



1290005386

TCE/UNICAMP
F951f
FOP

SUZANA BEATRIZ PORTUGAL DE FÚCIO

FATORES DETERMINANTES DA INTERAÇÃO ENTRE OS MATERIAIS RESTAURADORES E O BIOFILME DENTÁRIO

**Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como requisito para
obtenção de Título de Especialista em
Odontopediatria.**

Orientadora: Profa. Dra. Regina M. Puppim Rontani

PIRACICABA

2004

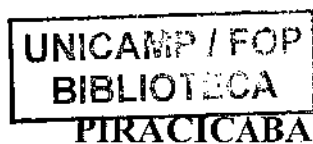
SUZANA BEATRIZ PORTUGAL DE FÚCIO

FATORES DETERMINANTES DA INTERAÇÃO ENTRE OS MATERIAIS RESTAURADORES E O BIOFILME DENTÁRIO

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção de Título de Especialista em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Regina M. Puppim Rontani

371



2004

Unidade FOP/UNICAMP	
N. Chamada	F951f
.....	
Vol.	Ex.
Tombo BC/	

Unidade - FOP/UNICAMP

TCE/UNICAMP

F951f

Vol. Ex.

Tombo 5386

C ☐ D ☒

Proc. 36D-330/3031

Preço R\$ 11,00

Data 06/01/11

Região 778487

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

F951f Fúcio, Suzana Beatriz Portugal de.
Fatores determinantes da interação entre os materiais restauradores e o biofilme dentário. / Suzana Beatriz Portugal de Fúcio. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
61f.

Orientador: Regina Maria Puppín-Rontani.
Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Odontopediatria. 2. Materiais dentários. 3. Biofilme. I. Puppín-Rontani, Regina Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe, ALICE, essência do amor e do conforto, que soube me mostrar o orgulho de se crescer como pessoa, estudante e profissional.

Ao meu pai, NELSON, exemplo de persistência e luta para a realização dos meus projetos de vida.

Ao meu padrasto EDSON, pela preocupação com minha batalha diária e minhas conquistas.

À minha filha, SARAH, que, ainda com pouca idade, aprendeu a lidar com meus dias ausentes e a compreender que a distância não afasta nossos corações.

Aos meus irmãos, SIMONE, THIAGO, LUCAS, que me apoiaram nesta caminhada e me confortaram nos momentos de desânimo e cansaço.

Ao meu namorado, KLEBER, pelo companheirismo com minhas emoções e pelo incentivo à busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Á Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI, pelo sentido verdadeiro da palavra orientação, pelo incentivo, engrandecimento e amizade dispensados a mim, meu sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. TALES THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, e seu Diretor Associado Prof. Dr. MÁRIO FERNANDO DE GÓES.

À Coordenadora do Curso de Especialização em Odontopediatria, MARINÊS NOBRE DOS SANTOS UCHÔA, pela dedicação à turma e ao curso.

Ao Departamento de Odontologia Infantil, Área de Odontopediatria e às professoras Profa. Dra. CECÍLIA GATTI GUIRADO e Profa. Dra. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIÃO, pelo acolhimento e agradável convivência nestes meses.

Às alunas do Curso de Especialização em Odontopediatria, EVELYN ALVAREZ VIDIGAL, FABÍOLA PEDRÃO FARHA, GLÁUCIA REGINA DA SILVA, NURY TERESA VALDEZ QUISPE, RAFAELLA DE CASTRO CANELLA, RENATA HIDEKO OYAMA, RENATA VALVANO CEREZETTI, SABRINA FERNANDES E TACIANA CAMARGO P. COSTA, pela amizade e convivência durante o curso.

À HELOÍSA MARIA CECCOTTI, pela orientação nas normas desta monografia.

Aos meus professores da Disciplina de Odontopediatria durante minha Graduação, RENATO CORDEIRO GUGISH E FABIAN CALIXTO FRAIZ, pelos ensinamentos que despertaram meu interesse para este campo de trabalho.

Aos professores da Graduação da Disciplina de Materiais Dentários I e II, JOEL BLEY SOBRINHO, JOÃO LUIZ NEVES PEREIRA, VÂNIA SUELY MARIA E IVANA FROEDE NEIVA, pelas informações dispensadas relacionadas ao tema desta monografia.

"O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele. Destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto."

Thomas Huxley

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 BIOFILME X ESTRUTURAS BUCAIS	12
2.2 BIOFILME X MATERIAIS DENTÁRIOS	30
3. DISCUSSÃO	60
4. CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	83

RESUMO

O biofilme dentário, conhecido por placa bacteriana, corresponde a uma comunidade microbiana complexa composta por uma grande diversidade de espécies bacterianas interagindo especificamente entre elas e com componentes do hospedeiro, produtoras de polissacarídeos extracelulares e capazes de adesão às superfícies dentárias e restauradoras. Através de revisão de literatura, buscou-se compreender as interações entre o biofilme e os materiais dentários e os fatores relevantes destes substratos à adesão e composição do biofilme. Observou-se que existe um conjunto de características físicas e químicas superficiais dos materiais interferindo nesta inter-relação, além da localização intra-bucal em que estão presentes, e de características microbiológicas, tais como propriedades de superfície e capacidade de produção de polissacarídeos extracelulares. A patogenicidade do biofilme dental pode ser reduzida pelas propriedades antibacterianas presentes em alguns materiais dentários, através da liberação de íons que interferem no metabolismo dos microorganismos, como mercúrio, prata, flúor, cobre, alumínio, entre outros. Contudo, os materiais restauradores também podem ser afetados pelos produtos do metabolismo bacteriano, como o ácido láctico, capaz de produzir defeitos de superfície nos substratos adjacentes. Portanto, deve-se fazer a seleção criteriosa do material a ser utilizado clinicamente, levando-se em consideração o risco à cárie do indivíduo e as propriedades de superfície e antibacterianas do material restaurador.

ABSTRACT

The dental biofilm, also called dental plaque, correspond to a complex microbial community composed by a large diversity of bacterial species interacting specifically among themselves and with host components, producing extracellular polysaccharide, capable to adhere to dental and restorative surfaces. Through literature review, the purpose of this study was to understand the interactions between dental biofilm and dental materials and its relevant factors to the adhesion and composition of that biofilm. It was found that there are some physical and chemical surface material characteristics that could influence on the interrelation between biofilm and material surface. The dental biofilm pathogenicity could be reduced by antibacterial properties from several dental materials. Those properties are capable to interfere at the bacterial metabolism by the ion release, like mercury, silver, fluoride, copper, aluminum, among others. However, restorative materials can also be affected by the bacterial metabolites, as lactic acid, wich can produce surface defects on the adjacent substrate. So, it must be done a criterious selection of the material used at the practice, regarding the individual caries risk and the surface properties and antibacterial properties of the restorative material.

1. INTRODUÇÃO

O biofilme dentário, estrutura conhecida por placa bacteriana, encontra-se permanentemente na cavidade bucal, adjacente aos tecidos dentários e aos variados substratos utilizados nos tratamentos reabilitadores. Apesar de o biofilme apresentar mecanismos de desenvolvimento e morfologia semelhantes sobre as diferenças estruturas intra-bucais (Eastcott & Stallard, 1973; Saxton, 1973; Marsh & Martin, 1992; Listgarten, 1994; Jorge, 1995; Marsh & Bradshaw, 1995; Haake, 1997; Wood *et al.*, 2000), sua composição e adesão variam de acordo com as características físicas e químicas do substrato (Weitman & Eames, 1975; Jendresen & Glantz, 1981; Smales, 1981; Dummer & Harrison, 1982; Tullberg, 1986; Christensen & Bangerter, 1987; Satou *et al.*, 1988; Quirynen *et al.*, 1990; Satou *et al.*, 1991; Quirynen & Bollen, 1995; Nassar *et al.*, 1995; Suljak *et al.*, Shahal *et al.*, 1998; Bradshaw *et al.*, 2001; Carlén *et al.*, 2001; Steinberg & Eyal, 2002).

Torna-se interessante, portanto, compreender ambos os participantes desta interação a fim de se concluir as influências que um pode promover sobre o outro. A partir do conhecimento das etapas de formação do biofilme (Marsh & Bradshaw, 1995), das interações específicas entre variados microrganismos (Cisar *et al.*, 1997), dos mecanismos de adesão bacteriana e seu metabolismo (Borgström *et al.*, 2000, O'Toole *et al.*, 2000), entende-se a importância em controlar a deposição do biofilme sobre os dentes e materiais, já que tais estruturas podem ser prejudicadas pelos metabólitos do biofilme (Dérand & Johansson, 1983; Palaghias, 1986; Willershausen *et al.*, 1999; Fano *et al.*, 2001; Sales *et al.*, 2002; Biofilmes..., 2004).

Em contrapartida, alguns materiais restauradores possuem propriedades de superfície e componentes químicos que os favorecem contra a patogenicidade do biofilme (Dummer & Harisson, 1982; Orstavik, 1985; Wallman-Björklund *et al.*, 1987; Svanberg *et al.*, 1990; Lyttle & Bowden, 1993; Netuschil *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2000; Hayacibara *et al.*, 2003). Isto representaria fator importantíssimo na seleção clínica do tipo de material a ser utilizado, considerando especialmente o nível de higiene bucal e a qualidade da dieta alimentar do paciente, os quais promoveriam um biofilme de maior ou menor potencial patogênico.

Logo, a revisão de literatura realizada neste estudo busca aproximar as informações obtidas a respeito do biofilme dentário desenvolvido sobre estruturas dentárias e materiais odontológicos preventivos / restauradores, a fim de compreender as interações presentes entre eles, auxiliar os cirurgiões-dentistas na seleção do material adequado em

diferentes situações clínicas e despertar o interesse para futuras pesquisas específicas sobre as interações citadas e suas consequências.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo foi subdividido em dois tópicos a fim de que promovesse uma leitura facilitada aos interessados no tema proposto.

2.1 BIOFILME X ESTRUTURAS BUCAIS

Em 1969, Krembel *et al.* realizaram uma pesquisa a fim de testar diferentes procedimentos bioquímicos utilizados no fracionamento do biofilme e checar a pureza das frações obtidas, celular e acelular, através de observações feitas sob Microscopia Eletrônica. Biofilmes dentários de pacientes previamente selecionados foram coletados com espátula de aço inoxidável, no período da manhã, na ausência de higiene bucal e alimentação. Os autores verificaram uma ultraestrutura finamente granular, livre de bactérias, sendo considerada acelular. Opostamente, os sedimentos obtidos eram compostos de um grande número de microrganismos e ocasionalmente células epiteliais queratinizadas. As análises bioquímicas mostraram lipídios livres em 26% a 30% e proteínas em menores valores (6,7% a 7%) no conteúdo acelular. Na fração celular, foram encontradas proteínas mais frequentemente (40% a 70%). Os carboidratos apresentaram-se na porção acelular na porcentagem de 31% a 41%. O cálcio mostrou-se três vezes e o fósforo duas vezes mais freqüente na fração acelular. Os autores concluíram que o uso combinado da Microscopia Eletrônica com as investigações bioquímicas permitiu um fracionamento aceitável dos componentes celulares e acelulares do biofilme dentário humano.

Eastcott & Stallard, em 1973, delinearam um estudo com o objetivo de acompanhar a formação do biofilme dentário sobre um carreador poroso adaptado na boca humana, usando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Seguidamente à escovação, foi permitido que o biofilme se depositasse naturalmente por intervalos pré-determinados de 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 e 48 horas, com ausência de higiene bucal. Os autores observaram que a formação do biofilme se iniciou em duas horas, pela colonização da película fenestrada por cocos do meio bucal. Esses microrganismos estavam situados em nichos da superfície e encontravam-se completamente cobertos por uma camada homogênea, quando no intervalo de três horas. Entretanto, quando entre seis e doze horas, esse material de cobertura teve sua espessura reduzida e sofreu alterações no seu aspecto para granular e descontínuo. Também se notou uma evolução de colônias bacterianas no decorrer do tempo. Até 24 horas, cocos em intensa multiplicação mostraram-se predominantes. Em seguida, bastonetes apareceram. A visualização de filamentosas, quando 48 horas, indicou a maturação deste biofilme.

Também em 1973, Saxton investigou o desenvolvimento do biofilme *in vivo* durante as 24 horas iniciais de sua formação, através de MEV, analisando réplicas da superfície dentária em determinados intervalos de tempo. O autor selecionou voluntários, cuja metade da superfície vestibular dos incisivos centrais superiores foi coberta por fita isolante por uma hora para exposição aos fluidos bucais. A formação da película adquirida foi demonstrada por réplicas. A composição dos depósitos foi determinada em duas situações: a primeira consistiu da coleta da placa com a aplicação do cianocrilato três horas após a profilaxia, enquanto, na segunda situação, realizou-se a administração de bochechos com gluconato de clorexidina duas vezes ao dia durante três dias e realização das réplicas em período de exame estendido para 96 horas. Os autores observaram que, exposto ao meio bucal, o esmalte dentário foi coberto rapidamente (uma hora) por um filme amorfo, conhecido como película adquirida, e um material globular foi detectado na porção próxima à gengiva dos voluntários que apresentavam algum grau de inflamação local, num intervalo variável de cinco minutos a três horas. A constante exposição provocou um aumento em número e tamanho desses glóbulos, com tendência a se coalescerem e formarem uma camada ondulante e contínua, reconhecida como placa, dentro de um período também muito variável. Após 24 horas, pequenas colônias de microrganismos foram visualizadas, além de um completo preenchimento das irregularidades do esmalte por material orgânico e bactérias. O estudo dos glóbulos revelou a presença de grumos de bactérias envoltos por um material fino e granular, inclusive células em processo de divisão. Na segunda situação, a natureza bacteriana dos glóbulos foi confirmada pelo efeito inibitório da clorexidina, em que se verificou a ausência destas estruturas até 72 horas e um acúmulo de microrganismos mais lento. Portanto, os autores observaram que a formação do biofilme dentário foi um processo dinâmico e complexo dependente de variados fatores, iniciado pela aderência de agregados bacterianos à superfície dentária adjacente à margem gengival, e continuada pelo crescimento de microrganismos isolados, agregados e aderidos aos defeitos do esmalte.

De acordo com Mayhall, em 1984, a película adquirida é definida como uma cobertura encontrada em todas as superfícies do esmalte, acelular, amorfa, sem bactérias, de origem salivar e aparentemente incolor, normalmente com tonalidade levemente acastanhada. A palavra “película” significa “pele muito fina ou filme” que, segundo o autor, ocorre como única capa do esmalte, ou então, subjacente à placa dental, matéria alba ou resto alimentar. A película adquirida contém proteínas, carboidratos e lipídios, além de aminoácidos da parede da célula bacteriana e, predominantemente, aminoácidos acídicos, atribuindo à película uma capacidade de adesão à superfície do esmalte. A função da película é formar um meio

lubrificante entre superfícies opostas de esmalte. Além disso, há evidências de que também possa agir como uma barreira à difusão da desmineralização ácida provocada pela cárie, como um reservatório de flúor devido a sua capacidade de se ligar organicamente a este íon e como depósito mineral auxiliar no processo de remineralização ou na formação inicial do cálculo dentário. Já o biofilme dentário é definido como uma massa mole, concentrada e aderente, constituída por microrganismos embebidos em matriz intercelular de origem principalmente microbiana, e considerada como agente etiológico da cárie. Além dessas citadas, o autor inclui entre as películas adquiridas os restos alimentares, isto é, detritos removidos com lavagem, antiestéticos e contribuintes ao mau hálito, mas não causadores de cárie, e a matéria alba, definida como uma mistura mole, branca, constituída por bactérias, componentes salivares, células epiteliais descamadas e leucócitos em desintegração, com fraca aderência à superfície dos dentes, biofilme dentário ou gengiva. Esta estrutura possui menos microrganismos vivos que o biofilme, ausência de arquitetura específica e pouca ou nenhuma participação no processo de cárie.

