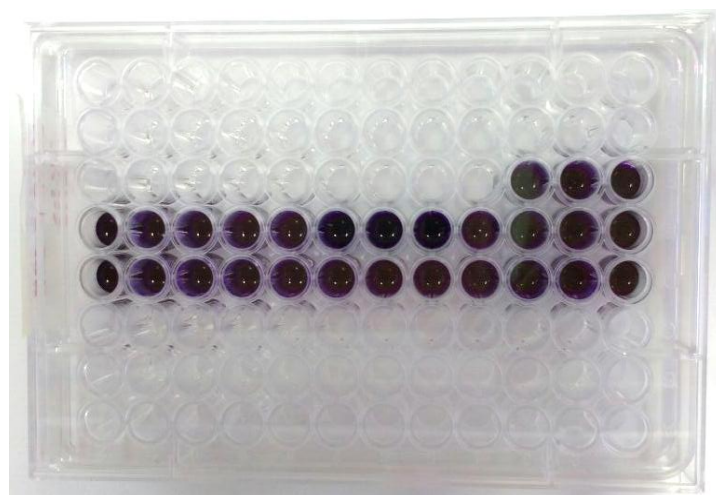
Figura 5 - Micropoços com bráquetes imersos em suspensão padronizada de *S. mutans* em caldo BHI.



A suspensão em caldo BHI foi removida após o término do período de incubação e os bráquetes foram gentilmente lavados com água destilada para remoção das células pobremente aderidas.

As células aderidas foram fixadas com 100 µL de 99% metanol por poço por 15 minutos. O metanol foi removido e os bráquetes secos em estufa a 36°C por 20 minutos. A cada poço da placa foi adicionado 100 µL de solução de cristal violeta 0,1%, conforme ilustrado na Figura 6. O corante foi deixado em contato com o biofilme por 20 minutos em temperatura ambiente, para completa difusão. Em seguida, o excesso de cristal violeta foi removido e cada poço lavado cinco vezes com 200 µL de água destilada.

Figura 6 - Coloração do biofilme com solução aquosa de cristal violeta 0,1%.



Posteriormente, o corante (cristal violeta) impregnado no biofilme foi solubilizado pela adição de 100  $\mu$ L de ácido acético 33% por 20 minutos (Figura 7).

Figura 7 - Processo de descoloração do biofilme com solução de ácido acético 33%.



Alíquotas de 100  $\mu$ L foram transferidas para placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato para determinação da biomassa total por espectrofotometria, conforme a Figura 8. A absorvância da solução de cristal violeta foi mensurada no comprimento de onda de 620nm (BioPhotometer Plus, Eppendorf®, São Paulo, SP, Brasil). Na análise espectrofotométrica da densidade óptica um feixe de luz com comprimento de onda de 620nm é disparado, atravessa o micropoço da placa com 100  $\mu$ l de concentração desconhecida de cristal violeta. Parte da luz é absorvida e a concentração da substância pode ser calculada a partir da quantidade de luz transmitida.

Figura 8 - Aparelho de espectrofotômetro utilizado para a leitura das amostras.



Os valores de absorção dos controles foram subtraídos dos valores obtidos nos grupos experimentais para eliminar a interferência do meio. A quantificação da biomassa total do biofilme foi realizada em triplicatas independentes, em uma repetição biológica.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos foram categorizados em Microsoft Excel (versão 2012 para Windows) e posteriormente analisados no programa IBM SPSS Statistics versão 24. A concordância entre as mensurações foi realizada pelo coeficiente de correlação intraclasse (ICC). A normalidade da amostra foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste ANOVA 1-fator foi utilizado para a comparação entre os materiais de revestimento. Em todas as análises, o nível de significância de  $\alpha = 5\%$  foi adotado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES FINOS DEPOSITADOS

A deposição de filmes finos gerou um escurecimento dos bráquetes do grupo FOS e TIT, quando comparados aos do grupo MAT. O grupo FOS apresentou uma coloração mais suave, com tons de azul enquanto os bráquetes do grupo TIT ficaram mais escuros e rosados, quando comparados aos bráquetes do grupo matriz.

Figura 9 - Aspecto visual dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT após a deposição dos filmes finos correspondentes via gaiola catódica (quando aplicado).



#### 5.1.1 Microscopia confocal

O filme de fosfato de cálcio apresentou uma espessura média de 105,0 nm ( $\pm 1,47$ ), enquanto o filme de nitreto de titânio teve a espessura média de 61,2 nm ( $\pm 1,56$ ) pela microscopia confocal. As imagens tridimensionais geradas pela análise permitem observar a homogeneidade da formação dos filmes nas lâminas de vidro (Figura 10 e Figura 11).

Figura 10 - Microscopia confocal da lâmina de vidro com filme de fosfato de cálcio.

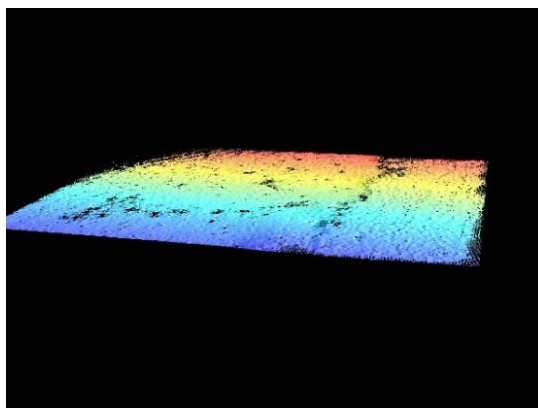
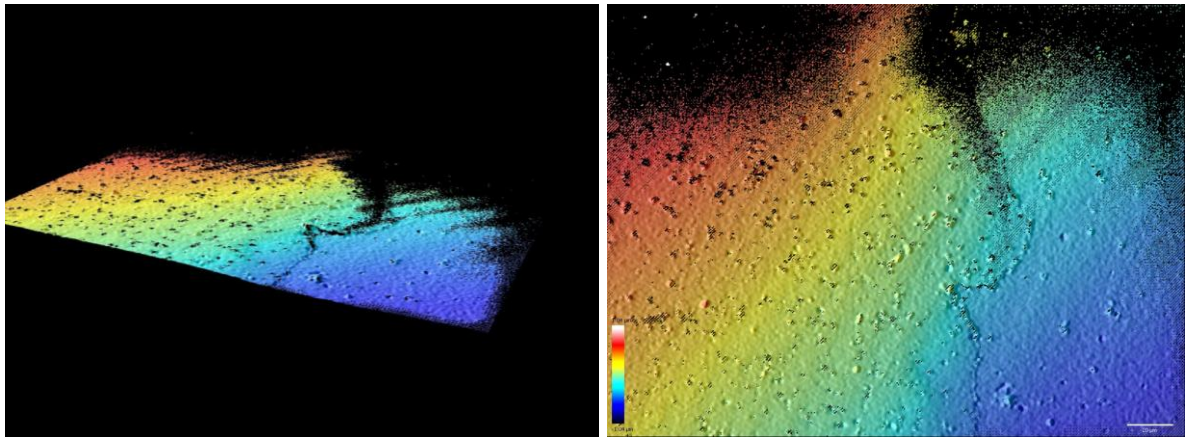


Figura 11 - Microscopia confocal da lâmina de vidro com filme de nitreto de titânio, em detalhe com aumento de 20  $\mu\text{m}$ .



### 5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

As figuras 12 a 14 apresentam as eletromicrografias de varredura do aspecto superficial da aleta dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT, em aumento de 1000x. É possível observar que as aletas dos grupos FOS e TIT apresentam uma morfologia superficial homogênea, assim como o grupo SR.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo SR, com aumento de 1000x.

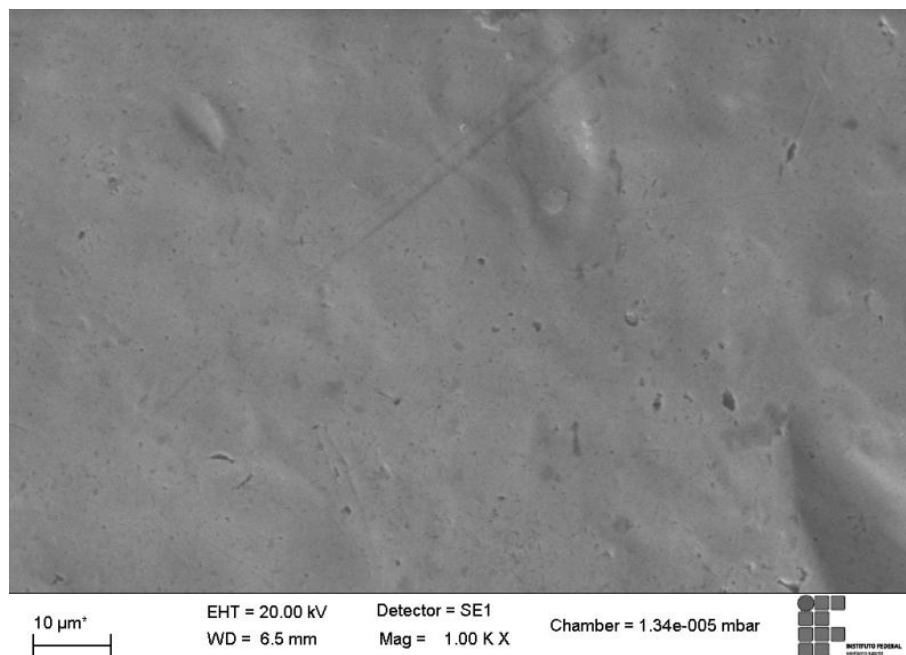


Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo FOS, com aumento de 1000x.