A pesquisa de Christensen & Bangerter (1987) teve como interesse o registro das condições *in vivo* do esmalte e da dentina, antes e imediatamente após o polimento. Réplicas foram visualizadas em MEV e a perda de tecidos dentários com o polimento foi mensurada por técnicas de avaliação do fosfato e medidas estereoscópicas. Este experimento foi dividido em duas fases: uma avaliação de áreas não-padronizadas polidas em consultórios particulares por diferentes clínicos e um teste *in vivo*, no qual um clínico realizou o polimento do esmalte e da dentina com ângulo especial e rotações por minuto, tempo e carga regulados por computador. Os autores observaram na primeira fase, através de fotografias com 200 vezes de aumento, a presença de riscos mais numerosos e organizados em um padrão semi-circular no terço cervical do esmalte. Já na dentina, verificou-se riscos regulares, paralelos, grossos e em padrão semi-circular cobrindo toda a área radicular tratada exposta, além de cavidades causadas pelo contato das bordas da taça-de-borracha com a superfície num ângulo menor que 90°. Na fase de polimento controlado, verificou-se menor perda de estrutura dentária (esmalte e dentina) com a utilização da água (controle) do que com qualquer um dos abrasivos. Houve maior remoção de dentina que esmalte. As análises mostraram que a pedra-pomes removeu significativamente mais dentina, entretanto não houve diferença estatística entre os abrasivos quanto à remoção de esmalte. Em longo prazo, as fotografias mostraram uma redução dos riscos do polimento entre 21 e 39 dias, sendo que estes não causaram um tipo de rugosidade de superfície que promovesse um maior acúmulo de depósitos durante o intervalo avaliado.

Portanto, os autores concluíram que a realização de uma técnica de polimento cuidadosa promoveu mínimos prejuízos *in vivo*.

Quirynen *et al.* (1990) propuseram um estudo clínico para a exploração do efeito "relativo" da Energia Livre de Superfície (E_{sup}) e da Rugosidade de Superfície (R_a), separadamente ou de forma combinada, sobre a formação inicial do biofilme e sua composição. Dois materiais foram selecionados, um com baixa E_{sup} (fluoretileno-propileno) e outro com intermediária E_{sup} (acetato de celulose), e fixados na face vestibular de incisivos superiores, divididos em uma metade lisa e outra rugosa pelo jateamento com areia. Os autores observaram que a R_a comportou-se como um fator mais proeminente que a E_{sup} na determinação da formação e composição do biofilme, à medida que as superfícies irregulares protegeram os microrganismos das forças mecânicas de remoção e a área de superfície disponível à colonização bacteriana foi aumentada em duas a três vezes, facilitando o estabelecimento de um biofilme maduro mais rapidamente. A explicação para a reduzida formação de biofilme nas superfícies com baixa E_{sup} foi uma menor força de adesão entre as bactérias e as superfícies com baixa energia, e a seletividade na adesão bacteriana, como, por exemplo, microrganismos iniciais com alta E_{sup} aderindo melhor à superfície com alta E_{sup} . A fim de se evitar o acúmulo de biofilme *in vivo*, os autores concluíram ser necessária a presença de superfície com baixa E_{sup} e baixa R_a .

Em 1992, Marsh & Martin afirmaram que o feto normalmente é estéril. Entretanto, durante o desenvolvimento do bebê, este entra em contato com a microbiota normal do útero materno e da vagina da mãe, além de, após seu nascimento, com microrganismos da atmosfera e das pessoas de convivência. Apesar destas grandes possibilidades de contaminação, a boca do recém-nascido é geralmente estéril, com inoculação de bactérias a partir de sua primeira alimentação, dando início ao processo de aquisição da microbiota oral residente. Tal aquisição depende da sucessiva transmissão de microrganismos para sítios viáveis para colonização bacteriana. As espécies pioneiras continuam a crescer e a colonizar, até que encontrassem a resistência do meio, compondo, assim, a comunidade microbiológica pioneira. Dentre estas barreiras ao seu desenvolvimento, podem ser citados fatores físicos, como a descamação de células epiteliais, as forças de cisalhamento da mastigação e o fluxo salivar, e fatores químicos, como a necessidade de nutrientes, o pH, o potencial de oxido-redução (E_h) e as propriedades antibacterianas da saliva. Durante o desenvolvimento desta comunidade na boca, os microrganismos predominantes são os *Streptococcus*, em particular os *S. salivarius*. Com o passar do tempo, a atividade metabólica desta comunidade promove modificações no meio (alterações de pH e E_h , exposição de novos receptores para adesão,

novos nutrientes) e condições favoráveis à colonização de forma sucessiva por outras populações, aumentando o número de grupos microbiológicos. Eventualmente, uma situação estável pode ser alcançada com a alta diversidade de espécies, denominada comunidade clímax. Os autores relataram que a boca do recém-nascido possui somente superfícies epiteliais para colonização, favorecendo uma população pioneira composta de aeróbios e anaeróbios facultativos. Espécies anaeróbias, como *Actinomyces* e *Fusobacterium*, estão em número aumentado após a erupção dentária. A aquisição da microbiota oral continua com a idade. Quando adultos, a microbiota oral residente apresenta relativa estabilidade e coexistência em razoável harmonia com o hospedeiro. Esta homeostasia microbiológica não é uma resposta passiva ao meio, mas um equilíbrio dinâmico alcançado por numerosas interações entre bactérias e entre estas e o hospedeiro. Algumas variações nesta microbiota podem ocorrer mais tarde, decorrentes de efeitos diretos ou indiretos da idade, como terapias para o câncer, o uso de prótese total, deficiências do sistema imune, entre outros. Hábitos sociais também podem perturbar o equilíbrio da microbiota oral, como a ingestão freqüente de carboidratos, o fumo, etc.

Os objetivos da pesquisa de Brex *et al.*, 1994, foram a determinação do tempo de ocorrência da colonização bacteriana inicial *in situ* e a observação do padrão de formação do biofilme dental humano em adultos. Os autores concluíram que a colonização bacteriana se iniciou instantaneamente ou há poucos segundos após a profilaxia. Além disso, verificou-se uma relação temporal positiva entre a presença de bactérias e a quantidade destas durante o acúmulo de biofilme. Também se confirmou que este acúmulo inicial seguiu sempre um mesmo padrão exponencial - platô - exponencial entre os indivíduos analisados, entretanto com forte variação interindividual quanto à taxa de acúmulo de biofilme. Tal diferença decresceu com o decorrer do tempo observado.

Com Listgarten, também em 1994, o biofilme dentário teve sua definição ampliada, apesar de já definida como um acúmulo microbiano não-mineralizado aderido à superfície dentária, restaurações e próteses, organizada estruturalmente com predominância de espécies filamentosas e matriz orgânica, derivada de glicoproteínas salivares e produtos microbianos extracelulares. Houve também a expansão de conceitos relacionados à formação e adaptação do biofilme e a fatores ambientais interligados. A colonização do meio bucal de crianças com ausência de elementos dentários se iniciou com *Streptococcus salivaris* e algumas espécies de *Lactobacillus* capazes de adesão ao epitélio. Seguidamente à erupção dentária, outras espécies de *Streptococcus* tornaram-se predominantes, além de espécies de *Actinomyces* variáveis com a idade da criança. Essa variabilidade de microbiota representou alguns fatores como pH, Eh

(potencial de óxido-redução), interações bacterianas, estados de saúde da dentição e dos tecidos periodontais, estado médico do paciente e sua origem racial. A respeito do desenvolvimento do biofilme, em poucos minutos após a limpeza da superfície dentária, uma película adquirida (proteínas salivares) foi adsorvida aos cristais de hidroxiapatita expostos. Em seguida, esta superfície foi colonizada por cocos facultativos gram-positivos (*Streptococcus*) e bacilos (*Actinomyces*), além de alguns cocos anaeróbios gram-negativos (*Veillonella*), sendo essa adesão inicial considerada reversível, transitória. Entretanto, tal adesão tornou-se mais forte e menos suscetível à ruptura com o desenvolvimento do biofilme. Este desenvolvimento relacionou-se primeiramente com a divisão celular das espécies aderidas para um aumento em extensão e espessura do biofilme, levando à posterior agregação de células diferentes e à competição por nutrientes e espaço entre as colônias. O biofilme maduro foi representado pela predominância da microbiota filamentosa, penetrada na "placa cóccica", levando ao aspecto de "espiga de milho". Quanto aos locais de acúmulo de biofilme, verificou-se, como foco inicial, as fôssulas e fissuras e as superfícies lisas protegidas de atrito, como região interproximal e margem gengival. O biofilme subgengival teve sua formação iniciada a partir de inflamação gengival ocorrida pela não-remoção dos depósitos supragengivais, o qual promoveu um ambiente relativamente anaeróbio, facilitando a colonização por espécies gram-negativas anaeróbias, principalmente bastonetes móveis e espiroquetas. A estrutura do biofilme subgengival mostrou-se como uma fina camada de bactérias aderidas à superfície radicular, filamentosas dispostas perpendicularmente a esta superfície (aspecto de "cerdas-de-escova") e espiroquetas em alta concentração em contato direto com os tecidos moles ou separada destes por uma camada de leucócitos. O autor verificou uma relação entre os tipos morfológicos bacterianos e o estado de saúde ou doença da área estudada, esclarecendo a importância do controle químico e mecânico do biofilme supragengival, que resultará em melhorias clínicas e interferirá na deposição e composição do biofilme subgengival.

Quirynen & Bollen (1995) demonstraram, com sua revisão de literatura, interesse em examinar a influência da Rugosidade de Superfície (Ra) e da Energia Livre de Superfície (E_{sup}) de substratos duros no processo inicial de adesão bacteriana, *in vitro* e *in vivo*. Os autores consideraram que o mecanismo de adesão celular deve ser dividido nas seguintes fases: transporte das bactérias à superfície, através de difusão por movimentos de Brownian; transporte conectivo devido ao fluxo de líquidos e/ou movimentos bacterianos ativos (quimiotaxia); adesão inicial, a partir da integração entre uma bactéria e uma superfície sob certa distância através de forças com grande amplitude (Van der Waals ou eletrostáticas) ou

pequena amplitude (pares iônicos, interações com ligações em ponte, adesão hidrogênica, entre outros). A terceira fase de adesão bacteriana é representada pela ligação, isto é, a ancoragem estabelecida por interações específicas, como o contato direto ou as formações de pontes, e mediada por componentes protéicos extracelulares, conhecidos por adesinas e receptores complementares sobre as superfícies. A última fase é a colonização propriamente dita, com o crescimento e multiplicação de microrganismos já aderidos, desenvolvendo microcolônias ou biofilme, além das interações entre diferentes espécies (co-agregação). Portanto, a adesão bacteriana é influenciada por ambas: R_a , promovendo uma proteção aos microrganismos contra as forças de remoção e facilitando a transição da adesão reversível à irreversível, e E_{sup} , que na remoção do filme de água promove forças de pequena amplitude. A situação no meio bucal, onde a maioria das bactérias possuiria uma E_{sup} alta e o meio (saliva) relativamente E_{sup} baixa, frequentemente apresenta uma adesão facilitada quanto mais alta a E_{sup} do substrato. Portanto, a influência da R_a e da E_{sup} sobre o biofilme supragengival justifica a procura por superfícies lisas com baixa E_{sup} para se minimizar a formação de biofilme, reduzindo a ocorrência de cárie e doença periodontal.

Segundo Jorge, em 1995, o biofilme dentário, também conhecida como matéria alba, placa gelatinóide, placa ácida, entre outros, pode ser definido como agregados bacterianos que ocorrem sobre os dentes ou outras estruturas bucais sólidas, na maioria das vezes desenvolvidos sobre a película adquirida. A película, por sua vez, é definida como uma biopelícula formada pela adsorção de proteínas e glicoproteínas salivares às superfícies dentárias, normalmente livres de bactérias. Este filme orgânico já está presente após 15 minutos de exposição do esmalte limpo ao ambiente bucal, começando a ser colonizado por microrganismos após quatro a seis horas. O autor afirmou que o biofilme é constituído por 70 a 80% de microrganismos, além de polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, glicoproteínas salivares, proteínas, pigmentos e restos alimentares. Seu componente bacteriano sofre alterações sucessivas, iniciando-se pela colonização por *Streptococcus* e alguns bastonetes gram-positivos e, seqüencialmente, cocos anaeróbios gram-negativos têm sua presença aumentada no biofilme, além de espécies de anaeróbios estritos e facultativos tornarem-se predominantes com o tempo. O autor também sugeriu que o potencial patogênico do biofilme dentário está relacionado aos tipos de alimentos e frequência de sua ingestão na determinação do substrato a ser favorecido aos microrganismos, bem como relacionado aos produtos finais do seu metabolismo, determinando a cárie ou doença periodontal. A formação foi dividida neste estudo em fase inicial, em que se verifica a atração bacteriana à superfície negativa do esmalte através de forças de Van der Waals e a repulsão

simultânea entre elas pelas cargas de mesma natureza, tornando esta adsorção reversível, e fase de acumulação, em que há uma maior aproximação desses microrganismos às superfícies. Sua fixação se dá por intermédio de seu glicocálice, pili ou fimbrias, adesinas, camadas de hidratação, polímeros bacterianos extracelular, aderência entre microrganismos através de componentes de sua superfície e, enfim, constituintes salivares.

Nesta publicação de 1995, Marsh & Bradshaw buscaram revisar os avanços na microbiologia do biofilme dentário, com particular ênfase nos mecanismos pelos quais a bactéria se adere à superfície do dente e produz um biofilme. Segundo os autores, o biofilme dentário pôde ser definido como uma comunidade microbiológica diversificada, encontrado na superfície dentária, embebido em uma matriz de polímeros de origem salivar e bacteriana. A microbiota dessa estrutura consiste em bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo anaeróbias facultativas e obrigatórias. Esses autores afirmaram que os mecanismos de formação do biofilme podem ser subdivididos em seis fases, que seriam: a) formação de um filme condicionante (película adquirida) na superfície dentária; b) fase não-específica reversível, envolvendo interações físico-químicas entre as bactérias transportadas pela saliva e a película adquirida do esmalte; c) interações moleculares estereo-químicas específicas entre os colonizadores primários e as moléculas receptoras do hospedeiro na película; d) adesão de colonizadores secundários aos colonizadores primários já aderidos (co-agregação); e) desenvolvimento de estratificação horizontal e vertical com o enriquecimento do biofilme e aumento na sucessão bacteriana, através de diferentes gradientes de nutrientes essenciais e produtos finais do metabolismo bacteriano; f) crescimento e formação de uma comunidade clímax. Quanto à composição bacteriana do biofilme dentário, os autores relataram a seguinte sucessão: após duas a quatro horas da formação do biofilme, verifica-se a predominância de cocos gram-positivos e bastonetes, em especial os *Streptococcus* e *Actinomyces*; após um a dois dias, bastonetes gram-positivos, filamentosas e cocos; após vários dias, a diversidade morfológica e de cultura aumenta, inclusive nas proporções de anaeróbios obrigatórios, originando estruturas conhecidas como "espigas de milho", "rosetas" e "cerdas de escova". O controle mecânico do biofilme dentário, juntamente com uma frequência reduzida da ingestão de açúcar, auxilia na prevenção de doenças provindas do acúmulo desta estrutura (cárie e doença periodontal), além de agentes antiplaca e antimicrobianos presentes nos cremes dentais e consultórios. Entretanto, novos estudos levarão a evolução de estratégias de controle do biofilme dentário, reduzindo as doenças dentárias.

Em 1997, Haake descreveu a comunidade do biofilme como formada inicialmente por interações entre bactérias e o dente e, então, por interações físicas e fisiológicas entre

diferentes espécies microbianas. A autora definiu o biofilme dentário como depósitos moles que formam o biofilme aderido à superfície do dente ou outra estrutura dura na cavidade bucal. Haake utilizava-se da classificação do biofilme em supragengival ou subgengival e considerava a composição do biofilme principalmente de microrganismos e matriz intercelular. Essa matriz formaria um gel hidratado, no qual as bactérias estariam embebidas e proliferariam, sendo esta a principal característica de biofilmes. O biofilme de gel funcionaria como uma barreira de proteção das espécies residentes contra substâncias potencialmente perigosas. A formação do biofilme pode ser dividida em três fases: a) Formação da película dental por adsorção seletiva de macromoléculas do meio ambiente, provendo lubrificação às superfícies e representando um substrato ao qual as bactérias do meio se aderem; b) Colonização inicial das superfícies dentárias por bactérias predominantemente anaeróbias facultativas gram-positivas com adesinas em sua superfície que interagem com receptores na película dental; c) Colonização secundária e maturação do biofilme, através de interações estereoquímicas altamente específicas entre moléculas de proteínas e carboidratos localizadas nas superfícies das células bacterianas, ocorrendo a co-agregação entre diferentes espécies de microrganismos. Nos últimos estágios de formação do biofilme, há o predomínio desse processo entre as gram-negativas. De acordo com Haake, os colonizadores iniciais utilizam oxigênio e baixam o potencial de oxido-redução do meio, além da obtenção de energia através de açúcares e saliva. Portanto, as bactérias que irão predominar no biofilme maduro serão anaeróbias e assacarolíticas.

Pretendendo considerar as possíveis funções ecológicas de algumas interações presentes na colonização bucal e resumir certas observações ilustrativas das estratégias bacterianas que poderiam envolver atividades específicas anti-adesivas do hospedeiro, Cisar *et al.* promoveram uma investigação em 1997. Os autores examinaram um número representativo de cepas de cinco espécies de *Streptococcus* (*sanguis*, *oralis*, *mitis*, *gordonii*, *anginosus*), além de *Actinomyces naeslundii*, para identificar suas atividades adesivas específicas. A colonização microbiana dos dentes incluiu um conjunto de interações adesivas, algumas entre bactérias e componentes do hospedeiro (película adquirida) e outras entre as bactérias do biofilme em desenvolvimento (co-agregação). Na tentativa de interferência na adesão bacteriana com anticorpos secretados, constatou-se um alto nível de heterogeneidade entre a superfície celular de cepas diferentes quando em atividades semelhantes. Quando observada a resposta imune à adesão através de fimbrias, também se notou que anticorpos contra grandes proteínas constituintes desta estrutura eram ineficazes no bloqueio de tal processo. Portanto, as possibilidades citadas pelos autores estimularam a identificação e caracterização de

adesinas e receptores das bactérias bucais, a associação da regulação da expressão dessas moléculas com sinais ambientais e a compreensão da função da adesão específica na colonização bucal e formação do biofilme para a sugestão de novas estratégias de interrupção destas interações.

Lang *et al.* (1997) sugeriram que os dentes representam na cavidade bucal uma superfície dura, não-descamativa, que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos, estes denominados de biofilme dentário. Os fatores mais importantes na formação inicial deste biofilme foram considerados semelhantes em todas as superfícies duras naturais ou artificiais da boca, mesmo apresentando diferenças de Rugosidade de Superfície, Energia Livre de Superfície e carga. Imediatamente após a limpeza de uma superfície sólida na cavidade bucal ou a imersão de um substrato sólido em meio salivar, macromoléculas hidrófobas foram adsorvidas pelas superfícies, formando um filme condicionante, denominado película adquirida. Numa segunda fase de desenvolvimento do biofilme, as bactérias se aderiram através de estruturas específicas. Em seguida, ocorreu um crescimento celular ativo de bactérias e síntese de novos componentes de matriz extracelular, fazendo com que houvesse um aumento da espessura do filme e a dificuldade de difusão de nutrientes e oxigênio através do mesmo. De acordo com os autores, a colonização primária foi realizada predominantemente por cocos gram-positivos anaeróbios facultativos. Na próxima fase, bastonetes gram-positivos aumentaram em número, tornando-se as filamentosas as espécies dominantes neste estágio. A aderência subsequente foi de microrganismos gram-negativos, permitida pelos receptores de superfície dos cocos e bastonetes gram-positivos, aumentando gradualmente a heterogeneidade do biofilme e as interações positivas e negativas entre as espécies bacterianas. O biofilme dentário foi estabelecido pelos autores como um biofilme, devido a este termo descrever uma comunidade microbiana indefinida, associada à superfície do dente ou qualquer outro material duro não-descamativo, o qual possui em seus níveis inferiores uma densa camada de microrganismos unidos a uma matriz de polissacarídeos com outros componentes orgânicos e inorgânicos e, em seu topo, uma camada frouxa com aparência altamente irregular, que se estende ao meio circundante. Tais características foram capazes de promover uma proteção efetiva das espécies contra os agentes antimicrobianos. Os profissionais deveriam identificar as deficiências pessoais no controle do biofilme em um programa individualizado, já que um padrão de distribuição de biofilme geral pode falhar em pacientes com higiene bucal abaixo da média, quando necessária a identificação de regiões com potencial para desenvolver problemas.

Um estudo realizado por Wood *et al.* em 2000 relatou o uso de Microscópio de

Varredura Confocal a Laser (CLSM) na determinação da estrutura natural e intacta dos biofilmes dentários humanos formados sobre o substrato de esmalte, discutindo a sua possível importância sobre o comportamento e controle do biofilme e a importância do modelo utilizado para pesquisas de outros biofilmes *in vivo*. Para a produção do biofilme, os autores utilizaram um dispositivo composto por um anel de *nylon* que foi aderido ao substrato de esmalte da superfície vestibular de molares superiores de oito voluntários para o acúmulo por quatro dias. Os autores verificaram a formação destes depósitos em todas as amostras, embora em quantidade variável entre os indivíduos e em maior quantidade na junção entre o *nylon* e o esmalte dentário que em direção ao centro do dispositivo. As imagens mostraram agregados celulares separados supostamente por canais preenchidos por fluido, sendo que alguns deles penetravam ao longo de toda a profundidade do biofilme. O tamanho e distribuição das lacunas frequentemente resultaram na formação de estruturas com aspecto de cogumelo, com estreitos pontos de ligação com o esmalte, e a maior parte da biomassa nas áreas superiores do biofilme. O volume de fluxo dentro dos canais citados seria muito mais rápido que a velocidade de difusão de substratos para o conjunto matriz/célula, implicando o transporte de substâncias, como ácidos orgânicos prejudiciais ao dente, toxinas bacterianas e agentes terapêuticos para dentro do biofilme. Os autores confirmaram a importância do CLSM no desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento de biofilmes em geral e na determinação de sua eficácia.

Também em 2000, Borgström *et al.* procuraram estabelecer a influência da espessura do biofilme dentário na produção ácida da microbiota depositada sobre a superfície dentária, através da prevalência e quantidade de ânions ácidos encontrados nas amostras de depósitos coletados de adolescentes. Com intervalo de três semanas, a massa de biofilme foi quantificada por um Índice de Placa e completamente coletada de todos os dentes, em repouso ou após enxágue da boca com solução de sacarose a 40%. Os autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os pesos úmidos de ambos os biofilmes. O Índice de Placa apresentou significativa correlação com o peso úmido dos biofilmes coletados sob os dois tempos de coleta. Ambas os biofilmes mostraram semelhantes concentrações médias da quantidade total de ânions encontrados. Os ânions dominantes nas amostras expostas à sacarose foram o lactato (este em concentração três vezes maior que a encontrada nas placas em repouso) e o acetato, enquanto na situação de repouso o acetato e o propionato. As correlações entre os pesos dos biofilmes e a concentração de ânions ácidos encontrados por mg de biofilme mostrou uma relação negativa em todas as amostras, surgindo uma queda na produção de ácidos com o aumento do peso do biofilme, exceto para o propionato.

Portanto, pôde-se concluir que existiria uma relação inversa entre a atividade de produção ácida e a massa total de biofilme sobre os dentes. Tais observações indicariam que o metabolismo glicolítico celular dos microrganismos no biofilme dentário fino seria diferente daqueles encontrados no biofilme espesso.

Segundo O'Toole *et al.* (2000), uma combinação de técnicas genéticas e moleculares em conjunto com a visualização direta em microscópio foi usada para investigações iniciais dos mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento do biofilme. Baseado em estudos anteriores, os autores afirmaram que o biofilme deveria ser visto como um processo de desenvolvimento bem regulado, que resultaria na formação de uma comunidade complexa de organismos. Para que se formassem estas comunidades, os microrganismos teriam que integrar sinais externos, atingir um equilíbrio com os adjacentes a eles e coordenar uma série de comportamentos multicelulares freqüentemente associados a alterações morfológicas. A compreensão das interações moleculares entre duas ou mais espécies dentro do biofilme deveria ser acrescentada ao atendimento das diversas estratégias de sobrevivência no mundo microbiano.

Em 2001, Thylstrup & Fejerskov definem a película adquirida como uma camada acelular de proteínas salivares adsorvidas e outras macromoléculas (geralmente de origem salivar) na superfície do esmalte dentário, com espessura de aproximadamente 10 µm, formando a base para a subsequente adesão de microrganismos, além de função protetora do esmalte contra a abrasão e o atrito e função de barreira difusora. As proteínas presentes na película incluem amilase, lisozima, IgA, IgC, peroxidase, mucinas e produtos decompostos de origem salivar e bacteriana. A complexidade da microbiota colonizada da película citada é o reflexo da natureza do ambiente bucal, onde variadas áreas ricas em nutrientes se encontram disponíveis à adesão. O desenvolvimento destes microrganismos é determinado pela sua capacidade de colonização. Esse processo inicia-se pelo acesso ao habitat, seguido pela aderência a uma superfície ou a bactérias já aderidas de forma específica e, posteriormente, os microrganismos crescem para aumentar o número de suas células, mesmo sob exposição a agentes antibacterianos, elementos do sistema imune do hospedeiro e/ou fatores externos como a dieta alimentar, higiene bucal e fluoretos. Quanto à aquisição inicial da microbiota bucal, os autores destacam que, nas primeiras semanas de vida, a colonização é realizada de forma predominante por algumas espécies de *Streptococcus* e, nos primeiros meses, observados os primeiros anaeróbios. Com a erupção dentária, verifica-se maior complexidade de ambientes e tipos de bactérias, como os *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e algumas espécies de *Actinomyces*, até atingir relativa estabilidade em adultos jovens. A microbiota

normal do habitat, associada à saúde (equilíbrio entre bactérias e ambiente), sob certas condições ambientais, pode provocar doença, segundo autores. Na tentativa de se restabelecer um equilíbrio saudável entre o biofilme e os tecidos do hospedeiro, os autores sugerem a modificação da produção de ácido no biofilme através da substituição dos carboidratos refinados da dieta, a utilização de fluoretos (bochechos diários e dentifrícios) e agentes antimicrobianos (principalmente a clorexidina).

De acordo com Biofilmes...(2004), um biofilme é uma comunidade cooperativa e estruturada de microrganismos associada a uma superfície, os quais estão embutidos em uma matriz autoproduzida. Esta matriz capaz de envolver as microcolônias bacterianas é penetrada por canais com fluxo de nutrientes, oxigênio, metabólitos, produtos de excreção e enzimas. A formação do biofilme inicia-se por células bacterianas livres que se aproximam das superfícies de maneira tão intensa, que sua mobilidade fica diminuída para a fixação através de associações temporárias com a superfície do substrato e com outros microrganismos anteriormente aderidos. Em seguida, tais células migram e se reproduzem formando microcolônias com outras células já presentes, produzindo a matriz. Com alterações nas condições do meio, as bactérias se destacam para outra superfície mais favorável. Segundo o autor, uma comunicação entre as espécies através de sinalização intercelular e/ou transferência de informação genética determina a diversidade e distribuição bacteriana no biofilme. Uma rápida evolução genética ocorre nos microrganismos dentro do biofilme, surgindo novos patógenos, resistência a antibióticos e outras táticas de sobrevivência. Os microrganismos estão organizados de acordo com a capacidade que cada um tem de sobreviver num microambiente específico, segundo suas relações simbióticas. O desenvolvimento de cárie dental, gengivite e periodontite é multifatorial e as bactérias específicas do biofilme correspondem a uma causa necessária, porém insuficiente para a doença. Portanto, a prevenção é a melhor estratégia contra as doenças bucais.

2.2 BIOFILME X MATERIAIS DENTÁRIOS

Uma pesquisa desenvolvida por Updegraff *et al.* (1971) procurou investigar a atividade antibacteriana de 21 marcas de materiais restauradores, além de testá-los contra uma cepa cariogênica conhecida por *Streptococcus*. Foram preparadas placas plásticas de Petri para a colocação da suspensão em meio ágar e assentamento de discos de materiais selecionados (silicatos, amálgamas, acrílicos), manipulados de acordo com o fabricante.

Também se analisou os benefícios de tais materiais *in vitro* sobre lesões cáries através da restauração da oclusal de molares extraídos e sua inserção em *Lactobacillus* e niacina durante quatro meses. Os autores verificaram que muitos dos materiais restauradores não mostraram atividade antibacteriana detectável. A composição do meio nutriente foi a maior variável na determinação da atividade antibacteriana, já que uma estrutura mais porosa apresentou maior facilidade de difusão dos agentes antibacterianos dos materiais, promovendo halos de inibição maiores. A lavagem em água de algumas amostras diminuiu consideravelmente a atividade estudada, sugerindo que poucas restaurações possuem tal atividade prolongada em meio bucal. Os autores concluíram que ainda se necessita de maiores informações biológicas sobre as interações presentes entre os materiais restauradores e as bactérias para um melhor entendimento dos seus efeitos em condições clínicas.

Segundo Rönström *et al.*, em 1975, as alterações celulares que ocorriam durante as quatro horas iniciais de formação dos depósitos sobre filmes plásticos aplicados sobre as superfícies dentárias deveriam ser investigadas. Pré-molares superiores e inferiores de participantes selecionados com excelente saúde gengival receberam aplicação de solução plástica. Os filmes obtidos foram deixados *in situ* por períodos de 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, sem ingestão de líquidos e sólidos, e removidos em seguida para análise microscópica com aumento de 1000 vezes. Os autores puderam concluir que o filme foi colonizado por microrganismos 15 minutos após a sua aplicação e, durante as próximas quatro horas, os cocos aumentaram em número, provavelmente devido à multiplicação e formação de microcolônias, além da agregação contínua de novas bactérias. O número de leucócitos e células epiteliais também aumentou gradualmente. A utilização do filme plástico foi adequada devido à sua Energia Livre de Superfície próxima à do dente e à ausência de propriedades antibacterianas deste substrato, facilitando, desta forma, o estudo da quantificação e identificação das culturas de microrganismos do biofilme inicial.