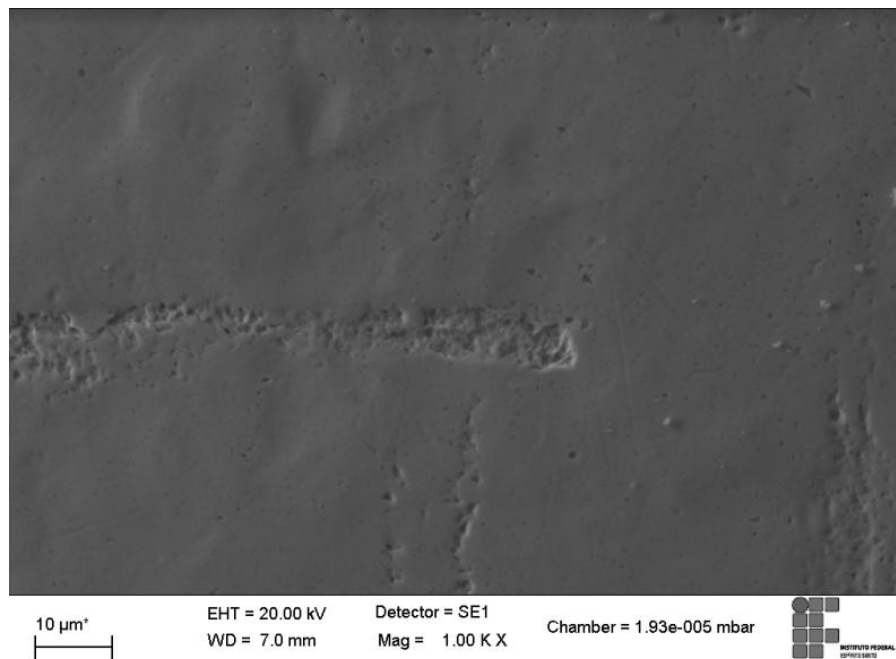
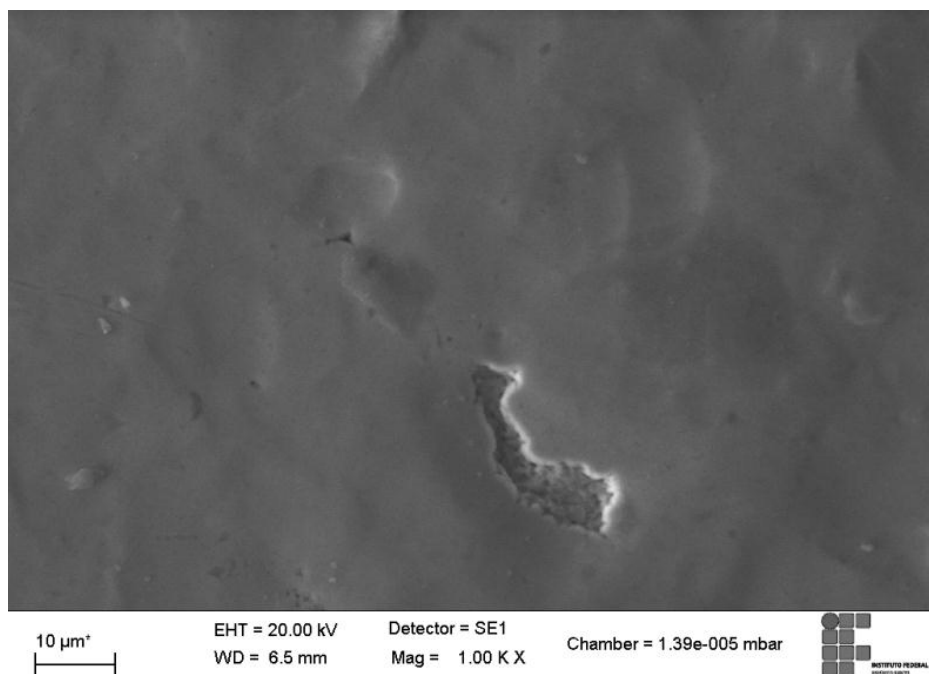


Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta do bráquete do grupo TIT, com aumento de 1000x.



O aspecto superficial da canaleta dos três grupos avaliados não foi homogêneo (Figuras 15 a 17). As setas laranjas na Figura 16 evidenciam a



presença de partículas de variados tamanhos na canaleta do bráquete com filme fino de fosfato de cálcio.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo SR, com aumento de 1000x.

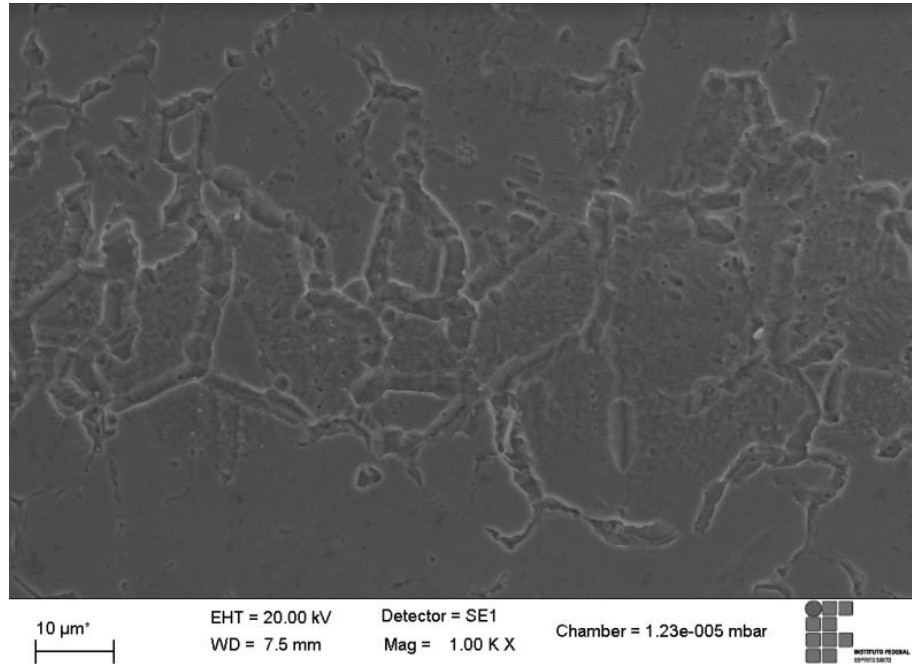


Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo FOS, com aumento de 1000x.

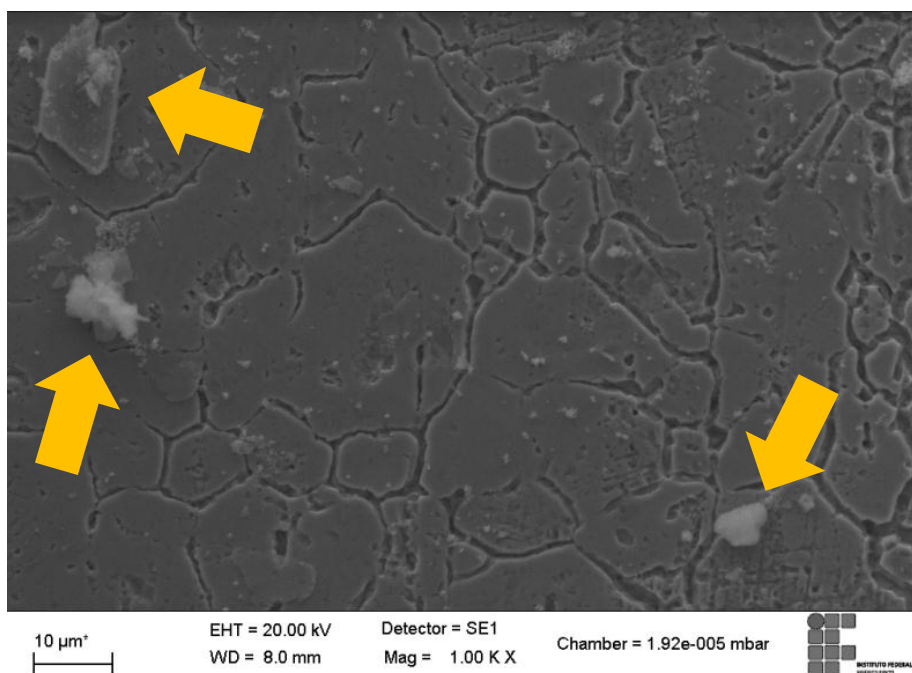
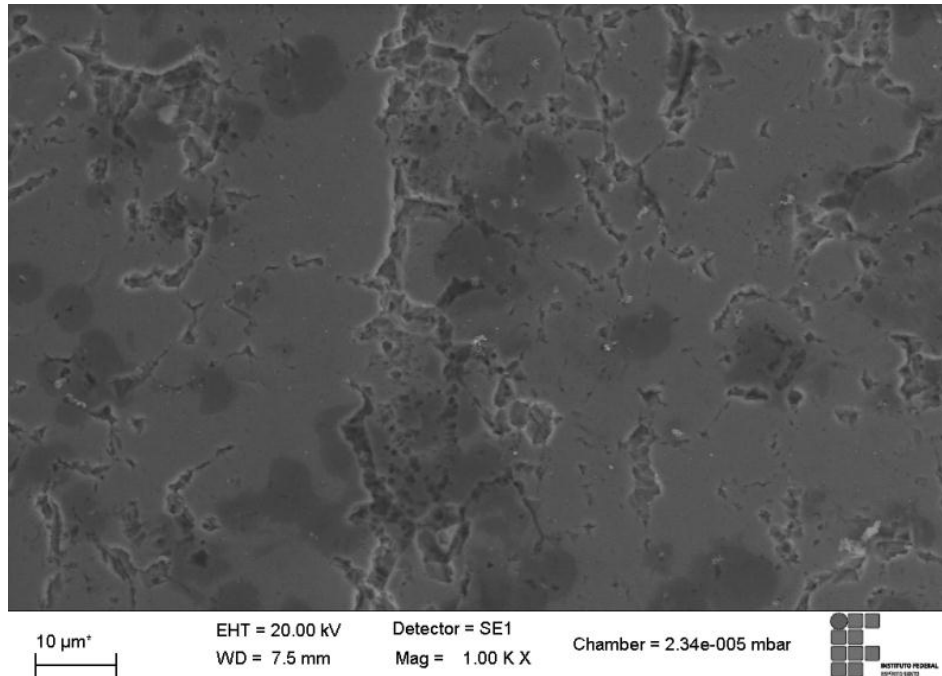




Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do bráquete do grupo TIT, com aumento de 1000x.



### 5.1.3 Espectroscopia de energia dispersiva de raios X

Para avaliar a composição química e as concentrações em porcentagem atômica (%) de cada elemento presente na superfície dos bráquetes dos grupos avaliados, foi realizada a análise de EDS. A tabela 1 apresenta os elementos químicos encontrados de acordo com os espectros de EDS obtidos.

Tabela 1 - Composição e concentração dos elementos químicos presentes nos bráquetes dos diferentes grupos de acordo com a análise de EDS.

Elementos químicos	Porcentagem atômica (%)		
	MAT	FOS	TIT
Fe	59,7	54,8	43,7
O	0,5	5,6	12,8
Cr	16,1	15,4	12,2
Ni	7	6,9	6,2
C	7,8	10,5	8,9
Cu	1,8	1,8	1,6
Mn	1,5	1,4	1,3
Si	1,5	1,1	6,7
S	0,2	0,2	0,2
Ti		0,9	2,3
Ca		0,2	
P		0,2	
Ag	3,9	1,0	4,1

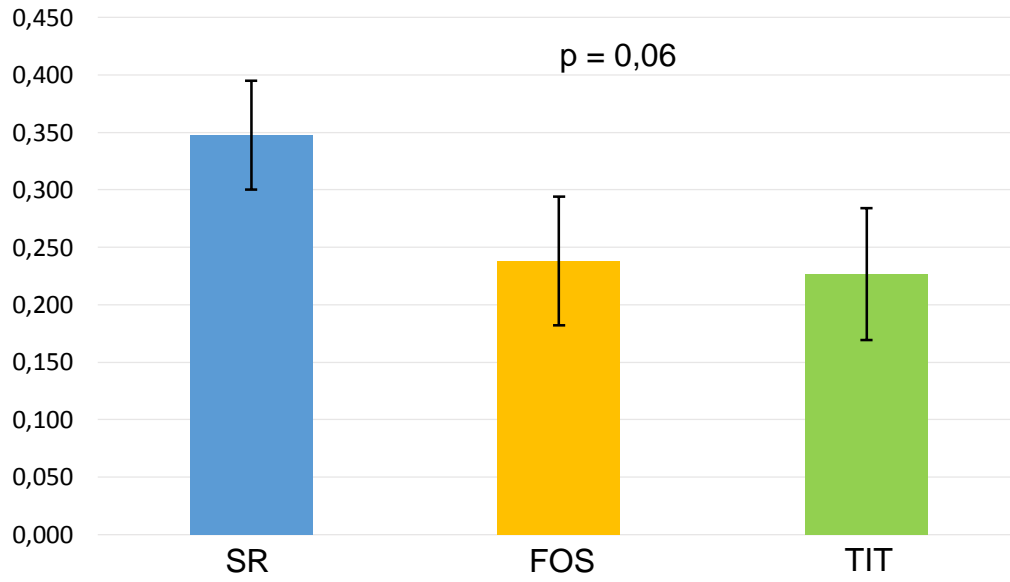
As siglas dos grupos correspondem a SR-sem recobrimento, FOS-fosfato de cálcio e TIT-nitreto de titânio.

A análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios X ratificou a presença de cálcio (Ca) e de fósforo (P) na superfície dos bráquetes do grupo FOS e de titânio (Ti) na superfície dos bráquetes do grupo TIT. Os espectros dos elementos ferro, cromo, carbono, manganês, níquel e silício estão presentes em todas as avaliações por identificarem os elementos químicos constituintes do bráquete. A presença de prata corresponde ao processo de soldagem da manufatura do bráquete. O titânio presente no grupo FOS é proveniente da gaiola de titânio utilizada para a deposição do recobrimento.

## 5.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

O coeficiente de correlação intraclassa foi considerado satisfatório (ICC=0,667, com IC 95%,  $p=0,085$ ). A avaliação do controle branco demonstrou ausência de contaminação das amostras, com estabilidade dos valores observados no tempo de avaliação. A aderência de *S. mutans* para cada grupo após 24 horas de incubação é apresentada na figura 18, não houve diferença estatisticamente significativa na biomassa corada nos bráquetes ( $p = 0,06$ ).

Figura 18 - Densidade óptica média obtida para cada grupo na presença de *S. mutans* após 24 horas de incubação.



## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho buscou avaliar a influência da deposição de filmes finos na morfologia superficial e na adesão microbiana sobre bráquetes metálicos. A redução da adesão significaria uma forma de prevenção primária da cárie em pacientes ortodônticos. Dentre os diversos métodos de recobrimento em metais (*ion sputtering*, *plasma spray*, sol-gel, eletrólise e biomiméticos, por exemplo) o presente trabalho optou pela deposição a plasma por gaiola catódica. Trata-se de um método inovador desenvolvido em 2007, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte e cuja utilização em escala industrial ainda está em fase de implantação (SOUSA, 2007). Foi criado como uma alternativa para as limitações dos métodos tradicionais de nitretação (efeito de borda, abertura de arcos, efeito de cátodo oco, contração e sobreaquecimento). A vantagem da técnica está na formação de uma película mais uniforme e fina, inclusive em substratos com geometria complexa (GUERRA-NETO et al., 2012).

A pulverização catódica alterou a coloração dos bráquetes, como pode ser observado na Figura 9. Trata-se de uma modificação inerente à técnica de deposição física, também relatada por Shah et al. (2011) e Cao et al. (2013). Como a percepção estética do aparelho ortodôntico parece estar atrelada à quantidade de metal exposto (ROSVALL et al., 2009; FEU et al., 2012), o escurecimento dos bráquetes é um dado importante. Cao et al. (2016) optaram pela deposição por molhamento sol-gel em bráquetes estéticos para evitar o escurecimento esperado na pulverização catódica. O revestimento inibiu a formação de colônias, porém foram necessárias cinco camadas de filme. Revestimentos compostos por várias camadas tendem a apresentar menor adesão ao substrato. Apesar do prejuízo estético, a deposição por gaiola de plasma permite a formação de um filme fino com apenas uma única camada.

A microscopia confocal revelou que o filme de fosfato de cálcio depositado na lâmina de vidro é cerca de 70% mais espesso que o filme de nitreto de titânio. Uma espessura elevada está relacionada com o aumento da tensão intrínseca do filme com maior risco de falhas coesivas e trincas (TATSCH, 1996; SOUSA, 2007).

A aderência de *S. mutans* nos grupos FOS e TIT foi estatisticamente semelhante, apesar da diferença de espessura dos filmes depositados (105,0 nm

$\pm 1,47$  no grupo FOS e  $61,2 \text{ nm} \pm 1,56$  no grupo TIT), pois em ambos os grupos a espessura foi inferior a 200 nm. Para Bollen et al. (1997) e Grössnerschreiber et al. (2001), a rugosidade superficial menor que 200 nm não tem efeito na adesão microbiana pois a maioria das bactérias tem um tamanho maior. Katsikogianni e Missirlis (2004) e Tsang et al. (2007), por sua vez, demonstraram que rugosidade superficial acima de 200 nm pode aumentar a adesão celular por criar sítios favoráveis para a colonização dentro das irregularidades.

A uniformidade superficial dos bráquetes dos grupos MAT, FOS e TIT foi avaliada por MEV em duas regiões distintas (aleta e canaleta). Houve equivalência no aspecto superficial dos três grupos na região da aleta e partículas foram observadas na canaleta do grupo FOS. Enquanto as aletas dos bráquetes servem para conter o fio ortodôntico através de ligaduras metálicas ou elastoméricas, a região da canaleta tem fundamental importância na movimentação ortodôntica do dente. A presença de irregularidades na canaleta poderia influenciar no coeficiente friccional desta região, comprometendo a mecânica de deslize (ASSAD-LOSS et al., 2008).

É importante ressaltar que a microscopia eletrônica de varredura gera imagens bidimensionais e a avaliação da rugosidade da canaleta do bráquete deve ser realizada quantitativamente de maneira tridimensional (ASSAD-LOSS et al., 2008). A avaliação quantitativa da rugosidade da região da canaleta assim como sua relação com os resultados qualitativos obtidos no MEV para o grupo FOS deve ser foco de novos estudos.

A presença de partículas pode ser correlacionada com uma menor cristalinidade no filme de fosfato de cálcio depositado. Ao analisar diversos revestimentos de fosfato de cálcio, Arayna et al. (2017) observaram que a atividade antibacteriana encontrada foi inversamente proporcional ao grau de cristalinidade. Uma maior cristalinidade tende a uma menor taxa de dissolução e consequentemente menor efeito dos íons na população bacteriana.

O fosfato de cálcio necessita ser solubilizado para que possa exercer seu efeito remineralizante no esmalte dentário (UYBAL, et al., 2010b). Contudo, ainda é incerto o grau de solubilidade necessária para que um revestimento de fosfato de cálcio consiga atuar na remineralização dentária sem, no entanto, comprometer a integridade superficial do revestimento. Øilo e Bakken (2015) questionam os efeitos a longo prazo de recobrimentos em biomateriais odontológicos. Para os autores, é

incerta a manutenção das propriedades mecânicas ao longo do tempo e a liberação gradual poderia acarretar em perda de material, com consequente aumento da rugosidade e da retenção bacteriana.

Na análise EDS foi constatada a presença de enxofre (S) em todos os grupos. O S é utilizado para elevar o limite de escoamento e a usinabilidade do aço. Gontijo et al. (2004) também encontraram a presença de S nos bráquetes da marca Morelli®, em sua avaliação de bráquetes metálicos de diversas marcas. A presença de Ag indica que o processo de manufatura dos bráquetes teria sido por solda contínua. Este processo envolve a laminação e a usinagem, e apresenta como desvantagem a maior probabilidade de corrosão intergranular.

Diferentemente de outros trabalhos encontrados na literatura, a presente pesquisa avaliou o comportamento de filmes finos após 24 horas de incubação. O tempo de avaliação foi escolhido para que se pudesse observar tanto a fase de aderência bacteriana inicial quanto a formação do biofilme propriamente dito. A avaliação da adesão de *S. mutans* em bráquetes após 2 horas de incubação foi realizada por Thaweboon et al. (2014), Baboni et al. (2010) e Rosario et al. (2011), enquanto Ahn et al. (2009) analisaram a aderência bacteriana após 3 e 6 horas de incubação. Os reduzidos intervalos de tempo citados são característicos de avaliações de aderência do microrganismo ao substrato, embora os autores relatem ter avaliado a formação do biofilme. Para Grössnerschreiber et al. (2009), colonização inicial é aquela que ocorre nas primeiras 24 horas de incubação. Entretanto, a um biofilme que lhe é permitido crescer por dias tem uma composição totalmente diferente de um biofilme que é removido e renovado diariamente (ØILO; BAKKEN, 2015). Neste trabalho, o termo biofilme se refere a uma complexa organização bacteriana com produção de substância extracelular (matriz), após a adesão inicial e maturação de microrganismos à superfície do bráquete. A grande divergência nos tempos de avaliação dificulta uma comparação entre as pesquisas.

Para evitar um fator de confusão, no presente estudo não se adicionou glicose 5% ao meio, em consonância com Thaweboon et al. (2014), Baboni et al. (2010), Rosario et al. (2011) e Ahn et al. (2009). Esta escolha metodológica também encontra ressonância no estudo de Barbieri (2005), pois a colonização inicial da superfície dental é um mecanismo considerado sacarose-independente. A sacarose está relacionada com a permanência dos microrganismos pioneiros e com a consolidação do biofilme formado.

A ação bactericida relatada na literatura e a excelente biocompatibilidade do fosfato de cálcio e do nitreto de titânio fizeram destes os filmes finos experimentais de escolha para este trabalho. Entretanto, não foi encontrada nenhuma evidência de características antimicrobianas nos filmes finos experimentais avaliados visto que a biomassa total corada nos biofilmes foi semelhante nos três grupos. A pequena espessura do filme do grupo TIT ( $61,2 \text{ nm} \pm 1,56$ ) pode justificar em parte este achado. Jeyachandran et al. (2010) só observaram efeito bactericida do TiN em filmes finos maiores de 100 nm. Os autores creditaram este feito à redução da carga elétrica das interações eletrostáticas entre as bactérias e o filme de TiN de maior espessura. A carga elétrica da superfície bacteriana varia com a espécie, com as condições do meio e com a composição de sua membrana. Em geral, bactérias suspensas em meio aquoso tendem a ter sua superfície carregada negativamente. Este perfil parece influenciar na fase inicial de adesão (fase reversível), sendo que a formação do biofilme reduz a ação de correntes elétricas sobre a adesão. A importância do carregamento elétrico da superfície bacteriana, entretanto, ainda não está muito bem esclarecida (MORAES et al., 2013).

Neste trabalho, a superfície do bráquete não mostrou influência sobre a densidade de biofilme acumulado. Os resultados estão em conformidade com Brusca et al. (2007) e Papaioannou et al. (2007), e opostos aos reportados por Rammohan et al. (2012) quando compararam o padrão de adesão e crescimento de *S. mutans* na superfície de bráquetes metálicos, cerâmicos e plásticos. Entretanto, Papaioannou et al. (2007) também avaliaram os bráquetes na presença da película salivar. Os autores ressaltaram o importante papel da película salivar que teria a capacidade de reduzir quaisquer diferenças nas características da superfície cariogênica (energia livre da superfície). A camada de proteína salivar adsorvida pode influenciar positivamente (pela presença de receptores específicos) ou negativamente (ao diminuir a energia livre de superfície dos materiais adjacentes) a adesão bacteriana (AHN et al., 2005; AHN et al., 2008). Na colonização inicial, o efeito é positivo pois os receptores da película salivar interagem com a superfície dos microorganismos pioneiros (LI et al., 2014). Ao avaliar bráquetes não revestidos de película salivar, apenas as características dos materiais expostos na superfície influenciam na adesão bacteriana, que é regida pelas leis da termodinâmica (AHN et al., 2005). Desta forma, os trabalhos que utilizaram saliva na sua metodologia foram descartados para comparação com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Conforme descrito por Rosan e Lamont (2000), a formação do biofilme dentário se dá em duas etapas distintas, a primeira etapa está associada com a adsorção das células bacterianas à película adquirida do esmalte; a segunda etapa envolve a união das células aderindo-se umas às outras. Portanto, a utilização de filmes que tenham a capacidade de impedir fixação inicial dos primeiros microrganismos formadores de colônias seria a abordagem ideal.