O propósito do estudo de Weitman & Eames, em 1975, foi determinar a taxa de acúmulo de biofilme sobre a superfície de restaurações de compósitos após quatro diferentes técnicas de polimento. Onze pacientes foram selecionados com lesões cáries no terço gengival de segundos pré-molares para a realização da pesquisa. Após fotografias iniciais das lesões, os preparos cavitários foram realizados e restaurados com Adaptic Anterior e Posterior. Após acabamento e polimento, as amostras foram coradas e novamente fotografadas a intervalos de 24, 48 e 72 horas na ausência de higiene. Foram determinados como controle as superfícies dos dentes vizinhos restaurados com amálgama, ouro, coroas totais fundidas, metalocerâmicas e esmalte. Algumas restaurações-teste foram novamente

polidas sob três diferentes técnicas: inicialmente as pontas e taças de acabamento marrom e verde foram utilizadas em todas as amostras, seguidas da aplicação de uma pasta fluida de óxido de alumínio ou pasta de silicato de zircônio ou pedras brancas de porcelana. Após o polimento, foram realizadas fotografias e, através destas imagens, a medição da extensão do biofilme e da porcentagem do dente coberto por biofilme. A Rugosidade de Superfície de tais materiais restauradores foi verificada, *in vitro*, através de discos confeccionados e polidos com as técnicas realizadas *in vivo* ou mantidos sem polimento (matriz Mylar) analisados em perfilômetro, além de comparação visual de imagens captadas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Os autores observaram um acúmulo de biofilme maior que duas vezes no dente-teste polido com pedra-pomes se comparado com o controle após 24 horas, com a redução desta diferença após 72 horas, mas permanecendo estatisticamente significativa. Entre as diferentes técnicas de polimento, não foi verificada diferença estatisticamente significativa quanto ao acúmulo de biofilme. A maior lisura de superfície foi observada nas amostras produzidas contra a tira de matriz Mylar. A pedra-pomes propiciou a maior rugosidade de superfície, sem diferença significativa com o silicato de zircônio. A microscopia explicou a atração do biofilme à superfície restaurada, observando a irregularidade morfológica das partículas de carga e sua projeção da superfície do compósito, além da presença de bolhas (canais e depressões) nesta estrutura. Pôde-se concluir que nenhuma das técnicas testadas produziu superfície lisa e polida, sugerindo que o compósito estudado seria incapaz de ser adequadamente polido.

Jendresen & Glantz (1981) desenvolveram um experimento a fim de analisar a adesividade clínica de alguns materiais dentários freqüentemente usados. Incisivos centrais superiores de quatro voluntários, três materiais dentários (folha de ouro puro, aço inoxidável e polímero odontológico) e nove líquidos polares e apolares com tensão superficial conhecida foram selecionados para o teste. Duas horas após a instalação dos materiais na cavidade bucal, foi analisada *in vivo* a Energia de Superfície crítica através da medição do ângulo de contato entre o líquido gotejado e a superfície sólida em questão. Os resultados mostraram que a superfície metálica apresentou alta E_{sup} , enquanto a resina apresentou valores consideravelmente menores que os dos metais. Observou-se também que não houve diferença significativa na formação dos filmes sobre os diferentes materiais quando numa mesma pessoa teste, entretanto, estatisticamente, houve diferença entre os participantes da pesquisa quando um líquido não polar foi utilizado. Pôde-se concluir que os materiais estudados exibiram a mesma adesividade clínica, mesmo apresentando consideráveis diferenças em suas propriedades químicas de superfície, quando colocados em um meio bucal e cobertos por

película adquirida. Portanto, os diferentes materiais não seriam mais ou menos benéficos que o esmalte natural na prevenção ou acréscimo da adesão microbiológica como um precursor de doença periodontal ou cárie.

Com o objetivo de comparar a quantidade de biofilme observada sobre seis materiais com a composição e textura superficial do substrato e com a ingestão de açúcar pelo paciente, Smales (1981) realizou esta pesquisa. Os materiais selecionados foram uma liga em limalha com teor de cobre inferior a 3% como controle para duas ligas de amálgama esferoidais com alto teor de cobre (29% e 13%), uma resina composta macroparticulada com carga de quartzo como controle para uma resina microparticulada com sílica coloidal e um cimento de ionômero de vidro. Dez dentaduras utilizadas por pacientes voluntários receberam preparos cavitários classe V na superfície vestibular de molares e pré-molares artificiais para a inserção dos materiais. Após duas ou três semanas sem limpeza das superfícies dos materiais, o biofilme foi corado para a realização de fotografias e quantificação de biofilme, além da verificação da Rugosidade de Superfície (Ra) das amostras. O autor verificou em seus resultados que a resina microparticulada se mostrou significativamente mais lisa que o cimento de ionômero de vidro e a resina macroparticulada, mas não tão lisa quanto os amálgamas. Quanto à retenção de biofilme, o cimento obteve valores significativamente maiores que qualquer outro material e a resina micro os menores valores, havendo geralmente uma boa associação entre a Ra e a quantidade de depósitos presentes, independentemente da localização do dente posterior nas dentaduras. Entretanto, houve uma pobre correlação entre os valores dos índices de açúcar da dieta do paciente e a quantidade de biofilme nas restaurações. Portanto, o presente estudo confirmou a relação de acréscimo de retenção de biofilme com o acréscimo de Ra. Além disso, também se verificou que os elementos lixiviáveis do cimento ionomérico (flúor) e amálgamas com alto teor de cobre (cobre) não promoveram menores valores na retenção e crescimento de biofilme se comparados com os outros materiais.

De acordo com Dummer & Harrison, em 1982, um método de formação de biofilme *in vitro* deveria ser modificado com o objetivo de se estudar a adsorção bacteriana e a formação do biofilme sobre uma variedade de materiais dentários. Quatro materiais foram selecionados: amálgama de liga convencional com partículas de limalha, compósito, ouro e porcelana. Foram confeccionados espécimes padronizados de amálgama e compósito polidos e não-polidos, ouro polido e porcelana glazeada. A cepa utilizada neste experimento foi de *Streptococcus mutans* D283. Foram determinados os pesos úmidos e secos dos biofilmes, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de microrganismos através de

escala. Os autores observaram que os amálgamas não-polido e polido foram os materiais que acumularam menor quantidade de biofilme, presumidamente devido à liberação de íons metálicos. O compósito polido apresentou maior acúmulo de biofilme, provavelmente devido à perda das partículas de carga superficiais com o polimento, deixando uma área de maior rugosidade. Na técnica de contagem de UFC, a sequência crescente foi o amálgama não-polido, amálgama polido, compósito não-polido, compósito polido, ouro e porcelana. Portanto, houve menor formação de biofilme sobre as superfícies restauradas com amálgama que sobre os outros materiais avaliados.

Em 1983, Dérand & Johansson desenvolveram um estudo para exame da extensão de dissolução de íons cobre e mercúrio de diferentes ligas de amálgama em soluções salinas e com variados pHs, analisando a profundidade da corrosão sofrida e a concentração desses íons metálicos. Os autores selecionaram oito amálgamas para a pesquisa, entre elas ligas de fase dispersa, de fase única e convencional (baixo conteúdo de cobre). Cada amostra foi colocada em garrafas contendo a solução-teste com pH 4, 5 ou sete. Em diferentes intervalos (1, 2, 4 e 12 dias), dez mililitros de solução eram coletados para a análise de mercúrio, estanho e cobre. Após o período de teste, as amostras foram fotografadas para a documentação de sua aparência corroída, sendo duas séries de peças-teste padronizadas para exame metalográfico. Os autores concluíram que todas as ligas estudadas liberaram cobre e mercúrio neste teste de corrosão, em quantidades aumentadas com a queda do pH, estando as concentrações de mercúrio em baixos valores e as de cobre variando grandemente com os diferentes tipos de amálgama e somente de forma parcialmente dependente da sua concentração nas amostras estudadas. A corrosão visualizada foi promovida pelo baixo pH.

Nesta publicação de 1985, Orstavik buscou a avaliação *in vitro* das propriedades antibacterianas de vários amálgamas convencionais e com alto teor de cobre, com ênfase na sua ação sobre os *Streptococcus mutans*, através de três diferentes métodos, para que esses fossem comparados quanto a sua atividade antimicrobiana. Além disso, também foi realizada uma tentativa de se relacionar essa atividade com a liberação de mercúrio, cobre e prata. Foram selecionadas nove marcas de amálgama para a confecção de espécimes padronizados. As bactérias utilizadas foram *Streptococcus mutans* OMZ 176 e microrganismos da saliva completa estimulada. Para a verificação da inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*, foi realizada a medição da densidade óptica de um meio parcialmente definido adicionado de cultura e de amostra de amálgama. Também foram verificadas as concentrações de Cu, Hg e Ag e o efeito bactericida tempo-dependente dos amálgamas sobre os *S. mutans*. O autor observou que os amálgamas variaram grandemente quanto ao seu efeito bactericida sobre as

bactérias da saliva, com porcentagem de 2% até 95,3%. Tal potencial não pareceu estar relacionado ao conteúdo de cobre das ligas. Quanto aos elementos analisados, houve grande variação de quantidades liberadas com as marcas testadas. Quanto à dependência do tempo, a maioria dos materiais eliminou 90% das bactérias entre 23 e 47 minutos e as amostras com uma semana demonstraram a mesma efetividade que as amostras recém-preparadas. O autor pôde concluir que todos os amálgamas demonstraram alguma atividade antibacteriana, variando a magnitude desta atividade com os sistemas de testes utilizados. Foi difícil relacionar a atividade antibacteriana às fases da estrutura, seu conteúdo ou metais liberados.

O objetivo da pesquisa de Palaghias, em 1986, foi a investigação dos possíveis efeitos dos ácidos acético, fórmico, láctico e succínico sobre o comportamento corrosivo de três amálgamas dentais. Foram selecionadas marcas com baixo e alto conteúdo de cobre. As ligas foram condensadas sob a forma de cilindros e suspensas em solução aquosa testada (0,5% v/v de ácido) para avaliação durante um semestre das quantidades de prata, cobre, zinco, estanho e mercúrio dissolvidas dos espécimes. Observou-se que os amálgamas com alto teor de cobre apresentaram uma alta taxa de dissolução nas soluções de ácido fórmico e láctico nas fases iniciais de imersão quando comparados ao convencional. Mais tarde, houve um marcado decréscimo da dissolução, mas ainda permanecendo em altos níveis. A liga convencional liberou quantidades muito menores de elementos em quase todas as soluções testadas, exceto no caso da prata em ácido láctico. O estanho não foi detectado em qualquer amostra e o mercúrio manteve-se em baixos níveis se comparado aos outros elementos. A aparência dos diferentes amálgamas após seis meses de imersão em ácidos orgânicos não estavam de acordo com as taxas de dissolução medidas. A dissolução de prata sugeriu que o processo de corrosão afetaria a porção externa e o corpo principal dos espécimes e a ausência de estanho propôs a formação de complexos insolúveis por este íon. Portanto, os resultados sugeriram que as bactérias produtoras de ácido, localizadas no biofilme formado sobre as superfícies dentárias e restauradas, constituiriam um fator potencial à deterioração dos amálgamas na cavidade bucal.

Também em 1986, Tullberg introduziu um novo método para medir a adesão de camadas bacterianas a materiais dentários com diferentes lisuras de superfície. Os materiais selecionados pelo autor foram: amálgama, polimetilmetacrilato, ouro puro e ouro recoberto por porcelana, dos quais foram confeccionados espécimes retangulares. Todos os materiais foram polidos e imersos em saliva estimulada para formação de película. Para a realização da cultura bacteriana (*Streptococcus mutans* 6715), uma "boca artificial" foi utilizada (água circulante a 37°C), na qual foi confeccionada uma passagem para inserção do espécime. Em

sua parte superior, havia entradas para mistura gasosa, saliva, suspensão bacteriana e meio de cultura. O pH da saliva, bactéria e substrato foram regularmente medidos. A pesquisa prosseguiu com o jateamento de água destilada com velocidade de 1,63 a 3,21 m/s a uma distância de 2 e 6 mm das amostras, originando assim dois sulcos de larguras diferentes, os quais tiveram as espessuras da camada bacteriana e de tais sulcos medidas. A comparação entre estes valores e os tratamentos diferentes de superfície mostrou que as larguras foram sempre maiores para as superfícies planificadas do que para as polidas, exceto para o amálgama. Não houve resultados numéricos para a cerâmica, já que houve a deposição de uma camada espessa, mas de baixa adesão. Durante o período de cultura, o pH sofreu alteração de 7,7 para 5,0. Portanto, o polimento aumentaria a adesão do biofilme dentário sobre os materiais, enquanto que uma cuidadosa planificação a reduziria sobre o PMMA e o ouro. Além disso, houve significativamente menor acúmulo de biofilme sobre os amálgamas se comparado com os outros materiais.

Uma pesquisa realizada por Wallman-Björklund *et al.* (1987) teve como propósito comparar a população de *Streptococcus mutans* no biofilme das margens de restaurações de amálgama com alto teor de cobre e de amálgama convencional. Seis pacientes voluntários foram orientados a manter sua dieta e hábitos de higiene bucal durante o experimento. O tratamento restaurador foi dividido de maneira que o material convencional fosse utilizado em um lado da dentição e o com alto teor de cobre do lado oposto num mesmo voluntário. Após um mês e dois meses da confecção das restaurações e polimento, as amostras de biofilme foram coletadas da face proximal e os *Streptococcus mutans* foram identificados, enumerados e a sua porcentagem foi calculada em relação ao total de UFC obtidas nos biofilmes. Os resultados mostraram a presença desses microrganismos em todas as amostras, com valores médios proporcionais nas restaurações com amálgama convencional ao dobro daqueles encontrados nas restaurações com alto teor de cobre. Quando comparados os valores das medianas das coletas de biofilme, as restaurações com amálgama convencional apresentaram valores semelhantes ao tipo com alto teor de cobre no primeiro mês e valores dez vezes mais altos no segundo mês. Os autores concluíram que, apesar de se saber a importância da liberação de íons cobre na inibição de formação de biofilme e do crescimento de *S. mutans*, ambos os tipos de materiais não apresentaram diferenças importantes estatisticamente na contagem total de UFC e no nível desses microrganismos nos seus respectivos biofilmes.

Interessados na avaliação de interações hidrófobas e eletrostáticas presentes entre bactérias e materiais dentários restauradores, Satou *et al.* (1988) promoveram um experimento. Os microrganismos selecionados foram os *Streptococcus sanguis* e

Streptococcus mutans e os materiais restauradores foram quatro resinas compostas quimicamente polimerizáveis (com Bis-GMA-2,2-bis[4(2-hidróxi-3-metacrilóxi-propilóxi)fenil]propano ou com Bis-MPEPP-2,2-bis[(4-metacriloxipolietóxico)fenil]propano), dois amálgamas (alto teor de cobre e convencional com 1% de SnF₂) e uma liga de ouro-prata-paládio (Au-Ag-Pd). As amostras foram coradas com laranja de acridina para a obtenção do número de bactérias aderidas. Também foi realizada a medição dos ângulos de contato das superfícies dos biofilmes depositados nos materiais ou em membranas de filtros com a água destilada, para a determinação das suas características hidrófobas. A eletroforese determinou o potencial zeta (ζ), isto é, a carga de superfície do material testado e da suspensão bacteriana. Os autores obtiveram como resultado que os *S. sanguis* aderiram-se mais fortemente à liga, enquanto que com menor intensidade à resina a base de Bis-GMA. Dentre as amostras com *S. mutans* aderidos, as ligas de amálgama representaram a maior aderência, sem diferença notável entre os materiais utilizados. As características de superfície analisadas mostraram que os *S. sanguis* tiveram maiores ângulos de contato que os *S. mutans* e que a liga Au-Ag-Pd maiores ângulos, seguida pelos amálgamas e resinas compostas. O potencial ζ bacteriano foi negativo para todas as cepas e tipos de materiais, com valores absolutos maiores para os *S. mutans* e para as resinas. Portanto, tais observações indicariam que interações hidrófobas possuiriam função mais importante que as eletrostáticas na aderência de bactérias com propriedades hidrófobas de superfície (*S. sanguis*), enquanto que o contrário se observa para as espécies com características hidrófobas relativamente menores e alto potencial ζ (*S. mutans*).

Segundo Yamamoto *et al.* (1989), seria de grande importância isolar e identificar as bactérias orais que se acumulam sobre resinas compostas sob condições anaeróbias, estudando tal adesividade *in vitro* através de Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) e Varredura (MEV). Na etapa da pesquisa *in vivo*, espécimes de Palfique Light foram afixados à superfície vestibular de primeiros molares superiores de doze voluntários pelo período de duas horas. Foram realizadas a contagem do número de colônias, a seleção de *Streptococcus* e o exame quanto à necessidade de oxigênio. Na etapa *in vitro*, a aderência de quatro espécies de *Streptococcus* isoladas sobre os espécimes de resina composta foi estudada, além da função dos polissacarídeos extracelulares na formação da placa através da medição do seu conteúdo de hexose. Os resultados foram os seguintes: a predominância de cocos gram-positivos facultativos em todos os voluntários, exceto em um deles, sendo estes microrganismos *Streptococcus* e com maior frequência de *S. mitior* (52,8%), seguindo de

forma decrescente por *S. sanguis*, *S. oralis* e menor frequência de *S. anginosus*. A espécie mais presente também foi a mais aderente e a mais produtiva (27,6 µg de hexose/amostra) das quatro testadas. As fotografias obtidas do MEV e do MET mostraram o *S. mitior* e o *S. anginosus* e a firme aderência do primeiro à superfície da resina através de uma camada difusa e irregular presente extracelularmente. Portanto, a predominância do *S. mitior* e os altos valores encontrados nos fatores estudados indicaram sua importância na formação do biofilme dentário, possivelmente pela capacidade de produção de polissacarídeos extracelulares.

Svanberg *et al.*, em 1990, realizaram uma pesquisa com o objetivo de analisar os níveis de *Streptococcus mutans* no biofilme interproximal de restaurações de amálgama do tipo classe II convencionais-conservadoras e de cimento ionômero de vidro reforçado por prata do tipo túnel. Vinte adolescentes foram selecionados para o experimento, com lesões cáries proximais. Em cada voluntário, ambos os materiais restauradores foram utilizados. Amostras de saliva foram coletadas previamente ao tratamento restaurador e as amostras de biofilme foram obtidas por fio dental após o tratamento. Os autores observaram o valor da mediana de $4,0 \times 10^5$ UFC/mL de *S. mutans* viáveis em saliva e porcentagem de *S. sobrinus* de 13% sobre o total de *S. mutans*. Nos biofilmes coletados obteve-se o valor da mediana das contagens dos microrganismos viáveis totais de $1,0 \times 10^7$ UFC nas restaurações em amálgama e $6,5 \times 10^6$ UFC em ionômero e de *S. mutans* de $4,7 \times 10^5$ UFC e $7,2 \times 10^4$ UFC, respectivamente. Essas diferenças encontradas entre os materiais foram estatisticamente significativas, sendo a porcentagem viável de *S. mutans* no biofilme significativamente maior nos espécimes de amálgama que nos de ionômero. Portanto, os resultados de menores níveis de *Streptococcus mutans* encontrados no biofilme do Ketac Silver sugeriram que os depósitos formados sobre tal material teriam um menor potencial de indução à cárie secundária se comparados aos formados sobre restaurações em amálgama.

O objetivo dos experimentos de Satou *et al.* (1991) foi detectar correlação entre a aderência bacteriana e as características superficiais de restaurações cobertas por saliva e entre tais características de restaurações não-cobertas e cobertas por saliva. Além disso, avaliaram a função de interações eletrostáticas e hidrófobas na aderência de *Streptococcus* orais sobre restaurações cobertas por saliva. Os materiais restauradores utilizados foram quatro resinas compostas quimicamente polimerizáveis, dois amálgamas e uma liga de ouro-prata-paládio (Au-Ag-Pd). Cada material foi preparado em moldes e saliva foi utilizada para imersão de alguns espécimes por uma hora. Os microrganismos selecionados foram os *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mutans*, para a obtenção do número de bactérias aderidas, das características hidrófobas das bactérias e dos materiais e do potencial zeta (ζ),

isto é, a carga de superfície de tais estruturas. Os autores obtiveram como resultado que, nas placas restauradoras não-cobertas por saliva, os *S. sanguis* aderiram-se mais fortemente à liga Au-Ag-Pd e mais fracamente à resina a base de Bis-GMA. Nas amostras com *S. mutans*, as ligas de amálgama representariam a maior aderência, sem diferença notável entre os materiais utilizados. Quando observados os resultados nos materiais cobertos por saliva, verificou-se que, para as quatro cepas estudadas, a contagem de células aderidas foi notavelmente diminuída se comparada às amostras não-cobertas por saliva. Os experimentos com *S. sanguis* mostraram maior aderência à resina composta por Bis-MPEPP, juntamente à liga Au-Ag-Pd, seguida por amálgama a resina à base de Bis-GMA (menor grau de aderência). Nos experimentos com *S. mutans*, os resultados foram semelhantes aos verificados para as amostras não-cobertas. Os ângulos de contato de todos os materiais foram reduzidos após cobertura por saliva. O potencial ζ bacteriano foi negativo para todas as cepas e tipos de materiais, com valores menores para os *S. mutans* e para as resinas. As cargas de superfície foram aumentadas após a cobertura com saliva, levando à uma correlação positiva entre o potencial zeta das restaurações cobertas ou não por saliva. Portanto, tais observações indicaram que as características superficiais da película salivar artificial formada sobre os materiais receberiam influência das características da superfície destes não-cobertos, afetando a aderência de bactérias às restaurações cobertas por saliva.

Em 1993, Lyttle & Bowden realizaram um estudo a fim de estimar os níveis de mercúrio no biofilme dentário de humanos e determinar o impacto bacteriano sobre a liberação de mercúrio do amálgama *in vitro*. Os autores selecionaram 15 voluntários, divididos em dois grupos: participantes com restaurações de amálgama realizadas há pelo menos dois anos e participantes sem restaurações de amálgama. Todos se mantiveram sem higiene bucal durante 24 horas previamente à coleta de biofilme, sendo que a coleta do grupo 1 foi de maneira separada das superfícies restauradas e não-restauradas. Já no grupo 2, o biofilme foi coletado de toda a dentição. Para o crescimento do biofilme *in vitro*, foram preparados espécimes cilíndricos de amálgama para uso no sistema de biofilme dentro de sete dias (“novos”) ou armazenamento em temperatura ambiente por 30 meses (“envelhecidos”), além da seleção da cepa de *Streptococcus mutans* para a determinação do número de células viáveis. A suspensão do biofilme desenvolvido em 20 dias foi avaliada quanto a carboidratos, proteínas e mercúrio. Os valores encontrados para o peso seco de biofilme no Grupo 1 foram de 1,1-7,1 mg sobre os amálgamas e 1,2-10,8 mg sobre o esmalte dentário, enquanto no grupo 2 foram de 26,6-47,0 mg. Os níveis de mercúrio das amostras do Grupo 1 variaram significativamente entre os participantes e não foram observados nos voluntários do outro

grupo, mostrando-se significativamente maiores nos biofilmes localizados sobre restaurações de amálgama. Nenhum mercúrio foi detectado nos espécimes controle ou teste de amálgamas “envelhecidos”, enquanto que altos níveis foram encontrados para os amálgamas “novos” no primeiro dia, com variedade de quantidade liberada no decorrer dos 20 dias. Durante o período do experimento, formou-se um biofilme denso sobre os espécimes e fios de suporte. O pH encontrado após 16 horas de incubação foi de 4,3 (amálgama “novo”), 4,32 (amálgama “envelhecido”), 4,35 (fio de controle), 4,28 (meio de controle) e 6,95 (meio-controle não inoculados). O peso total combinado de proteínas e carboidratos variou de 3,87% a 51,7% do peso seco do biofilme, com menores valores para as amostras de amálgama “novo”. Comparando-se os biofilmes dos amálgamas e dos fios com o biofilme controle, os autores verificaram maiores taxas de carboidratos e proteínas no controle, o que também foi visto para os biofilmes e fios dos tubos com amálgama “velho” se comparados com o “novo”. Portanto, os autores concluíram que o biofilme em desenvolvimento *in vivo* na presença de amálgama assimilava mercúrio, parecendo o biofilme facilitar sua liberação. Além disso, os amálgamas “envelhecidos”, cobertos por uma camada de oxidação passiva, mostraram maior resistência aos efeitos do biofilme, não liberando mercúrio, enquanto que tal liberação sofrida por amálgamas “novos” reduziu algumas atividades metabólicas do biofilme *in vitro*, sem afetar sua formação.

Nesta publicação de Hahn *et al.* (1993), um experimento avaliou a formação inicial de biofilme proximal sobre diversos materiais restauradores estéticos sob condições padronizadas. Uma *inlay* experimental de ouro foi temporariamente adaptada ao segundo pré-molar ou ao primeiro molar inferior, à qual foi ancorada uma faceta-teste na superfície proximal sob um encaixe de precisão, sendo duas porcelanas dentais, fundida (Dicor) e sinterizada (Flexo-Ceram), e um compósito dual (Duo Cement), além do esmalte humano esterilizado como controle. O biofilme dentário foi acumulado por períodos de três dias para a contagem total de bactérias (BC), das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e cálculo da eficiência do plaqueamento (PE). Os autores chegaram à conclusão que ambas as cerâmicas apresentaram baixos valores de BC/mm², UFC/mm² e PE se comparados ao esmalte ou compósito adesivo, isto é, a viabilidade da microbiota é reduzida naqueles materiais. Não foram encontradas diferenças individuais entre as duas cerâmicas relacionadas a tais índices e entre o esmalte humano e o compósito. O fato de este último ter acumulado significativamente mais biofilme que ambas as cerâmicas sugeriu que o polimento realizado nestes materiais leva a uma superfície mais rugosa devido à remoção da matriz polimérica leve.

De acordo com Nassar *et al.* (1995), a influência dos vários materiais dentários sobre o biofilme dentário tem sido manifestada quase que exclusivamente através das suas diferenças na força de retenção desses depósitos. Uma maior propensão ao biofilme estaria relacionada à tensão crítica de superfície, rugosidade de superfície e composição química, sendo as propriedades hidrófobas ou hidrófilas dos materiais pouco importantes. A grande variedade de materiais restauradores atualmente disponíveis para o uso na cavidade bucal tem mostrado etapas uniformes de formação da película adquirida entre si, vindo a diferir na composição final e retenção da película e do biofilme maduro. Quanto à Energia de Superfície (Esup), os materiais de alta energia referir-se-iam àqueles sólidos de alta dureza, alto ponto de fusão, grandes forças intermoleculares e estrutura basicamente cristalina, com valores acima de 50 mN/m na Odontologia. Esta característica seria verificada nos metais protéticos, ligas, vidros e cerâmicas. Os materiais de baixa energia apresentariam propriedades opostas às citadas e valores inferiores a 30mN/m, como ceras, polímeros e outros materiais orgânicos. Num primeiro momento de exposição ao meio bucal, os materiais com alta Esup limpos apresentariam máximas propriedades adesivas à água e às substâncias orgânicas e, com a formação da película adquirida, seria modificado seu comportamento, assemelhando-se aos de baixa Esup. A textura de superfície seria outro fator importante na facilitação do acúmulo de biofilme sobre os dentes e superfícies restauradas. Os níveis desta característica poderiam variar de acordo com a carga, porosidade, manipulação, corrosão e componentes lixiviáveis para inibição dos depósitos, como íons flúor, mercúrio, prata e cobre. Quanto às superfícies hidrófilas e hidrófobas, estas apresentariam o mesmo comportamento a partir da formação da película adquirida, mostrando condições similares de deposição de proteínas salivares, microrganismos e outras partículas. Portanto, a diferenciação dos depósitos fortemente retidos e dos ciclicamente removidos pela saliva estaria baseada nas conformações adesivas das primeiras moléculas salivares depositadas sobre os diferentes materiais, sendo o conceito de Esup útil para o agrupamento destes em categorias de resistência ou propensão à deposição de biofilme.

Também em 1995, Suljak *et al.* interessaram-se em determinar a dimensão na qual a composição superficial de resinas compostas e amálgama seria alterada quando cobertas por saliva e qual a extensão desta alteração sobre a adesão de diferentes microrganismos orais. Os materiais selecionados pelos autores foram o amálgama Dispersalloy e as resinas Prisma-AP.H, Herculite XRV e Z100. Foi coletada saliva para o experimento e as cepas de *S. salivarius*, *S. sanguis* e *A. viscosus* foram utilizadas na avaliação da adesão de tais espécies. As amostras foram analisadas quanto aos elementos constituintes e à característica hidrófoba

da superfície de tais materiais e das cepas citadas. Os autores verificaram que os materiais polidos encontravam-se hidrófobos e que, após cobertura salivar, houve um aumento na razão Nitrogênio/Carbono e aparente perda ou bloqueio de outros componentes originalmente presentes no amálgama (Na, Hg, Ag), Prisma AP.H (Si, Zn), Herculite (Ag, Na) e Z100 (Sn, P, Zr, Na, Cl). Quanto ao processo de adesão, houve interações significativas entre as superfícies, os tratamentos que receberam e as bactérias, portanto mais de um fator esteve envolvido em tal processo, com alteração de comportamento dos microrganismos em diferentes substratos e sob exposição salivar. A microscopia eletrônica demonstrou forte adesão de *S. salivarius* à resina Prisma-AP.H e a formação inicial de agregados por *Streptococcus* e seus glicocálices ligados às células, originando a auto-agregação. Portanto, os autores puderam concluir que a deposição de um filme condicionante rico em carbono e nitrogênio na superfície dos materiais testados, após sua exposição à saliva, provocaria alterações em sua composição química e, conseqüentemente, no processo de adesão/retenção de microrganismos orais, sendo mais predominante nas resinas compostas.