A análise microbiológica deste trabalho foi realizada em apenas uma repetição independente, totalizando 18 testes. Trata-se de um trabalho piloto que objetiva a sua continuação posteriormente, com maior número de repetições. A repetição não contribui, necessariamente, para o incremento da precisão do experimento, mas é importante para o aumento da precisão das estimativas de médias e de outras funções das variáveis respostas. A ampliação do número de repetições contribui, substancialmente, para o aumento da confiabilidade dessas estimativas e da sensibilidade do experimento para detectar pequenas, mas importantes, diferenças de efeitos de tratamento (KVAM et al., 2012). Além disso, o aumento da amostra permitirá certificar se o teste estatístico utilizado tinha poder suficiente para detectar uma diferença significativa entre as médias da densidade óptica da adesão de *S. mutans* dos três grupos avaliados. Como o valor de  $p$  foi maior que o nível de significância estabelecido ( $\alpha=5\%$ ), não há provas suficientes para rejeitar a hipótese nula de que as médias avaliadas são iguais.

Embora a avaliação laboratorial busque mimetizar o que ocorre na cavidade bucal, estudos *in vitro* não podem prever completamente o comportamento dos materiais dado as limitações do laboratório e incapacidade de reproduzir todos os fatores encontrados intraoralmente (WANG et al., 2015). A cepa de *S. mutans* é indicada por estar intimamente associada à cárie dentária e ter sido utilizada em vários estudos anteriores (RAMMOHAN et al., 2012; ROSARIO et al., 2011; RYMOVICZ et al., 2013; THAWEBON et al., 2014; WANG et al., 2016).

Apesar de amplamente utilizado para a detecção de biofilmes (BABONI et al., 2010; ROSARIO et al., 2011; RYMOVICZ et al., 2013), o método de análise possui limitações. A coloração com cristal violeta é inespecífica e não permite a avaliação da viabilidade celular (WELCH et al., 2012). Uma vez que o cristal violeta cora tanto as células bacterianas como a matriz extracelular, ensaios metabólicos são mais indicados para a quantificação da viabilidade bacteriana em biofilme.



Os biofilmes avaliados neste estudo são monoespecíficos e certamente não refletem fielmente a realidade do microcosmo da microbiota oral, porém permitem analisar a capacidade de dois filmes finos com características distintas em interferir nas propriedades de adesão e formação de biofilme de *S. mutans* em bráquetes metálicos. Experimentos posteriores envolvendo biofilmes multiespecíficos e que permitam a coagregação de espécies devem ser conduzidos, para o aprofundamento do entendimento da dinâmica de formação dos biofilmes, sua fisiologia e subsequente papel dos filmes depositados. Da mesma forma, novos estudos abrangendo uma maior caracterização dos filmes finos de fosfato de cálcio e nitreto de titânio formados a partir da deposição por gaiola catódica também se fazem necessários.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que o filme fino de fosfato de cálcio alterou a superfície da canaleta do bráquete, enquanto a presença dos revestimentos de nitreto de titânio e fosfato de cálcio não modificou a morfologia superficial das aletas dos bráquetes e não influenciou na formação do biofilme de *Streptococcus mutans* na superfície dos bráquetes metálicos.

## REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

AHN, S. J. et al. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4259–4268, set. 2008.

AHN, S. J. et al. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. **Dent Mater**, v. 25, n. 2, p. 206-213, fev. 2009.

AHN, S.J. et al. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. **Angle Orthod**, v. 75, n. 1, p. 666-671, dez. 2005.

ALMEIDA, C. M. et al. Efficacy of antimicrobial agents incorporated in orthodontic bonding systems: a systematic review and meta-analysis. **J Orthod**, v. 45, n. 2, p. 79-93, jun. 2018.

ANNUNZIATA, M. et al The effects of titanium nitride-coating on the topographic and biological features of TPS implant surfaces. **J Dent**, v.39, n. 11, p. 720–728, nov. 2011.

ARANYA, A. K. et al. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. **J Biomed Mater Res A**, v. 105, n. 8, p. 2218–2227, ago. 2017.

ASSAD-LOSS, T.; NEVES, R. M. L.; MUCHA, J. N. Composição química e aspecto superficial do slot de braquetes metálicos. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v.13, n. 3, p. 85-96, jun. 2008.

BABONI, F. et al. Influence of cigarette smoke condensate on cariogenic and candidal biofilm formation on orthodontic materials. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, n. 4, p. 427-434, out. 2010.

BARBIERI, V. S. D. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Odontologia, Curitiba, 2005.

BENSON, P. E. et al. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. **Cochrane Database Syst Rev**, v.12, n. 12, p. CD003809, dez. 2013.

BISHARA, S. E.; OSTBY, A. W. White spot lesions: Formation, prevention, and treatment. **Semin Orthod**, v. 14, n. 3, p. 174-182, set. 2008.

<sup>2</sup> Elaboradas de acordo com as normas ABNT NBR 6023:2018 para referências de trabalhos acadêmicos.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação – referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2018.

BOLLEN, L.; LAMBRECHT, P.; QUIRYNEN, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. **Dent Mater**, v. 13, p. 258–269, jan. 1997.

BORZABADI-FARAHANI, A.; BORZABADI, E.; LYNCH, E. Nanoparticles in orthodontics: a review of antimicrobial and anti-caries applications. **Acta Odontol Scand**, v. 72, n. 6, p. 413-417, ago. 2014.

BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 126-131, jan. 2002.

BRUSCA, M. I. et al. Influence of diferente orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. **Angle Orthod**, v. 77, n. 2, p. 331-336, mar. 2007.

CAO, S. et al. Preparation and antimicrobial assay of ceramic brackets coated with TiO<sub>2</sub> thin films. **Korean J Orthod**, v. 46, n. 3, p. 146-154, maio 2016.

CAO, B. et al. Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO(2-x)N(y) thin film and examination of its antimicrobial performance. **Dent Mater J**, v. 32, n. 2, p. 311-316, abr. 2013.

CARLETTO-KÖRBER, F. P. et al. Serotype diversity of *Streptococcus mutans* and caries activity in children in Argentina. **Eur J Paediatr Dent**, v.16, n. 3, p. 177-180, set. 2015.

CHAPMAN, J. A. et al. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, n. 2, p. 188-194, ago. 2010.

CHATTERJEE, R.; KLEINBERG, I. Effect of orthodontic band placement on the chemical composition of human incisor tooth plaque. **Arch Oral Bio**, v. 24, n. 2, p. 97–100, jan. 1979.

COCHRANE, N. J. et al. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p.1187–1197, nov. 2010.

CORTIZO et al. Chlorhexidine delivery system from titanium/polybenzyl acrylate coating: evaluation of cytotoxicity and early bacterial adhesion. **J Dent**, n. 40, v. 4, p. 329– 337, abr. 2012.

CURY, J. A. et al. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dent Mater**, v. 32, n. 3, p. 323-333, mar. 2016.

DAUDT, N. F. **Influência de processo na deposição de nitreto de titânio por plasma em gaiola catódica**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e

Engenharia dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

ENAIA, M.; BOCK, N.; RUF, S. White-spot lesions during multibracket appliance treatment: a challenge for clinical excellence. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 140, n. 1, p. 17-24e, jul. 2011.

FATANI, E. J. et al. In vitro assessment of stainless steel orthodontic brackets coated with titanium oxide mixed Ag for anti-adherent and antibacterial properties against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Microb Pathog**, v. 112, p. 190-194, nov. 2017.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 182-191, maio 2004.

FERNÁNDEZ-FERRER, L. et al. Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions: a systematic review. **J Am Dent Assoc**, v.149, n. 9, p. 778-786, set. 2018.

FEU, D. et al. Esthetic perception and economic value of orthodontic appliances by lay Brazilian adults. **Dental Press J Orthod**, v. 17, n. 5, p. 102-114, set. 2012.

FOSTER, J. A.; BERZINS, D. W.; BRADLEY, T. G. Bond strength of an amorphous calcium phosphate-containing orthodontic adhesive. **Angle Orthod**, v. 78, n. 2, p. 339-344, mar. 2008.

FREITAS, A. O. A. et al. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. **Dental Press J Orthod**, v. 19, n. 2, p. 46-55, mar-abr. 2014.

GHASEMI, T. et al. Antimicrobial effect, frictional resistance, and surface roughness of stainless steel orthodontic brackets coated with nanofilms of silver and titanium oxide: a preliminary study. **Microsc Res Tech**, v. 80, n. 6, p. 599-607, jun. 2017.

GONTIJO, L. P.; MAZZIEIRO, E. T.; LANDRE JUNIOR, J. Composição química e resistência mecânica da base de bráquetes *straight wire*. **Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial**, v. 9 n. 4, p. 52-59, jul. 2004.

GRÖSSNERSCHREIBER, B. et al. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? **Eur J Oral Sci**, v. 112, n. 6, p. 516–522, dez. 2004.

GRÖSSNERSCHREIBER, B. et al. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. **Clin Oral Impl Res**, v. 20, n. 1, p. 817-826, Abr. 2009.

GRÖSSNERSCHREIBER, B. et al. Plaque formation on surface modified dental implants: an in vitro study. **Clin Oral Implant Res**, v. 12, n. 6, p. 543-551, dez. 2001.

GUERRA NETO, C. et al. Estudo da viabilidade da técnica de plasma em descarga de gaiola catódica para obtenção de filmes de TiN para revestimentos biocompatíveis. **Rev Bras Inovação Tecnológica em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 16-24, jul. 2012.

GUZMAN-ARMSTRONG, S.; CHALMERS, J.; WARREN, J.J. White spot lesions: prevention and treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, n. 6, p. 690-696, dez. 2010.

HAMMAD, S. M.; EL BANNA, M. S.; ELSAKA, S. E. Twelve-month bracket failure rate with amorphous calcium phosphate bonding system. **Eur J Orthod**, v. 35, n. 5, p. 622-627, out. 2013.

HEYMANN, G. C.; GRAUER, D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. **J Esthet Restor Dent**, v. 25, n. 2, p. 85-95, abr. 2013.

HIRATA, E. **Potencial de remineralização do cálcio e fosfato**: revisão de literatura e estudo laboratorial. 2006. 86 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006.

HÖCHLI, D. et al. Interventions for orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Orthod**, v. 39, n. 2, p. 122-133, abr. 2017.

HOJO, K. et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 982-990, nov. 2009.

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

HUSER, M. C.; BAEHNI, P. C.; LANG, R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 97, n. 3, p. 213-218, mar. 1990.