O propósito da pesquisa de Netuschil *et al.* (1996) foi investigar o uso da técnica de coloração Fluorescência Vital (FV) no monitoramento da viabilidade dos *Streptococcus mutans in vitro* sobre diferentes amálgamas e examinar, com a mesma metodologia, *in vivo*, a viabilidade do biofilme localizado nas superfícies do esmalte ou do amálgama. As ligas testadas *in vitro* foram o Sybraloy, Amalcap-non- γ 2, Amalcap F e Neo-Silbrin, enquanto o vidro foi utilizado como controle. Os *Streptococcus mutans* foram mantidos em contato com os espécimes por 24 horas para a formação do biofilme nos materiais testados, e em seguida, mantidos por 14 horas em solução salina para uma fase de “inanição”. A solução para a análise em Microscopia Epifluorescente permitiu a pigmentação dos organismos vivos (verde) e mortos (vermelhos). No estudo *in vivo*, restaurações foram realizadas em alguns pacientes com Amalcap-non- γ 2, privando-se da higiene bucal durante períodos separados de 1, 3 e 5 dias. Os autores puderam concluir que, após o crescimento nas amostras e antes da fase de “inanição”, a viabilidade bacteriana encontrada foi de 70% no vidro e 40-50% nos amálgamas, exceto no Neo-Silbrin em que houve 0% de viabilidade. Após a fase de “inanição”, a viabilidade não foi alterada no vidro, no Amalcap-non- γ 2 e no Sybraloy e reduzida no Amalcap F (liga convencional) para 20%. Essa redução se deu devido à alta quantidade de íons bactericidas liberados mesmos nos períodos em que a microbiota mostrava-se metabolicamente inativa. Já o Neo-Silbrin aumentou para 10%, já que a sua alta liberação de cobre inicial desvitalizou fortemente as bactérias na primeira etapa do

experimento apenas. Os amálgamas analisados estatisticamente mostraram diferença do vidro controle. *In vivo*, a viabilidade do biofilme foi estatisticamente diferente entre o esmalte e Amalcap-non- γ_2 . Portanto, essa técnica mostrou-se relevante e útil no monitoramento do biofilme bacteriano, já que se observou uma diferença estatística na viabilidade de *Streptococcus mutans* aderidos *in vitro* sobre o amálgama não γ_2 e γ_2 e uma redução marcante posteriormente ao período de “inanição” neste último tipo de liga, já que sua porcentagem foi maior em termos de efeito antibacteriano. No experimento *in vivo* também foi verificada uma significativa redução na viabilidade da microbiota do biofilme dentário do amálgama quando comparado ao esmalte dental.

No mesmo ano, Netuschil *et al.* visaram determinar se um procedimento teste, no qual bactérias estivessem em íntimo contato com os materiais testados, seria eficaz na avaliação do potencial antibacteriano de diferentes composições de amálgama. Os materiais utilizados para avaliação foram amálgamas com alto teor de cobre e convencional, vidro e esmalte bovino como controles negativos e o amálgama Neo-Silbrin como controle positivo. Foram confeccionados cilindros com os materiais selecionados para a inoculação de cultura de *Streptococcus mutans* obtidos de saliva fresca. A Densidade Óptica (DO) das culturas foram medidas inicialmente e a intervalos de 3, 6, 9, e 12 horas. Na nova técnica de “Biofilmes”, os espécimes foram mantidos por 24 horas em tubos de ensaio de cultura de *Streptococcus mutans*, mantidos por 14 horas em placas de Petri, para a restrição da multiplicação de bactérias em contato com a superfície do espécime, e novamente imersos em meio de cultura por 12 a 30 horas. Os autores observaram que, sob condições comuns de crescimento bacteriano, nenhum dos espécimes demonstrou capacidade antibacteriana, com idênticos padrões de crescimento, exceto o Neo-Silbrin. Quando houve o íntimo contato entre as cepas de *Streptococcus* e os espécimes, obteve-se uma variação no potencial antibacteriano entre elas. Nos esmalte bovino, o crescimento produziu uma média de DO de 2,44 e, no vidro, 0,59 após 24 horas. Não houve diferença significativa entre os dois tipos de amálgama analisados estatisticamente. Portanto, conclui-se que o sistema de “Teste do Biofilme” foi capaz de verificar que o vidro e o esmalte apresentaram os maiores valores de crescimento bacteriano e que, em todos os espécimes de amálgama, observou-se certa inibição, embora as ligas com fase γ_2 tenham apresentado valores de DO mais baixos.

Segundo van Dijken *et al.*, em 1997, uma investigação foi realizada a fim de se comparar intraindividualmente o fluoreto no biofilme de restaurações realizadas há um ano com materiais que contêm este elemento, além de relacionar o conteúdo de íon flúor às

proporções de bactérias presentes no biofilme formado sobre as superfícies restauradas. Dezoito pacientes foram selecionados para a confecção de restaurações classe III na região anterior, utilizando ionômero de vidro modificado por resina, compômero e resina composta híbrida fotopolimerizável. Um ano após, foi permitido que se acumulasse biofilme sobre as superfícies-teste por uma semana, inclusive sobre uma superfície proximal de esmalte para controle. Os depósitos foram coletados a fim de se estimar especificamente o número de microrganismos encontrados (*Streptococcus* bucais, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*), o conteúdo total de fluoreto e a quantidade liberada deste íon. Os níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* de amostras de saliva estimulada foram examinados. Os autores verificaram que as concentrações de fluoreto nas amostras de ionômero foram significativamente maiores que as encontradas nas outras superfícies testadas, sendo todas as outras diferenças não significativas. O número de bactérias que recobriu as diferentes superfícies restauradas não foi diferente do que o esmalte. A fração de *Streptococcus* bucais no biofilme também não diferiu entre as amostras e suas proporções relativas quanto ao total de anaeróbios facultativos variou entre 3 e 97%. Os *S. mutans* compreenderam somente a minoria da microbiota de *Streptococcus* na maioria das amostras (<0,01%). A variação interindividual foi grande, enquanto em níveis intraindividuais as proporções bacterianas foram semelhantes. Quanto aos *Lactobacillus*, estes foram detectados somente no biofilme de dez participantes e em proporções muito baixas. Na saliva, também houve uma grande variação entre os voluntários no número de *S. mutans* e *Lactobacillus* e uma boa correlação entre a contagem do *S. mutans* da saliva e das amostras de biofilme, sugerindo uma possível adaptação destes microrganismos aos efeitos antibacterianos do fluoreto. Portanto, o fluoreto liberado revelou-se em baixas concentrações em todas as restaurações testadas, sem correlação entre estes níveis, as proporções de *Streptococcus mutans* e o total de *Streptococcus* nas amostras.

Nesta publicação de 1998, Shahal *et al.* procuraram analisar a aderência bacteriana *in vitro* a diversos materiais restauradores estéticos em um modelo que mimetizou as condições intra-bucais. Foram utilizados cinco diferentes materiais restauradores estéticos (resina composta microparticulada, híbrida e microhíbrida, cimento de ionômero de vidro convencional e modificado por resina) e esmalte bovino como grupo controle. Foram confeccionadas pastilhas polidas dos materiais e de esmalte bovino. As bactérias utilizadas foram *S. mutans* GS5 e saliva foi coletada para o preparo da película experimental. A eletroforese foi utilizada para investigar as diferentes proteínas salivares adsorvidas nos espécimes e o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) para visualizar a adsorção das

bactérias em suas superfícies. Os autores verificaram que não houve diferença significativa entre os espécimes na aderência bacteriana, que apresentou um padrão similar (camada única), e no perfil dos constituintes salivares. Os autores concluíram que a aderência bacteriana ocorre sob um mesmo padrão nas superfícies dos materiais restauradores testados e do esmalte, mesmo sendo evidenciadas com o MEV maiores irregularidades no esmalte e cimento de ionômero de vidro. Deve-se considerar que todos os espécimes foram lavados muitas vezes, eliminando o possível efeito do flúor liberado pelos materiais na adesão bacteriana inicial.

Com o objetivo de examinar o acúmulo de *Streptococcus mutans* sobre superfícies de amálgama e compósito fotopolimerizável afetado por variados métodos de polimento, Zalkind *et al.* realizaram um estudo em 1998. Foram preparados espécimes padronizados de compósito, polimerizados contra uma matriz Mylar, de amálgama e de esmalte dentário. Os compósitos foram divididos em seis tratamentos: a) resina microparticulada polimerizada contra a matriz; b) semelhante ao a, mas polida por brocas diamantadas de acabamento e discos Soflex; c) semelhante ao a, mas polida por broca de tungstênio e discos de Soflex; d) resina macroparticulada polimerizada contra a matriz; e) semelhante ao d, mas polida por brocas diamantadas de acabamento e discos Soflex; f) semelhante ao d, mas polida por broca de tungstênio e discos Soflex. Já os amálgamas foram divididos em dois grupos: g) brunido por instrumento manual; e h) brunido e polido por um kit de polimento (Shofu). Os espécimes de esmalte apenas foram limpos com pedras-pomes (grupo i). As bactérias utilizadas neste experimento foram *Streptococcus mutans* NCTC 10449. Os autores obtiveram resultados significativos que mostraram diferenças entre os espécimes de amálgama polidos por brocas (h) e os espécimes de compósito d, e, f ($p < 0,0001$) e c ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa no acúmulo de biofilme encontrado sobre os compósitos e o esmalte. Portanto, os resultados deste estudo mostraram que o material microparticulado tratado com tungstênio e discos e todos os compósitos macroparticulados acumularam mais biofilme que o amálgama após brunidura e polimento. Deve-se, então, reforçar a importância de uma rigorosa higiene bucal na manutenção da saúde dentária e gengival, já que não houve diferença na aderência bacteriana aos compósitos micro ou macroparticulados tratados ou não pelos procedimentos de acabamento.

Uma pesquisa desenvolvida por Willershausen *et al.* em 1999 visou testar as influências dos microrganismos orais sobre as superfícies de materiais restauradores à base de resina. Foram selecionadas duas resinas compostas híbridas e um compômero, além de três cepas (*Streptococcus oralis* H1, *Streptococcus mutans* 10449^T e *Actinomyces naeslundii* A6)

para a colonização destes materiais, com intervalo de duração de incubação de 20, 28, 34 e 35 dias para a observação dos efeitos sobre suas superfícies. Alíquotas do meio de cultura foram analisadas para glicose e lactato. Os autores verificaram adesão bacteriana evidente nas 24 horas iniciais de incubação e, após o período de cinco semanas, estes microrganismos formaram uma cobertura branca, densa sobre toda a lâmina de material e parte do fio ortodôntico que suspendia os espécimes. Os resultados também mostraram que, a cada dia, as bactérias consumiram a maioria da glicose depositada no meio, sem diferença importante entre os tubos que continham ou não o material resinoso. Quanto ao lactato, os *Streptococcus* produziram 30 a 40 mmol, enquanto os *Actinomyces* aproximadamente 15 mmol diariamente. A variação diária na quantidade produzida foi bem evidente, permanecendo o consumo de glicose o mesmo, tanto nos tubos contendo espécimes ou não, portanto sem influência do contato imediato dos microrganismos com os materiais nestes processos metabólicos. Sob MEV, observaram algumas alterações (defeitos) na superfície dos materiais selecionados expostos ao biofilme, principalmente no compômero. A Rugosidade de Superfície mostrou-se aumentada em todos os casos após a colonização, com diferenças significativas entre os materiais, sugerindo degradação da superfície com manutenção de sua carga intacta. Portanto, a composição dos materiais testados mostrou-se mais relevante que suas propriedades de superfície na colonização bacteriana, anulando assim os efeitos antibacterianos de liberação de flúor do compômero. Portanto, os dentistas deveriam considerar, na seleção de um material restaurador, além dos fatores estéticos, econômicos e funcionais, a extensão de formação de biofilme em locais de difícil higienização, minimizando os efeitos induzidos pelo biofilme nos materiais.

De acordo com Hannig (1999), um padrão ultraestrutural distinto de colonização bacteriana sobre vários materiais dentários deveria ser analisado através de Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). O autor selecionou três voluntários para o teste de 19 materiais restauradores diferentes: ligas de amálgama (baixo e alto teor de cobre), ligas fundidas, cimento de ionômero de vidro convencional, cimento de ionômero de vidro reforçado por prata, cerâmicas feldspáticas, cerâmica vítrea, resinas compostas, resinas sem carga e poliuretano de dimetacrilato. Cortes de esmalte bovino foram utilizados com propósitos referenciais. Todos os espécimes foram padronizados e expostos ao meio bucal por 24 horas através de aparelhos removíveis de acrílico, aos quais foram aderidos na área correspondente à vestibular e lingual dos primeiros molares superiores. As micrografias não revelaram diferenças na aparência ultraestrutural da formação do biofilme sobre a superfície dos variados materiais, entretanto entre as peças testadas na superfície vestibular e lingual

observaram-se diferenças no padrão de formação da película, aderência bacteriana e, conseqüentemente, na formação do biofilme. Comparando-se os resultados encontrados em ambas as regiões, observou-se que, com 24 horas, os espécimes estavam completamente cobertos por uma película homogênea granular ou globular, porém de espessura maior na superfície vestibular. A adesão bacteriana (bactérias íntegras, mortas e fragmentos da placa celular bacteriana) foi fortemente relacionada com micro-irregularidades da superfície lingual. Entretanto, na superfície oposta, predominaram multi-camadas de microrganismos, na sua maioria cocos e muito esporadicamente bastonetes, estando estas células geralmente intactas, em divisão e em pares ou grupos. Portanto, o autor pôde concluir que, independentemente das propriedades físico-químicas da superfície de todos os materiais testados, houve um padrão característico diferente de adesão bacteriana apenas entre os espécimes situados nas superfícies vestibular e lingual. Isto indicaria a influência do meio bucal sobre este processo, provavelmente o pequeno efeito hidrodinâmico do fluxo salivar parotídeo contra o efeito dos constantes movimentos de língua.

Com o objetivo de avaliar a extensão e a velocidade de alteração de pH do ácido láctico aquoso após seu contato com várias marcas comerciais de cimento de ionômero de vidro, Nicholson *et al.* (2000) empreenderam este experimento. Os materiais ionoméricos estudados eram convencionais ou modificados por resina, a partir dos quais se confeccionou discos para interação com ácido láctico. Em uma etapa denominada “filme fino”, 20µL de solução ácida promoveu espessura uniforme de 0,15mm (situação biológica) sobre os discos e, em diferentes intervalos de tempo (0,5, 1, 2, 5 ou 10 minutos), seu pH foi registrado. Na outra etapa, nomeada “pequeno volume”, 1,5 mL de solução ácida foi colocada em um frasco de vidro onde os discos foram armazenados e o pH medido nos intervalos de tempo acima citados. Os autores detectaram, após 30 segundos, alterações no pH significativas entre 0,5 e 1,2 unidades nos filmes finos em todos os cimentos. Nos intervalos subseqüentes, todos também mostraram variações, entretanto estas foram significativas apenas para o Ketac Molar. No experimento de pequeno volume também houve mudanças no período de 30 segundos com magnitude entre 0,1 e 0,4 unidade, isto é, muito menor que no método anteriormente citado, seguidas por acréscimos regulares significativos no pH com o aumento de tempo de exposição de todos os cimentos ao ácido láctico. Portanto, os autores concluíram que as alterações de pH (efeito tampão) ocorreram de maneira muito rápida, principalmente no método de filme fino, em que se verificaram benefícios clínicos no intervalo de 30 segundos, e de maneira efetiva ao controle de cárie ativa e prevenção de lesões secundárias com a obtenção de valores próximos ou acima do requerido (aproximadamente 5,7).

Também em 2000, Patel *et al.* propuseram um estudo dos fatores que poderiam influenciar na extensão de alteração do pH pelos cimentos de policarboxilato de zinco e ionômero de vidro, avaliando-se variações de quantidade de espécimes para a solução de ácido láctico e da razão pó/líquido nestes cimentos. A partir dos materiais selecionados, foram confeccionados espécimes cilíndricos através da mistura dos seus pós e líquidos nas razões recomendadas (3,3/1,0 para o ionômero e 5,0/1,0 para o policarboxilato) com água, os quais foram imersos em soluções de ácido láctico (pH 2,7) durante uma semana. No final deste período, o pH de cada solução foi determinado. O efeito da razão pó/líquido do cimento foi determinado por quatro razões diferentes para cada material. Os resultados obtidos mostraram valores de pH das soluções armazenadas variando com a razão pó/líquido, entretanto de forma não-significativa pelo teste de correlação. Também foi observado que o pH da solução armazenada foi positivamente associado ao número de amostras. Do ponto de vista clínico, os resultados sugeriram a capacidade destes cimentos em tamponar o ácido láctico produzido por bactérias cariogênicas e atingir níveis de paralisação de lesões cariosas. Portanto, os autores puderam concluir que o efeito de vidro seria pequeno e somente estatisticamente significativo para o ionômero em níveis baixos de significância. Já a variação na proporção de cimento nas soluções armazenadas representou um fator significativo na determinação do pH final de tais soluções. A capacidade de tamponamento destes cimentos representaria um efeito importante na utilização clínica destes materiais.

O propósito da pesquisa de Fano *et al.* (2000) foi analisar a microestrutura de quatro cimentos de ionômero de vidro, com diferentes sistemas de presa, em diferentes situações, como antes e após a polimerização e após seu armazenamento em água destilada ou em solução de ácido láctico. A partir dos materiais selecionados, foram confeccionados espécimes para análise em Microscopia Confocal, após a imersão em água bidestilada ou solução aquosa de ácido láctico (pH 3,5) e mantidos por 2, 6, 15, 45 dias e 1 ano. Também foi realizado o exame de porosidade e transparência dos materiais e fotografias dos poros sob condições padronizadas. Os autores observaram que todos os materiais apresentaram porosidade esferoidal semelhante morfolologicamente, mas variável quanto à porcentagem de volume. Após vários meses (aproximadamente seis), uma camada gelatinosa segregou na superfície de todos os materiais e figuras escuras irregulares e grandes visualizadas nas fotografias, descritas como agregados de partículas de vidro, permaneceram inalteradas. Quanto ao pH, o armazenamento dos espécimes em solução de ácido láctico levou à sua erosão e formação de uma camada de gel semelhante à citada. Os autores concluíram que a degradação dos materiais envolveu dois processos: um relacionado à matriz e um

edemaciamento induzido da superfície, abrindo bolhas superficiais, promovendo difusão de moléculas entrelaçadas e subsequente formação de camadas gelatinosas em água ou meio ácido; e o outro envolvendo a remoção da camada de gel e a perda de partículas de carga da superfície. O primeiro processo foi o mesmo para todas as matrizes maduras. O segundo processo foi afetado pelo mecanismo de presa. Na sequência ácido-base, presa dual ou tripla, o tempo de vida das partículas de carga e camadas de gel da superfície aumentou.

De acordo com Bradshaw *et al.* (2001), a utilidade de um sistema-modelo experimental *in vitro* capaz de desenvolver biofilmes sobre superfícies foi analisada através da comparação do desenvolvimento de microrganismos orais sobre seis marcas comerciais de materiais compósitos fotoativados para restaurações indiretas. Foram preparados espécimes retangulares para a inserção em sistema quimiostático, em que um recipiente de cultura e um recipiente “biofilme” foram controlados por microprocessadores. Era adicionada sacarose três vezes ao dia para o crescimento de *S. mutans*, sendo alguns espécimes inseridos às culturas estáveis e mantidos por 14 dias. Os outros espécimes foram utilizados para análise de imagem, através de microscópio com fluorescência e *software* para avaliar a porcentagem de superfície coberta e a força de adesão. A contagem viável para os materiais dentários foi de mais de 6,0 UFC/cm², com valores mais significativos encontrados na Targis e sem diferença significativa entre os outros. A comunidade desenvolvida apresentou-se bem diversificada, incluindo em sua maioria o *F. nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus rhamnosus*, sem seletividade pelos materiais. A análise de imagem evidenciou maiores extensões de cobertura do biofilme na Vision Gem, enquanto uma fraca força de adesão bacteriana sobre os materiais foi verificada na Sinfony e Artglass. Portanto, o sistema descrito neste experimento permitiu uma tripla abordagem na determinação do potencial de formação do biofilme de cada material, como a avaliação quantitativa das espécies bacterianas aderidas às superfícies, uma análise visual do nível de biofilme e quantificação da força relativa de adesão dos microrganismos aos diferentes materiais testados.

Também em 2001, o estudo de Carlén *et al.* procurou caracterizar superfícies-teste de íonômero de vidro e de resina composta antes e após o polimento quanto à Rugosidade de Superfície (Ra), composição química e Energia Livre de Superfície (Esup), além de analisar a adsorção de proteínas salivares e a aderência bacteriana sobre tais superfícies cobertas pela película adquirida. Os materiais selecionados foram utilizados na confecção de cilindros polidos. A Ra e a área de superfície foram determinadas por Microscópio de Varredura Confocal a Laser (CLSM), descrevendo-se numericamente sua topografia. Quanto à composição química da superfície, utilizou-se o mapeamento de elementos químicos. A Esup

total foi estimada pela tripla medição do ângulo de contato com água, formamida e diiodometano. As cepas bacterianas selecionadas foram *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 e *Actinomyces naeslundii* LY7. A incubação dos espécimes por 60 minutos em saliva coletada foi responsável pela formação da película adquirida. Os autores obtiveram entre os resultados que a superfície do ionômero de vidro apresentou maior Ra que a resina composta previamente ao polimento, procedimento que levou a um aumento considerável na Ra deste material. Quanto à composição de ambos, suas superfícies apresentaram principalmente carbono e oxigênio enquanto não-polidos, indicando a predominância de constituintes poliméricos e relativas características hidrófobas nesta situação. Após o polimento, houve um considerável decréscimo na razão orgânica/inorgânica para a resina composta apenas, devido à exposição de uma alta fração de seus componentes inorgânicos, como o alumínio, o silício e o bário. A Esup total encontrada foi semelhante para os dois materiais antes do polimento e aumentou após o polimento para valores também próximos. Portanto, o polimento levou a um aumento na polaridade em relação à Esup total para a resina composta. A aglutinina foi fortemente detectável nas amostras de resina não-polida e as bactérias em menor número, enquanto após seu polimento houve um aumento substancial em ambas as estruturas. Já no ionômero, o polimento afetou muito menos o processo de adesão, o qual apresentou valores mais altos que a resina nas duas situações. Portanto, o cimento de ionômero de vidro, com maior Ra, componente inorgânico e carga de superfície positiva, aderiu mais proteínas e bactérias que as resinas compostas. Além disso, o efeito do polimento levou ao acréscimo na adesão de proteínas e bactérias na resina composta, podendo ser explicado pela alteração da Ra e/ou interações eletrostáticas entre o substrato e componentes salivares, originando superfícies clinicamente desfavoráveis.

Pretendendo examinar a formação de biofilme dental por *Streptococcus sobrinus* sobre diferentes tipos de materiais restauradores, Steinberg & Eyal (2002) utilizaram um modelo *in vivo* constituído por componentes bacterianos e do hospedeiro. Foram confeccionadas pastilhas de amálgama com alto teor de cobre, resinas compostas, cimentos de ionômero de vidro convencional e modificado por resina e resina acrílica. Os autores promoveram uma película experimental através da cobertura dos espécimes por saliva durante 45 minutos e por preparo de Glicosiltransferase (GTF) durante 60 minutos em seguida. Foram analisados: o padrão de adsorção de saliva aos materiais restauradores, a quantidade de proteínas salivares adsorvidas, a adesão bacteriana sacarose-dependente e a contagem de *Streptococcus sobrinus* viáveis no biofilme produzido. Os autores registraram diferentes padrões de adsorção de proteínas salivares aos materiais restauradores. Um perfil de adesão

dependente da superfície foi verificado, mostrando alta afinidade da albumina e amilase ao acrílico e à resina composta microparticulada e menor afinidade da albumina salivar aos materiais ionoméricos. O acúmulo bacteriano foi maior sobre os cimentos, os quais também demonstraram a maior viabilidade bacteriana. Algumas resinas mostraram menor capacidade de adesão bacteriana, enquanto uma resina e o amálgama apresentaram menor viabilidade. Portanto, os autores concluíram que a formação diferenciada de um biofilme sobre vários materiais restauradores indicou um acúmulo inicial ligado a diversos processos específicos.

Em 2002, Auschill *et al.* avaliaram a organização dos microrganismos vivos e mortos no biofilme e sua espessura sobre seis diferentes materiais restauradores, utilizando a combinação da técnica de Fluorescência Vital e Microscopia de Varredura Confocal a Laser. Além disso, compararam a porcentagem da superfície do material coberta por biofilme à espessura e viabilidade do biofilme. Três estudantes foram selecionados para o experimento e receberam dispositivos de acrílico removíveis superiores por um período de cinco dias que continham espécimes padronizados de materiais em sua porção vestibular. Os materiais selecionados para o teste foram: amálgama, ouro, cerâmica, resina composta, compômero e cimento de ionômero de vidro convencional. A viabilidade do biofilme com valores de zero ou extremamente baixos foi verificada no amálgama, ouro, compômero e cimento de ionômero de vidro. Os compósitos mostraram valores entre 4 e 21%, enquanto as cerâmicas entre 34 e 86%. A altura do biofilme variou entre as diferentes amostras de 1 μm (compósito) a 17 μm (amálgama), o que também foi visto para a porcentagem da área de superfície coberta pelo biofilme, em que se obteve 100% do amálgama e 6% dos cimentos de ionômero de vidro. Quando comparados tais parâmetros, não houve um padrão consistente estabelecido entre os materiais. Puderam-se agrupar os metais e os compômeros com alta porcentagem de superfície coberta por um biofilme de células mortas e esparsas, enquanto os compósitos e a cerâmica com uma superfície de cobertura reduzida e biofilme com viabilidade aumentada. Portanto, os autores concluíram que os resultados citados mostraram características de viabilidade específicas do biofilme formado *in vivo* em diferentes materiais dentários. Isto sugeriu que variados materiais, como o amálgama, o ouro, o compômero e o cimento de ionômero de vidro, exerceram uma forte influência sobre a microbiota aderida.

O objetivo do trabalho de Sales *et al.* (2003) foi a medição do fluoreto e de vários cátions liberados por três compômeros e um ionômero de vidro modificado por resina (controle) durante sete dias em água destilada ou solução tampão lactato (pH inicial 4,1). Também verificaram alterações morfológicas na superfície dos materiais ocorridas através de Microscópio Eletrônico de Varredura. Foram confeccionados discos padronizados dos

materiais selecionados. Os meios de imersão foram analisados quimicamente para a determinação das concentrações iônicas de flúor, alumínio, estrôncio, bário e itérbio. Os autores observaram que íons flúor, alumínio e estrôncio foram liberados por compômeros e ionômero em quantidades muito maiores no tampão lactato do que na água destilada. Após as primeiras horas, todos os materiais tiveram seus valores de liberação de flúor diminuídos gradualmente. Quanto ao alumínio, este foi ocasionalmente detectado na água e apresentou mesma tendência que o flúor na solução tampão, com quantidades significativamente maiores para os compômeros do que para o material ionomérico. O estrôncio e o bário liberados de cada material em solução tampão tiveram valores significativamente maiores do que em água destilada, sendo o primeiro em maiores níveis para o compômero e o segundo sem diferença significativa entre compômero e ionômero. A liberação do itérbio não foi detectada. As características de superfície dos discos de materiais imersos no tampão lactato mostraram-se grandemente diferentes das superfícies antes e depois da imersão em água destilada, especialmente para um dos compômeros. Após imersão em tampão lactato, muitas lacunas surgiram pela dissolução das partículas de carga maiores. O cimento de ionômero de vidro apresentou pequenas lacunas e partículas com tamanhos menores após sua imersão. A quantidade cumulativa liberada de cada espécime em função do tempo do experimento mostrou boa linearidade, indicando que a dissolução foi controlada pelo mecanismo de difusão.

Nesta publicação de 2003, Hayacibara *et al.* avaliaram os efeitos dos íons flúor e alumínio liberados de diferentes materiais dentários sobre a formação, composição e produção de ácido em biofilmes compostos por *Streptococcus mutans*. Seis discos com dimensões padronizadas foram preparados de cada material selecionado, entre eles: cimentos de ionômero de vidro convencional e modificado por resina, compômeros e resina composta (controle negativo). Os microrganismos utilizados nesta pesquisa foram os *Streptococcus mutans* GS-5, cujos meios de cultura foram mantidos em contato com os espécimes por sete dias, promovendo a formação de biofilme. Os depósitos tiveram seu peso seco determinado, além de análise química da composição inorgânica e de carboidratos. Os autores verificaram que todos os materiais testados inibiram de forma significativa a queda do pH se comparados ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significante foram observadas no primeiro e segundo dia entre todos os materiais. Todos os espécimes liberaram quantidades maiores de flúor em comparação à resina e, no primeiro dia do experimento, houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais testados. Todos os materiais também liberaram alumínio para o meio durante o período de incubação, embora a quantidade liberada pela

resina não tenha sido encontrada após o segundo dia. Diferenças estatisticamente significante foram observadas entre os materiais. O material que mais liberou íons flúor e alumínio, também mostrou o menor valor de massa de biofilme (peso úmido), enquanto os maiores valores de peso foram vistos nos biofilmes do compômero e da resina. O biofilme do cimento de ionômero de vidro modificado por resina também apresentou menores valores de polissacarídeos insolúveis, com diferença significativa se comparado à resina composta. Correlações positivas foram encontradas entre pH e íons flúor, pH e íons alumínio, e íons flúor e alumínio liberados para o meio. Portanto, tal estudo sugeriu que o alumínio liberado dos materiais dentários exerceu uma importante função na inibição do metabolismo bacteriano e crescimento pela potencialização das atividades biológicas dos íons flúor.

3. DISCUSSÃO

Biofilmes podem ser definidos como comunidades cooperativas e estruturadas de microrganismos, aderidas a superfícies ou interfaces e umas às outras, geralmente embebidas em uma matriz extracelular autoproduzida (Wood *et al.*, 2000; Biofilmes...,2004). Esta estrutura forma-se particularmente de maneira muito rápida em quaisquer sistemas fluidos naturais em que uma fonte regular de nutrientes é fornecida aos microrganismos através de canais, os quais penetram na matriz para também conduzir oxigênio, metabólitos, produtos de excreção e enzimas. Desta forma, os biofilmes possuem profundas implicações para a natureza, medicina e indústria (ver Tabela em Anexos).