JABBARI, Y. S. A. et al. Titanium nitride and nitrogen ion implanted coated dental materials. **Coatings**, v. 2, n. 3, p. 160-178, jul. 2012.

JEYACHANDRAN, Y. L.; NARAYANDASS, S. K. The effect of thickness of titanium nitride coatings on bacterial adhesion. **Trends Biomater Artif Organs**, v. 24, n. 2, p. 90-93, jan. 2010.

JULIEN, K. C.; BUSCHANG, P. H.; CAMPBELL, P. M. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. **Angle Orthod**, v. 83, n. 4, p. 641–647, jul. 2013.

KAO, C. T. et al. The anticorrosion ability of titanium nitride (TiN) plating on an orthodontic metal bracket and its biocompatibility. **J Biomed Mater Res**, v. 63, n. 6, p. 786–792, out. 2002.

KAO, C. T.; GUO, J. U.; HUANG, T. H. Comparison of friction force between corroded and noncorroded titanium nitride plating of metal brackets. **Am J Orthod Dentofac Orthoped**, v. 139, n. 5, p. 594–600, maio 2011.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **Eur Cells Mater**, v. 8, p. 37-57, jan. 2004.

KAVVADIA K. et al. Validation of fluorescence devices for evaluation of white spot lesions in orthodontic patientes. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 19, n. 2, p. 83-89, abr. 2018.

KIRSCHNECK, C. et al. Efficacy of fluoride varnish for preventing white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment with fixed appliances: a prospective randomized controlled trial. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 9, p. 2371-2378, jan. 2016.

KOO, H.; FALSETTA M. L.; KLEIN, M. I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. **J Dent Res**, v. 92, n. 12, p. 1065-1073, dez. 2013.

KVAM, V. M.; LIU, P.; SI, Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. **Am J Bot**, v. 99, n. 2, p. 248-256, fev. 2012.

LIPTAK, L. et al. Microbiological changes and caries preventive effect of an innovative varnish containing chlorhexidine in orthodontic patients. **Caries Res**, v. 52, n. 4, p. 272-278, jun. 2018.

LI, F. et al. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model. **Dent Mater**, v. 30, n. 2, p. 182-191, fev. 2014.

LIU, C. et al. Effects of Ti/TiN multilayer on corrosion resistance of nickel-titanium brackets in artificial saliva. **Corrosion Sci**, v. 49, n. 10, p. 3783-3796, out. 2007.

LIU, Y. et al. Antibacterial and remineralizing orthodontic adhesive containing quaternary ammonium resin monomer and amorphous calcium phosphate nanoparticles. **J Dent**, v. 72, p. 53-63, maio 2018.

LUCCHESI, A. et al. Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. **J Oral Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 1476645 eCollection, jul. 2018.

LUCCHESI, A.; GHERLONE, E. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. **Eur J Orthod**, v. 35, n. 5, p. 664-668, out. 2013.

LUNDSTRÖM, F.; KRASSE, B. *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. **Eur J Orthod**, v. 9, n. 2, p. 109–116, maio 1987.

MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v. 6, n. 1, s. 14, p. 1-7, jul. 2006.

METIN-GÜRSOY, G.; TANER, L.; BARIŞ, E. Biocompatibility of nanosilver-coated orthodontic brackets: an *in vivo* study. **Prog Orthod**, v. 17, n. 39, p. 1-8, dez. 2016.

METZGER, P. R.; CREUGERS, N. H. Titanium nitride coatings in clinical dentistry. **J Dent**, v. 20, n. 6, p. 342–344, dez. 1992.

MONTEIRO et al. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **Int J Antimicrob Agents**, n. 34, n. 2, p. 103–110, ago. 2009.

MORAES, N. M. et al. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. **Rev Med Minas Gerais**, n. 23, n. 1, p. 99-104, jan. 2013.

MOUNT, G. J.; HUME, W. R. **Preservation and restoration of tooth structure**. 2ed. Queensland: Knowledge Books and Software, 2005.

ØGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1: Lesion development. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 94, n. 1, p. 68-73, jul. 1988.

ØILO, M.; BAKKEN, V. Biofilm and Dental Biomaterials. **Materials (Basel)**, v. 8, n. 6, p. 2887-2900, jun. 2015.

PAPAIOANNOU, W. et al. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. **Angle Orthod**, v. 77, n. 6, p. 1090-1095, nov. 2007.

PASCHOS, E. et al. Efficacy of four preventive measures against enamel demineralization at the bracket periphery: comparison of microhardness and confocal laser microscopy. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 6, p. 1355-1366, jul. 2016.



RAMAZANZADEH, B. et al. Comparison of antibacterial effects of ZnO and CuO nanoparticles coated brackets against *Streptococcus mutans*. **J Dent (Shiraz)**, v. 16, n. 3, p. 200-205, set. 2015.

RAMMOHAN, S. N. et al. Adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* to different bracket materials. **J Pharm Bioapplied Sci**, v. 4, n. 2, p. 212-216, abr. 2012.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes Infect**, n. 2, v. 13, p. 1599-1607, nov. 2000.

ROSARIO JR., A. F. et al. Differential adhesion of *Streptococcus mutans* to metallic brackets induced by saliva from caries-free and caries-active individuals. **J Investig Clin Dent**, v. 2, n. 3, p. 197-200, ago. 2011.

ROSENBLOOM, R. G.; TINANOFF, N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 100, n. 1, p. 35-37, jul. 1991.

ROSVALL, M. D. et al. Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 135, n. 3, p. 276.e1-12, mar. 2009.

RYMOVICZ, A. U. et al. Virulence modulation of *Streptococcus mutans* biofilms by metal ions released from orthodontic appliances. **Angle Orthod**, v. 83, n. 6, p. 987-993, nov. 2013.

RYU, H. S. et al. Antibacterial effect of silver-platinum coating for orthodontic appliances. **Angle Orthod**, v. 82, n. 1, p. 151-157, jan. 2012.

SCARANO, A. et al. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. **J Oral Implant**, v. 29, n. 2, p. 80–85, abr. 2003.

SEO, N. R. et al. Effect on adhesion of *Porphyromonas gingivalis* by titanium nitride sputter coating or plasma nitriding of titanium. **J Nanosci Nanotechnol**, v.17, n.4, p. 2633-2636, Abr. 2017.

SHAH, A. G. et al. *In vitro* assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. **Angle Orthod**, v. 81, n. 6, p. 1028-1035, nov. 2011.

SKRTIC, D.; ANTONUCCI, J. M.; EANES, E. D. Amorphous calcium phosphate-based bioactive polymeric composites for mineralized tissue regeneration. **J Res Natl Inst Stand Technol**, v. 108, n. 3, p.167–182, jun. 2003.

SONESSON, M.; TWETMAN, S.; BONDEMARK, L. Effectiveness of high-fluoride toothpaste on enamel demineralization during orthodontic treatment: a multicenter randomized controlled trial. **Eur J Ortho**, v. 36, n. 6, p. 678-682, dez. 2014.

SOUSA, R. R. M. **Nitreção em plasma com gaiola catódica**: investigação do mecanismo e estudo comparativo com a nitreção em plasma de tensão contínua. 2007. 168 f. Tese (Doutorado em Processamento de Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Salivary biotypes of *mutans Streptococci* levels in schoolchildren aging 6-8 year old having a socioeconomic base. **Braz J Oral Sci**, v. 3, n. 8, p. 390-394, nov. 2015.

SUDJALIM, T. R. et al. Prevention of demineralization around orthodontic brackets in vitro. **Am J Orthod Dentofac Orthoped**, v. 131, n. 6, p. 705e1-705e9, jun. 2007.

SUNDARARAJ, D. et al. A. Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: a meta-analysis. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 5, n. 6, p. 433-439, nov. 2015.

TAMURA, Y. et al. Surface properties and biocompatibility of nitrided titanium for abrasion resistant implant materials. **Dent Mater J**, v. 21, n. 4, p. 355-372, dez. 2002.

TATSCH, P. J. Deposição de filmes finos. In: SWART, J. W. (Org.) **V Oficina de Microeletrônica**: oficina de microfabricação, projeto e construção de CIs e MOS. São Paulo: FEEEC/Unicamp, 1996. cap. 11, p. 1-21.

TEUGHEL, W. et al. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, n. 2, p. 68-81, out. 2006.

THAWEBON, S. et al. Adhesion of *Streptococcus mutans* on different types of orthodontic brackets. **Advanced Mat Res**, v. 893, p. 467-471, fev. 2014.

TSANG, C. S.; NG, H.; MC MILLAN, A. S. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. **Clin Oral Investig**, v. 11, p. 361-368, jan. 2007.

TUFEKCI, E.; DIXON, J. S.; GUNSOLLEY, J. C.; LINDAUER, S. J. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. **Angle Orthod**, v. 81, n. 2, p. 206-210, mar. 2011.

TUPINAMBÁ, R. A. **Adesão bacteriana em braquetes metálicos com tratamento de superfície**: estudo *in vitro*. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2014.

UYSAL, T. et al. Bond strength of ceramic brackets bonded to enamel with amorphous calcium phosphate-containing orthodontic composite. **Eur J Orthod**, v. 32, n. 3, p. 281–284, jun. 2010a.

UYSAL, T. et al. Effects of different topical agents on enamel demineralization around orthodontic brackets: an *in vivo* and *in vitro* study. **Aust Dent J**, v. 55, n. 3, p. 268-274, set. 2010b.

WANG, S. P. et al. Effect of anti-biofilm glass–ionomer cement on *Streptococcus mutans* biofilms. **Int J Oral Sci**, v. 8, n. 2, p. 76-83, jun. 2016.

WANG, X.; WANG, B.; WANG, Y. Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 148, n. 6, p. 974-981, dez. 2015.

WELCH, K.; YANLING, C.; STRØMME, M. A method for quantitative determination of biofilm viability. **J Funct Biomater**, v. 3, n. 1, p. 418-431, jan. 2012.

YAGCI, A. et al. Do total or partial etching procedures effect the rate of white spot lesion formation? A single center randomized, controlled clinical trial. **Angle Orthod**, v. 89, n. 1, p. 16-24, jan. 2019.

YOSHINARI, M. et al. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 14, p. 2043–2048, jul. 2001.

YOSHINARI, M. et al. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 52, n. 2, p. 388–394, nov. 2000.

YUAN, X. S. et al. Effects of N-doped TiO<sub>2</sub> thin films on corrosion resistance of stainless steel orthodontic brackets in artificial saliva. **Corrosion**, v. 71, n. 6, p. 784-794, jun. 2015.

ZHANG, R. et al. Report: Discussion on the development of nano Ag/TiO<sub>2</sub> coating bracket and its antibacterial property and biocompatibility in orthodontic treatment. **Pak J Pharm Sci**, v. 28, n. 2, p. 807-810, mar. 2015.

ZHANG, L. et al. Rechargeable calcium phosphate orthodontic cement with sustained ion release and re-release. **Sci Rep**, v. 3, n. 6, p. 36476, nov. 2016.

ZHAO, L. et al. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. **Chem Cent J**, v. 5, n. 40, p. 1-7, jul. 2011.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - ARTIGO PARA SUBMISSÃO EM PERÍODICO

#### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA MORFOLOGIA SUPERFICIAL DE FILMES FINOS DE NITRETO DE TITÂNIO E FOSFATO DE CÁLCIO EM BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

##### **RESUMO**

Objetivos: Este trabalho avaliou experimentalmente a morfologia superficial e a capacidade de aderência de *Streptococcus mutans* (U159) em bráquetes com filmes finos de fosfato de cálcio e de nitreto de titânio.

Material e métodos: Bráquetes metálicos foram divididos em três grupos (n=8), de acordo com o tipo de recobrimento (SR – sem recobrimento; FOS – fosfato de cálcio; TIT – nitreto de titânio). Os revestimentos foram depositados via gaiola catódica nos grupos FOS e TIT; e amostras de referência foram avaliadas por microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios X para caracterização dos filmes. A densidade óptica da biomassa do biofilme total foi mensurada por coloração em cristal violeta, após 24 horas de incubação.

Resultados: Houve homogeneidade na morfologia superficial na região de aletas em todos os grupos, enquanto FOS apresentou partículas na canaleta. Após 24 horas, houve formação de biofilme de *S. mutans* em todos os grupos avaliados. A densidade óptica obtida nos três grupos foi semelhante (SR=0,347 ±0,042; FOS=0,238 ± 0,055; TIT=0,226 ± 0,057), sem diferença estatisticamente significativa (p=0,06).

Conclusão: O filme fino de fosfato de cálcio alterou a superfície da canaleta do bráquete, enquanto os revestimentos de nitreto de titânio e fosfato de cálcio não modificaram a morfologia superficial das aletas. A presença dos revestimentos de nitreto de titânio e fosfato de cálcio não influenciou na formação do biofilme de *S. mutans* na superfície dos bráquetes metálicos.

## INTRODUÇÃO

As lesões de mancha branca afetam a maior parte dos pacientes ortodônticos. O bráquete é um sítio de retenção e na presença do binômio biofilme-açúcar, a desmineralização do esmalte pode ocorrer.<sup>1-3</sup> A atividade antimicrobiana de algumas substâncias tem sido largamente estudada com o objetivo de reduzir a formação do biofilme e conseqüente desenvolvimento da lesão de mancha branca e cárie. Em pacientes ortodônticos as ações preventivas ficavam restritas ao âmbito das orientações de higiene oral, fluoretação, aplicação de vernizes e fluoretos.<sup>4-6</sup>

Dentre todos os materiais ortodônticos, o bráquete desempenha um papel significativo na retenção de biofilme e, em conseqüência, na desmineralização do esmalte por estar colado ao dente durante todo o período do tratamento ortodôntico. Além disto, seu desenho complexo impõe um ambiente de difícil limpeza.<sup>7-9</sup> A incorporação de agentes antimicrobianos ao bráquete é uma opção para a prevenção de cárie, independente da colaboração do paciente.

O revestimento com nitreto de titânio (TiN) é utilizado na Odontologia desde a década de 1980, mas foi somente a partir de 2000 que seu potencial antimicrobiano passou a ser estudado, especialmente em implantes.<sup>10</sup> Diversos autores relatam menor adesão bacteriana em superfícies revestidas por TiN em comparação aos grupos controles.<sup>11-14</sup>

O fosfato de cálcio amorfo (FCA) é um biomaterial utilizado para reposição e regeneração dentária. Sua adição em materiais de colagem ortodônticos se traduz como uma alternativa de prevenção secundária da cárie, especialmente em pacientes não colaboradores com alto potencial cariogênico. Graças ao seu potencial remineralizante, a substância foi incorporada em diversos materiais dentários e já mostrou efeito positivo na remineralização na área periférica ao redor do bráquete.<sup>15,16</sup> Recentemente, foi observado efeito inibitório no crescimento de microrganismos em titânio recoberto com FAC.<sup>17</sup>

A ação bactericida relatada na literatura e a excelente biocompatibilidade do fosfato de cálcio e do nitreto de titânio fizeram destes os filmes finos experimentais de escolha para esta pesquisa. A avaliação *in vitro* da morfologia superficial e da capacidade de aderência de *Streptococcus mutans* em bráquetes com filmes finos de fosfato de cálcio e de nitreto de titânio é o objetivo deste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro bráquetes de incisivos inferiores de aço inoxidável, prescrição *Edgewise*, da marca Morelli® foram divididos em três grupos, de acordo com o recobrimento recebido. Os bráquetes do grupo SR (n=8) não receberam qualquer tipo de deposição. Nos grupos FOS (n=8) e TIT (n=8), os bráquetes foram recobertos com fosfato de cálcio e nitreto de titânio respectivamente, através do método de deposição por descarga em gaiola catódica. As deposições foram realizadas em gaiola de titânio comercialmente puro grau II perfurada (100 mm x 64 mm x 1 mm), na atmosfera de plasma de 20% N<sub>2</sub> e 80% de H<sub>2</sub>, por 330 minutos com pressão e temperatura constantes (0,8 Torr e 240±5°C).

Dois bráquetes de cada grupo foram utilizados para a caracterização da amostra por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia dispersiva de raios X (EDS), enquanto o restante foi utilizado na avaliação microbiológica.

A morfologia superficial de duas regiões dos bráquetes de cada grupo foi examinada (canaleta e aleta) através de imagens obtidas via MEV EV0 MA (Carl Zeiss ®), com magnificação de 1000x. A análise de EDS foi realizada na EDAX (EV0 MA, Carl Zeiss ®) e permitiu a identificação dos elementos químicos presentes nos bráquetes, através da interação entre o feixe primário de raio-x e as amostras.

Os bráquetes restantes foram esterelizados a 121°C, 1 atm por 30 minutos (Stericlan 12 Sandersmedical®). A cepa de *Streptococcus mutans* U159 foi utilizada neste estudo. Uma alíquota desta cultura de *S. mutans* foi inoculada em 5 ml de caldo de BHI estéril e incubada por 24 horas a 100 rpm, 37°C e 5% de pressão parcial de CO<sub>2</sub>. A partir do inóculo foram preparadas suspensões padronizadas de 10<sup>8</sup> UFCs/ml (DO<sub>630</sub>=1.0).

Os bráquetes foram divididos em três grupos (n=6), de acordo com o tipo de recobrimento (SR- sem recobrimento; FOS- fosfato de cálcio; e TIT- nitreto de titânio) e avaliados após 24 horas de incubação. Cada experimento foi conduzido com 3 espécimes por material, em uma repetição independente, totalizando 18 testes. Os controles brancos consistiram dos bráquetes submetidos às mesmas condições experimentais, porém sem microrganismos.

Os bráquetes foram imersos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato contendo alíquotas de 100 µl da suspensão de *S. mutans* em caldo de BHI padronizada (ou apenas BHI, para o controle branco) por 24 horas a 37°C e 5%

pressão parcial de CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura não receberam qualquer adição de açúcar ou sacarose.

Após o período de incubação, os bráquetes foram gentilmente lavados com água destilada e as células que permaneceram aderidas foram fixadas com 99% metanol por 15 minutos. Os bráquetes foram secos e imersos em solução de cristal violeta 0,1% por 20 minutos. O excesso de cristal violeta foi removido e cada poço lavado cinco vezes com água destilada. Posteriormente, o cristal violeta impregnado no biofilme foi solubilizado pela adição de 100 µL de ácido acético 33% e a DO<sub>620</sub> foi determinada (BioPhotometer Plus, Eppendorf®, São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de absorção dos controles foram subtraídos dos valores obtidos nos grupos experimentais para eliminar a interferência do meio. A quantificação da biomassa total do biofilme foi realizada em triplicatas independentes, em uma repetição biológica. As diferenças estatísticas entre os resultados dos grupos foram avaliadas por ANOVA 1-fator e o nível de significância de  $\alpha = 5\%$  foi adotado.

## RESULTADOS

### *Caracterização dos filmes finos depositados*

A deposição de filmes finos gerou um escurecimento dos bráquetes dos grupos FOS e TIT, quando comparados aos do grupo SR. (Figura 1)

A figura 2 apresenta as eletromicrografias de varredura do aspecto superficial dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT, respectivamente. É possível observar uma morfologia superficial homogênea nas aletas dos bráquetes de todos os grupos. Por outro lado, a figura 3 mostra a presença de partículas de variados tamanhos na canaleta do bráquete com filme fino de fosfato de cálcio, o que não ocorre nos grupos SR e TIT.

A análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios X ratificou a presença de cálcio (Ca) e de fósforo (P) na superfície dos bráquetes do grupo FOS e de titânio (Ti) na superfície dos bráquetes do grupo TIT. Os espectros dos elementos ferro, cromo, carbono, manganês, níquel e silício estão presentes em todas as avaliações por identificarem os elementos químicos constituintes do bráquete. (Tabela 1)

### *Biomassa total por coloração com cristal violeta*

A avaliação do controle branco demonstrou ausência de contaminação das amostras, com estabilidade dos valores observados no tempo de avaliação. O coeficiente de correlação intraclasse foi considerado satisfatório (ICC=0,667, com IC 95%,  $p=0,085$ ).

Os resultados deste estudo mostraram que o tipo de revestimento não exerceu influência no perfil de formação do biofilme de *S. mutans* nos diferentes grupos após 24 horas de incubação ( $p=0,06$ ), conforme a figura 4.

## **DISCUSSÃO**

A associação de bactérias acidogênicas e presença de açúcar é um evento essencial para ocorrer a desmineralização do esmalte. Na ausência de higiene bucal adequada, a presença do aparelho ortodôntico aumenta o número de sítios retentivos, dificulta a limpeza adequada e pode favorecer a adesão microbiana. Uma vez ocorrida a adesão, a proliferação celular pode levar ao desenvolvimento do biofilme patogênico, que é a principal causa da lesão de mancha branca. Este trabalho buscou avaliar a influência da deposição de filmes finos na morfologia superficial e na adesão microbiana sobre bráquetes metálicos. A redução da adesão significaria uma forma de prevenção primária da cárie em pacientes ortodônticos.

A pulverização catódica alterou a coloração dos bráquetes metálicos. Trata-se de uma modificação inerente à técnica de deposição física, também relatada por outros autores.<sup>18,9</sup> Como a percepção estética do aparelho ortodôntico parece estar atrelada à quantidade de metal exposto<sup>19,20</sup>, o escurecimento dos bráquetes é um dado importante. Cao et al.<sup>21</sup> optaram pela deposição por molhamento sol-gel em bráquetes estéticos para evitar o escurecimento esperado na pulverização catódica. O revestimento inibiu a formação de colônias, porém foram necessárias cinco camadas de filme. Revestimentos compostos por várias camadas tendem a apresentar menor adesão ao substrato. Apesar do prejuízo estético, a deposição por gaiola de plasma permite a formação de um filme fino com apenas uma única camada.

A uniformidade superficial dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura em duas regiões distintas (aleta e



canaleta). Houve equivalência no aspecto superficial dos três grupos na região da aleta e partículas foram observadas na canaleta do grupo FOS.

Enquanto as aletas dos bráquetes servem para conter o fio ortodôntico através de ligaduras metálicas ou elastoméricas, a região da canaleta tem fundamental importância na movimentação ortodôntica do dente. A presença de irregularidades na canaleta poderia influenciar no coeficiente friccional desta região, comprometendo a mecânica de deslize.<sup>22</sup>

É importante ressaltar que o MEV gera imagens bidimensionais e a avaliação da rugosidade da canaleta do bráquete deve ser realizada quantitativamente de maneira tridimensional.<sup>22</sup> A avaliação quantitativa da rugosidade da região da canaleta assim como sua relação com os resultados qualitativos obtidos no MEV para o grupo FOS deve ser foco de novos estudos.

A presença de partículas pode ser correlacionada com uma menor cristalinidade no filme de fosfato de cálcio depositado. Ao analisar diversos revestimentos de fosfato de cálcio, Arayna et al.<sup>17</sup> observaram que a atividade antibacteriana encontrada foi inversamente proporcional ao grau de cristalinidade. Uma maior cristalinidade tende a uma menor taxa de dissolução e conseqüentemente menor efeito dos íons na população bacteriana.

O fosfato de cálcio necessita ser solubilizado para que possa exercer seu efeito remineralizante no esmalte dentário.<sup>23</sup> Contudo, ainda é incerto o grau de solubilidade necessária para que um revestimento de fosfato de cálcio consiga atuar na remineralização dentária sem, no entanto, comprometer a integridade superficial do revestimento. Os efeitos a longo prazo de recobrimentos em biomateriais odontológicos ainda são questionáveis. É incerta a manutenção das propriedades mecânicas ao longo do tempo e a liberação gradual poderia acarretar em perda de material, com conseqüente aumento da rugosidade e da retenção bacteriana.<sup>24</sup>

A presença de enxofre (S) e prata (Ag) foi constatada em todos os grupos pelo EDS. O enxofre é utilizado para elevar o limite de escoamento e a usinabilidade do aço, enquanto a presença de prata corresponde ao processo de soldagem da manufatura do bráquete. O titânio presente no grupo FOS é proveniente da gaiola de titânio utilizada para a deposição do recobrimento.

Neste trabalho, o material exposto na superfície do bráquete não mostrou influência sobre a densidade de biofilme acumulado. Os resultados estão em conformidade com Brusca et al.<sup>25</sup> e Papaioannou et al.<sup>26</sup>, e opostos aos reportados

por Rammohan et al.<sup>27</sup> e, quando compararam o padrão de adesão e crescimento de *S. mutans* na superfície de bráquetes metálicos, cerâmicos e plásticos.

Entretanto, Papaioannou et al.<sup>26</sup> avaliaram os bráquetes na presença da película salivar. Os autores ressaltaram o importante papel da película salivar que teria a capacidade de reduzir quaisquer diferenças nas características da superfície cariogênica (energia livre da superfície). A camada de proteína salivar adsorvida pode influenciar positivamente (pela presença de receptores específicos) ou negativamente (ao diminuir a energia livre de superfície dos materiais adjacentes) a adesão bacteriana.<sup>28,29</sup> Na colonização inicial, o efeito é positivo pois os receptores da película salivar interagem com a superfície dos microorganismos pioneiros.<sup>30</sup> Ao avaliar bráquetes não revestidos de película salivar, apenas as propriedades das superfícies dos materiais podem influenciar na adesão bacteriana.<sup>28</sup> Assim, outros fatores de influência na formação do biofilme, como a rugosidade e a energia livre de superfície devem ser investigados.

Alguns pontos podem ter influenciado os resultados obtidos e devem ser relatados: embora amplamente utilizada, a coloração com cristal violeta é inespecífica e não permite a avaliação da viabilidade celular. Além disso, os biofilmes avaliados neste estudo são monoespecíficos e certamente não refletem fielmente a realidade da microbiota oral, porém permitem analisar a capacidade de dois filmes finos com características distintas em interferir nas propriedades de adesão e formação de biofilme de *S. mutans* aos bráquetes. Embora tenha-se buscado mimetizar o que ocorre na cavidade bucal, estudos *in vitro* não podem prever completamente o comportamento dos materiais dado as limitações do laboratório e incapacidade de reproduzir todos os fatores encontrados intraoralmente.

Dentre os diversos métodos de recobrimentos em metais, a deposição a plasma por gaiola catódica foi escolhida. Trata-se de um método inovador desenvolvido em 2007, cuja utilização em escala industrial ainda está em fase de implantação. Apesar da técnica apresentar como vantagem a formação de uma película mais uniforme e fina, inclusive em substratos com geometria complexa, estudos adicionais e maior caracterização dos filmes formados também se fazem necessários.

## CONCLUSÃO

Os filmes finos de fosfato de cálcio e nitreto de titânio não interferiram na adesão de *S. mutans* à superfície dos bráquetes e a presença do filme fino de fosfato de cálcio alterou a superfície da canaleta, enquanto os revestimentos de nitreto de titânio e fosfato de cálcio não modificaram a morfologia superficial das aletas dos bráquetes metálicos.

## REFERÊNCIAS

1. JULIEN KC, BUSCHANG PH, CAMPBELL PM. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2013; 83(4):641-7.
2. GUZMAN-ARMSTRONG S, CHALMERS J, WARREN JJ. White spot lesions: prevention and treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010; 138(6):690-6.
3. CURY JA et al. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? *Dent Mater.* 2016; 32(3): 323-33.
4. KIRSCHNECK C et al. Efficacy of fluoride varnish for preventing white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment with fixed appliances: a prospective randomized controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(9):2371-8.
5. FERNÁNDEZ-FERRER L et al. Enamel remineralization therapies for treating postorthodontic white-spot lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2018; 149(9):778-86.
6. HÖCHLI D et al. Interventions for orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod.* 2017; 39(2):122-33.
7. AHN SJ et al. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009; 25(2):206-13.
8. ROSARIO JR AF et al. Differential adhesion of *Streptococcus mutans* to metallic brackets induced by saliva from caries-free and caries-active individuals. *J Investig Clin Dent.* 2011; 2(3):197-200.
9. SHAH AG et al. *In vitro* assessment of photocatalytic titanium oxide surface modified stainless steel orthodontic brackets for antiadherent and antibacterial properties against *Lactobacillus acidophilus*. *Angle Orthod.* 2011; 81(6):1028-35.
10. JABBARI YSA et al. Titanium nitride and nitrogen ion implanted coated dental materials. *Coatings.* 2012; 2(3):160-78.
11. GRÖSSNERSCHREIBER B et al. Plaque formation on surface modified dental implants: an *in vitro* study. *Clin Oral Implant Res.* 2001; 12(6):543-51.
12. SCARANO A et al. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an *in vivo* human study. *J Oral Implant.* 2003; 29(2):80–5.

13. ANNUNZIATA M et al. The effects of titanium nitride-coating on the topographic and biological features of TPS implant surfaces. *J Dent.* 2011; 39(11):720–8.
14. JEYACHANDRAN YL, NARAYANDASS SK. The effect of thickness of titanium nitride coatings on bacterial adhesion. *Trends Biomater Artif Organs.* 2010; 24(2):90-3.
15. SKRTIC D, ANTONUCCI JM, EANES ED. Amorphous calcium phosphate-based bioactive polymeric composites for mineralized tissue regeneration. *J Res Natl Inst Stand Technol.* 2003; 108(3):167–82.
16. PASCHOS E et al. Efficacy of four preventive measures against enamel demineralization at the bracket periphery: comparison of microhardness and confocal laser microscopy. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(6):1355-66.
17. ARANYA AK et al. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105(8):2218–27.
18. CAO B et al. Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO(2-x)N(y) thin film and examination of its antimicrobial performance. *Dent Mater J.* 2013; 32(2):311-6.
19. FEU D et al. Esthetic perception and economic value of orthodontic appliances by lay Brazilian adults. *Dental Press J Orthod.* 2012; 17(5):102-14.
20. ROSVALL MD et al. Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Ortho.* 2009; 135(3):276.e1-12.
21. CAO S et al. Preparation and antimicrobial assay of ceramic brackets coated with TiO<sub>2</sub> thin films. *Korean J Orthod.* 2016; 46(3):146-54.
22. ASSAD-LOSS T, NEVES RML, MUCHA JN. Composição química e aspecto superficial do slot de bráquetes metálicos. *Rev Dent Press Ortodon Ortop Facial.* 2008; 13(3):85-96.
23. UYSAL T et al. Effects of different topical agents on enamel demineralization around orthodontic brackets: an *in vivo* and *in vitro* study. *Aust Dent J.* 2010; 55(3):268-74.
24. ØILO M, BAKKEN V. Biofilm and Dental Biomaterials. *Materials (Basel).* 2015; 8(6):2887-900.
25. BRUSCA MI et al. Influence of diferente orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. *Angle Orthod.* 2007; 77(2):331-6.
26. PAPAIOANNOU W et al. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007; 77(6):1090-5.
27. RAMMOHAN SN et al. Adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* to different bracket materials. *J Pharm Bioapplied Sci.* 2012; 4(2):212-6.
28. AHN SJ et al. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod.* 2005; 75(1):666-71.
29. AHN SJ et al. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun.* 2008; 76(9):4259–68.
30. LI F et al. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model. *Dent Mater.* 2014 30(2):182-91.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto visual dos bráquetes dos grupos SR, FOS e TIT após a deposição dos filmes finos correspondentes via gaiola catódica (quando aplicado).



Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura da aleta dos grupos SR, FOS e TIT respectivamente, com aumento de 1000x.

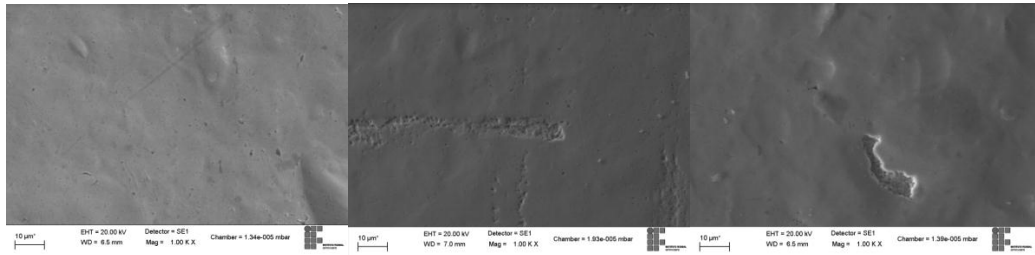


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura da canaleta do grupo FOS, com aumento de 1000x.

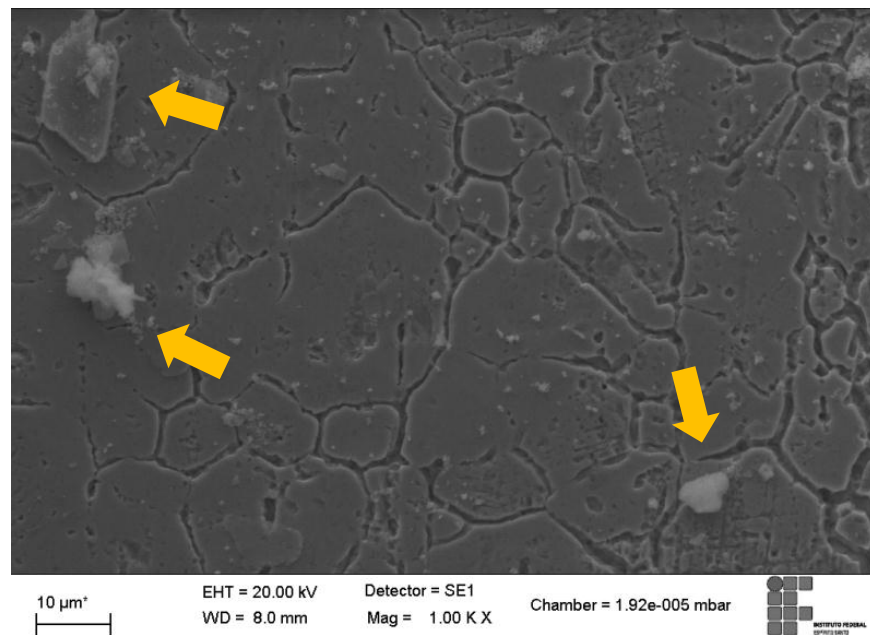
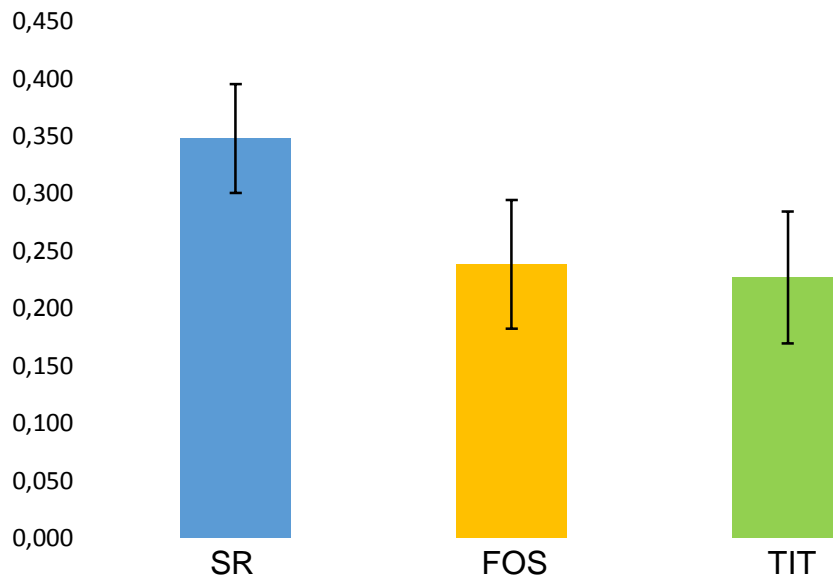


Figura 4 - Densidade óptica média obtida para cada grupo na presença de *S. mutans*, após 24 horas de incubação.



As barras correspondem à densidade óptica média obtida pelos grupos MAT (azul), FOS (laranja) e TIT (verde) na avaliação após 24 horas. As barras de erros representam o desvio padrão das médias. ANOVA 1-fator ( $p=0,06$ ).

Tabela 1 - Composição e concentração dos elementos químicos presentes nos bráquetes dos diferentes grupos de acordo com a análise de EDS.

Elementos químicos	Porcentagem atômica (%)		
	MAT	FOS	TIT
Fe	59,7	54,8	43,7
O	0,5	5,6	12,8
Cr	16,1	15,4	12,2
Ni	7	6,9	6,2
C	7,8	10,5	8,9
Cu	1,8	1,8	1,6
Mn	1,5	1,4	1,3
Si	1,5	1,1	6,7
S	0,2	0,2	0,2
Ti		0,9	2,3
Ca		0,2	
P		0,2	
Ag	3,9	1,0	4,1

## ANEXO

## ANEXO A - NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA THE ANGLE ORTHODONTIST

### Information for Contributors

---

The Angle Orthodontist is the official publication of the Edward H Angle Society of Orthodontists. The EH Angle Education and Research Foundation, Inc. retains the copyright to all materials published in the journal. As an open access journal, we do not charge readers or their institutions for access. The Foundation invites users to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the articles published in The Angle Orthodontist, provided all use is for non-commercial purposes and proper attribution is made to the source as being "The Angle Orthodontist".

Please be aware that *The Angle Orthodontist* participates in the CrossCheck™ initiative and that all submissions are subject to screening with iThenticate software to detect plagiarism.

**Please organize and enter your Original Article manuscript using the following headings** (Case reports and other types of articles may vary):

**COVER LETTER** - Must contain the following:

**Copyright Releases** - The following written statement, signed by one of the authors and acting on behalf of all of the authors, must accompany all manuscripts:

"The undersigned author transfers all copyright ownership of the manuscript (fill in the title of your manuscript) to *The Angle Orthodontist* in the event the work is published. The undersigned author warrants that the article is original, is not under consideration for publication by another journal and has not been previously published. I sign for and accept responsibility for releasing this material on behalf of *any* and all coauthors."

Direct quotations, tables or images that have appeared elsewhere in copyrighted material must be accompanied by a signed release from the copyright owner. Complete information identifying the source of the material is required.

**Patient Releases** - A signed release must be obtained for all images that contain identifiable patients or human subjects. These releases must be retained indefinitely by the Corresponding Author. A cover letter must be submitted with the manuscript attesting to the fact that all applicable patient releases were obtained and are on file with the Corresponding Author.

Each release statement must be on a separate page, include the manuscript title, all authors' names and contain a copy of the following statement signed by the patient:

"I hereby grant all rights to publish photographs or other images of me in the above manuscript where I appear as a patient or subject without payment of any kind. I have been informed that any images of me that do appear may be modified."

- **ARTICLE FILE**

Articles must be original and written in clear English. The total article file must be entered as one document and must contain the Title, Abstract, Text References and Figure Legends. The article file must not exceed a maximum of 3500 words. To determine the number of words in your document, go to the toolbar, click on tools and then click on word count.

For Systematic Reviews, use the PRISMA statement for uniformity in reporting format: (<http://www.prisma-statement.org/2.1.2%20-%20PRISMA%202009%20Checklist.pdf>). Follow the proposed structure and subheadings whenever possible. The article file for systematic reviews must not exceed a maximum of 4000 words.

For Letters to the Editor, the article file must not exceed a maximum of 250 words.

**Please enter only the following items in the article file:**

- **Title** of the manuscript
- **Abstract** - *The Angle Orthodontist* is using a structured abstract which must be limited to 250 words. The abstract should conform to the following outline and not contain an introduction, literature review or discussion.

#### **ABSTRACT**

**Objective:** List the specific goal(s) of the research.

**Materials and Methods:** Briefly describe the procedures you used to accomplish this work. Leave the small details for the manuscript itself.

**Results:** Identify the results that were found as a result of this study.

**Conclusion:** List the specific conclusion(s) that can be drawn based on the results of this study.

- **Manuscript text** - Please remove all references to the author's identity or institutions as manuscripts are peer reviewed anonymously. An original article text will contain the following in order:

*INTRODUCTION* - This section states the purpose of the research and includes a brief summary of the literature describing the current state of the field.

*MATERIALS AND METHODS* - This section states exactly what was done and should enable a reader to replicate the work. Materials or methods described elsewhere in the literature can be referenced without repeating these details. Identify teeth using the full name of the tooth or the FDI annotation. If human subjects or animals were involved in the work, this section must contain a statement that the rights of the human or animal subjects were protected and approval was obtained from an identified institutional review board, or its equivalent.

*RESULTS* - This section should describe the objective findings without any comment on their significance or relative importance. Cite all tables and figures in sequential order in the text.

*DISCUSSION* - Only this section allows you freedom to interpret your data and to give your opinion of the value of your findings relative to previous work. All opinions must be limited to this section.

*CONCLUSION* - This section states what conclusions can be drawn specifically from the research reported. Bullet points are preferred. Do not repeat material from other sections..

*REFERENCES* - References cited must refer to published material. Number references consecutively in order of their appearance in the manuscript using superscript and Arabic numerals. References to "personal communication" or unpublished theses are not acceptable. The style and punctuation of references should strictly conform to *American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors*, 9th ed (Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1998). Consult previous issues of *The Angle Orthodontist* for guidance (Available at <http://www.angle.org> ).

*FIGURE LEGENDS* - All figures must be numbered sequentially in the manuscript and a legend for each figure must appear in this section.

- **TABLE FILES**

Each table must be in WORD or EXCEL format and entered as a separate file. Each table must have its own legend accompanying it, numbered with Arabic numerals and sequentially referred to in the text. All abbreviations used in the table must be defined in a footnote. Use \*  $P=0.05$ ; \*\*  $P=0.01$ ; \*\*\*  $P=0.001$ ; \*\*\*\*  $P=0.0001$  as needed. Tables cannot be in pictorial or image formats. Pictorial or image formats are figures and must be entered as figures.

- **FIGURE FILES**

Each figure must be of sufficient resolution for high quality publication usually in TIFF or EPS format. All images need to be at 300 DPI when the figure is of the size to be used in publication.



If you enter a large image at 300 DPI and reduce it to a much smaller size for publication, this will increase the DPI and the image will be very heavy and slow to open electronically. If you enter a small image (such as a 35 mm picture) and plan to enlarge it for publication, it needs to be entered at more than 300 DPI since enlargement will only reduce the resolution.

Figures in WORD or presentation software such as PowerPoint, Corel Draw or Harvard Graphics do not contain sufficient resolution for publication and will not be accepted. Authors will be charged for publication of figures in color.

- **ACKNOWLEDGEMENTS**

If this research was funded or supported by a commercial firm or other outside entities, please provide their name and location. If an author(s) receives funding or support from a commercial firm or other outside entity related to this research, it also should be revealed here.

**Manuscript Review**

After you have entered your manuscript, you will receive automated responses from the system as the manuscript is processed. You may also follow the progress of your manuscript via the web site and your own password you created when you first entered the system.

Your manuscript will be peer reviewed and the reviewers' comments will be sent to you. Please allow adequate time for this process. Our automated system is instantaneous, but the reviewers are busy people who donate their expertise and time.

A manuscript returned to an author with suggested revisions must be returned within 3 months. Revised manuscripts returned after this time will be considered new submissions.

After the revisions are complete, the editor will submit the manuscript to the printer and an electronic copy of your galley proof will be sent to you for corrections and final approval. Expect the figures in the galley proof to be of low resolution for ease of transmission. The final publication will contain your high quality figures.

**Reprints**

The Angle Orthodontist does not provide a publisher's reprint service. All articles remain the copyrighted property of the E.H. Angle Education and Research Foundation. For non-commercial educational purposes, authors may print an unlimited number of copies of a paper and reproduce any text, figures, or tables for re-publication as long as they cite the source as The Angle Orthodontist. For commercial use, authors should contact the Copyright Clearance Center ([www.copyright.com](http://www.copyright.com)) to pay the appropriate fee to reprint copies or use any part of the text, figures, or tables from any published material.

**General Information**

The E. H. Angle Education and Research Foundation invites manuscripts concerning the dental and craniofacial complex. Original research, clinical observations and review articles as well as guest editorials, letters to the editor and case reports are welcome.

The Angle Orthodontist is supported by the EH Angle Education and Research Foundation and does not charge processing or submission fees.

Articles are peer reviewed through a double-blind process and are subject to editorial revision. Statements and opinions expressed in articles are not necessarily those of the editor or publisher. The editor and the publisher disclaim any responsibility or liability for such material.

*The Angle Orthodontist* is now ONLINE for all manuscript submissions and review. Please go to the Internet: <http://angle.allentrack.net/> and follow the easy instructions for manuscript submission. If you have questions regarding the submission of your manuscript, please e-mail those questions to [<1drwoman54@sbcglobal.net>](mailto:1drwoman54@sbcglobal.net).