A formação do biofilme compreende um ciclo biológico que possui etapas de iniciação, maturação, manutenção e dissolução (O'Toole *et al.*, 2000). Em resposta a sinais específicos do meio ambiente, células bacterianas livres (planctônicas) se aproximam tão intensamente de uma superfície que sua motilidade fica diminuída. Entre estes sinais, poderiam ser citados os nutrientes, a temperatura, a osmolaridade, o pH, o ferro e o oxigênio. As bactérias formam, então, uma associação temporária com a superfície e/ou com outros microrganismos já aderidos, o que lhes permite a fixação. A comunicação entre as bactérias, determinante importante na diversidade e distribuição dos microrganismos no biofilme, ocorreria por meio de sinalização intercelular (ver Figura 1 em Anexos), isto é, produtos bacterianos transportados ativa ou passivamente, e/ou transferência rápida de informação genética, resultando na evolução e surgimento de novos patógenos e táticas de sobrevivência (Biofilmes..., 2004).

Finalmente, um biofilme maduro compreende microcolônias de bactérias em forma de cogumelo que são circundadas por uma matriz de polissacarídeos extracelulares e separadas por canais preenchidos por fluxo (ver Figura 2 em Anexos).

A placa dental humana ou placa bacteriana é um biofilme complexo sujeito às variadas condições do meio bucal, tais como disponibilidade de nutrientes, transições de aerobiose-anaerobiose, alterações de pH e exposições frequentes a substâncias detergentes durante a realização de higiene (O'Toole *et al.*, 2000). Esta placa tem a capacidade de desencadear cárie dental, gengivite e periodontite quando associada aos outros fatores etiológicos destas infecções orais (Biofilmes..., 2004).

O biofilme dentário é constituído por numerosos tipos de bactérias (70% a 80% do peso seco), polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, glicoproteínas salivares, proteínas, pigmentos e restos alimentares (Jorge, 1995;

Marsh & Bradshaw, 1995). Entretanto, sua composição apresenta contínuas mudanças e variabilidade entre diferentes indivíduos, locais da mesma boca e superfícies do mesmo dente, além de uma variação temporal (Mayhall, 1984).

A formação do biofilme dentário pode ser dividida de uma forma bem completa em seis mecanismos (Marsh & Bradshaw, 1995): formação da película adquirida sobre a superfície dentária (a), fase reversível não-específica de interações físico-químicas entre bactérias salivares e película (b), interações moleculares estéreo-químicas específicas de pequena amplitude entre os colonizadores bacterianos primários e as moléculas receptoras do hospedeiro na película (c), adesão de colonizadores secundários aos já aderidos colonizadores primários (d), desenvolvimento de estratificação horizontal e vertical dentro do biofilme em desenvolvimento e aumento da sucessão bacteriana (e) e crescimento e formação de uma comunidade clímax (f).

O biofilme dentário estará envolvido com as doenças bucais quando uma higiene bucal inadequada for mantida, permitindo que se acumule em níveis não compatíveis com a saúde dentária, gengival e periodontal. Por isso torna-se importante a necessidade da remoção mecânica do biofilme por uma eficiente higiene e a ingestão reduzida da sacarose, além de medidas alternativas de prevenção como o uso de agentes antiplaca e antimicrobianos. A clorexidina mostrou-se eficaz na completa inibição da formação de glóbulos compostos por bactérias por três dias sobre a estrutura dentária (Saxton, 1973).

A partir do momento que se pretende relacionar o biofilme dentário com os materiais restauradores odontológicos, deve-se levar em consideração principalmente a mais freqüente consequência desta parceria: a cárie secundária. Esta é a principal causa do fracasso dos procedimentos restauradores, já que nenhum material dentário proporciona um completo selamento do espaço presente entre as paredes do preparo cavitário e o próprio material. Portanto, a presença de propriedades antibacterianas nestes materiais reduziria as propriedades patogênicas do biofilme dentário e a recorrência de lesões cariosas.

Como já citado anteriormente, a adesão do biofilme depende de algumas características da superfície do substrato, tanto dentário quanto restaurador. A Rugosidade de Superfície (Smales, 1981), a Energia Livre de Superfície (Jendresen & Glantz, 1981; Satou *et al.*, 1988) e a composição química (Carlén *et al.*, 2001) são as mais citadas em diversos estudos. Além destes, o tipo de carga (tamanho, proporção e forma das partículas), a porosidade, a manipulação (contaminação), a corrosão e componentes lixiáveis também representam fatores que alteram as propriedades adesivas e características de superfície dos materiais (Nassar *et al.*, 1995).

O aumento na área de superfície produzido pela Rugosidade de Superfície (Ra) determina a retenção de maior número de microrganismos e a proteção destes contra forças de cisalhamento intra-bucais. Esta característica sobrepõe-se muitas vezes à Energia Livre de Superfície e sobre a qualidade química dos materiais e seus elementos liberados. A Ra do cimento de ionômero de vidro pode promover maior acúmulo de biofilme em sua superfície, quando comparado ao amálgama e à resina composta, mesmo apresentando propriedades antibacterianas, como a liberação de íons flúor (Smales, 1981). Entre ligas de amálgama com alto ou baixo teor de cobre (íon com propriedade antibacteriana), também não se evidenciou diferenças quanto a este acúmulo de acordo com sua composição química. Já a cerâmica, *in vivo*, apresenta pouca área de superfície coberta por biofilme de pequena espessura, graças à sua lisura de superfície, entretanto de alta viabilidade, talvez devido à ausência de propriedades antibacterianas por parte deste material. Mesmo assim, cerâmicas polidas apresentam menores valores de contagem total de bactérias/mm² e unidades formadoras de colônia/mm² no biofilme depositado quando comparadas ao esmalte dentário e compósito polido (Auschill *et al.*, 2002). Deve-se observar que o polimento muitas vezes pode prejudicar a característica de lisura de superfície dos compósitos, levando ao acúmulo de maior quantidade de bactérias e proteínas sobre este substrato (Weitman & Eames, 1975; Dummer & Harrison, 1982; Hahn *et al.*, 1993). Além do aumento da Rugosidade de Superfície, nota-se um aumento da Energia Livre de Superfície e da fração de componentes inorgânicos na camada superficial da resina polida (Carlén *et al.*, 2001). O amálgama, quando polido, também pode estar mais propenso à deposição do biofilme, já que a camada superficial mais rica em mercúrio (antibacteriana) é removida (Dummer & Harrison, 1982).

Quanto à Energia Livre de Superfície, existe uma enorme variabilidade de níveis entre os materiais dentários restauradores. Entretanto, assim que expostos à cavidade bucal e cobertos pela película adquirida, as diferentes Esup assemelham-se, generalizando o padrão de formação do biofilme dental sobre variados substratos, mesmo entre metais (alta energia) e polímeros (menor energia) (Jendresen & Glantz, 1981).

A composição química dos materiais restauradores está relacionada às suas propriedades antibacterianas, determinadas pela liberação de alguns elementos de sua estrutura, capazes de afetar o metabolismo das bactérias responsáveis pela patogenicidade do biofilme dentário. Entre eles, citam-se os íons metálicos das ligas de amálgama (Dummer & Harrison, 1982; Dérand & Johansson, 1983; Orstavik, 1985; Netuschil *et al.*, 1996), os íons flúor e alumínio dos cimentos de ionômero de vidro (Svanberg *et al.*, 1990; van Dijken *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*), entre outros. Entretanto, a atividade antimicrobiana é reduzida com o

decorrer do tempo, provavelmente devido à constante lixiviação (Updegraff *et al.*, 1971). Desta forma, ocorre na superfície de ligas de amálgama a formação de uma camada passiva de oxidação, impedindo a continuidade da liberação de íons, principalmente do mercúrio. Conseqüentemente, as restaurações de amálgama mais antigas apresentam maiores concentrações de proteínas e carboidratos na composição dos biofilmes adjacentes a elas (Lyttle & Bowden, 1993).

Diferentes composições de amálgama mostram atividade antibacteriana em todos os casos, através da liberação de cobre, prata e mercúrio em diferentes concentrações, sem relação direta do efeito bactericida com o conteúdo de cobre das ligas (Orstavik, 1985). Tais íons liberados são capazes de interferir na atividade metabólica do biofilme, entretanto, sem impedir sua formação (Lyttle & Bowden, 1993). Os íons flúor, capaz de inibir a glicólise bacteriana e, conseqüentemente, a produção de ácidos pelo biofilme, e alumínio, hábil por inibir as propriedades acidúricas dos *Streptococcus mutans*, tornam o cimento de ionômero de vidro o material de interesse na prevenção de cárie secundária. Já os íons prata, presentes nos cimentos de ionômero de vidro reforçados, apresentam efeito anti-cárie adicional aos cimentos convencionais, quando liberados (Svanberg *et al.*, 1990; Hayacibara *et al.*, 2003). Outra propriedade benéfica dos materiais ionoméricos é o seu efeito tampão em condições de queda de pH. Este fenômeno pode estar relacionado à erosão da superfície destes substratos e à liberação de íons cálcio e alumínio, que desenvolvem uma solução tampão complexa contendo lactato, cálcio, alumínio, poliacrilato, entre outros (Nicholson *et al.*, 2000).

Em contrapartida, os metabólitos do biofilme dentário exercem alterações superficiais nos materiais restauradores, como corrosão, aumento da Rugosidade de Superfície, surgimento de lacunas, entre outros. A exposição de diferentes ligas de amálgama a soluções de ácido láctico com pHs variados promove a liberação de íons em concentrações maiores à medida que o pH torna-se mais baixo. A análise visual de amostras expostas a estas soluções não possibilita estimar o nível de corrosão sofrido, já que não há correlação entre este aspecto e a quantidade iônica liberada (Dérand & Johansson, 1983; Palaghias, 1985). Compômeros e resinas compostas expostos a inóculos de algumas bactérias orais não alteraram o alto consumo de glicose e a alta produção de lactato por esses microrganismos. Além disso, nota-se a presença de defeitos na superfície destes materiais e aumento de rugosidade a partir da corrosão da matriz orgânica destes substratos, levando à exposição das partículas de carga das resinas e deslocamento de tais partículas da matriz dos compômeros (Willershausen *et al.*, 1999). Entre os íons lixiviados destes materiais quando expostos ao ácido láctico destacam-se o flúor, o alumínio, o bário e o estrôncio (Sales *et al.*, 2003). Nos

cimentos de ionômero de vidro, os metabólitos produzidos pelo biofilme provocam a erosão, o aumento de porosidades e a formação de uma camada gelatinosa na superfície. Supõe-se que o pH baixo provoque a difusão de prótons dentro da matriz do cimento, a conversão de grupos ácidos carboxílicos ionizados para sua forma protonada com liberação subsequente de cátions (cálcio e alumínio) e desintegração das cadeias poliméricas. Tais consequências ocorrem em tempos e intensidades variadas de acordo com o tipo de presa que tais materiais possuem (Fano *et al.*, 2001).

Portanto, deve-se realizar uma seleção criteriosa do material restaurador a ser utilizado em determinadas situações clínicas, em que se verifica um possível prejuízo à superfície da restauração e da superfície restaurada pelo acúmulo de biofilme patogênico, capaz de desencadear cárie secundária e aumento da Rugosidade de Superfície do material. Um nível ótimo de higiene bucal deve ser orientado pelo cirurgião-dentista ao paciente em que será realizada a reabilitação bucal, a fim de que se previna a deterioração do tratamento indicado. Além disso, os materiais com propriedades antibacterianas devem ser priorizados em casos de dificuldade de cooperação ao tratamento por parte do paciente, como ausência de cuidados com a higiene bucal e presença de dieta altamente cariogênica, favorecendo a adesão de microbiota patogênica em larga escala.

Há necessidade de mais estudos sobre as interações específicas entre cada material restaurador e o biofilme aderido, a fim de se ampliar a compreensão a respeito dos efeitos que um exerce sobre o outro e possíveis consequências à superfície restaurada e restauradora.

4 CONCLUSÃO

Pela análise da literatura pode-se concluir que:

1. O biofilme dentário possui um mecanismo de desenvolvimento complexo, que inclui a participação de componentes do hospedeiro e dos microrganismos da microbiota oral.

2. As interações específicas presentes nesta estrutura promovem a sucessão bacteriana, determinando a biodiversidade e a divisão em micro-ambientes do biofilme, tornando-o patogênico aos dentes, à gengiva, ao periodonto, além de ser prejudicial à superfície de vários materiais dentários.

3. As características físico-químicas dos materiais restauradores são responsáveis pela variedade na composição e adesão do biofilme sobre tais substratos, tornando o elemento restaurado mais ou menos suscetível à cárie secundária.

a. A Rugosidade de Superfície e a Energia de Superfície contribuem para o acúmulo de biofilme, bem como a localização do material na cavidade bucal, devido às forças de cisalhamento exercidas pelos músculos e saliva, interferindo na adesão bacteriana.

b. A composição química da superfície restauradora pode responsabilizar-se pelas propriedades antibacterianas de determinado material, principalmente através da liberação de íons para o biofilme e para o meio salivar.

4. O efeito das propriedades patogênicas do biofilme decorre principalmente dos metabólitos bacterianos, realizando a corrosão, o aumento da porosidade e da rugosidade na superfície do material, propiciando um aumento na retenção do biofilme. As propriedades de superfície das bactérias são responsáveis por interações específicas com o material.

REFERÊNCIAS *

Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. **Eur J Oral Sci.** 2002; 110: 48-53.

Biofilmes: comunidade de Bactérias. **Colgate Prev News.** 2004; 13(3): 1-3.

Borgström MK, Edwardsson S, Sullivan A, Svensäter G. Dental plaque mass and acid production activity of the microbiota on teeth. **Eur J Oral Sci.** 2000; 108: 412-7.

Bradshaw DJ, Walker JT, Burger B, Gangnus B, Marsh PD. *In vitro* modeling of biofouling of dental composite materials. **Methods Enzymol.** 2001; 337: 416-25.

Brex M, Winkler M, Netuschil L. Human dental plaque formation on plastic films: a quantitative SEM study. **J West Soc Periodontol.** 1994; 42(3): 77-80.

Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and *in vitro* biofilm formation on glass ionomer and composite resin. **Biomaterials.** 2001 Mar; 22(5): 481-7.

Christensen RP, Bangerter VW. Immediate and long-term *in vivo* effects of polishing on enamel and dentin. **J Prosthet Dent.** 1987; 57(2): 150-60.

Cisar JO, Takahashi Y, Ruhl S, Donkersloot JA, Sandberg AL. Specific inhibitors of bacterial adhesion: observations from the study of gram-positive bacteria that initiate biofilm formation on the tooth surface. **Adv Dent Res.** 1997; 11(1): 168-75.

Dérand T, Johansson B. Corrosion of non- γ_2 -amalgams. **Scand J Dent Res.** 1983; 91(1): 55-60.

* De acordo com a norma UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Dummer PMH, Harrison KA. *In vitro* plaque formation on commonly used dental materials. **J Oral Rehabil.** 1982; 9: 413-7.

Eastcott AD, Stallard RE. Sequential changes in developing human dental plaque as visualized by Scanning Electron Microscopy. **J Periodontol.** 1973; 44(4): 218-24.

Fano L, Fano V, Ma WY, Yang GW, Zhu F. Structure of dental glass-ionomer cements by confocal fluorescence microscopy and stereomicroscopy. **Biomaterials.** 2001; 22(17): 2353-8.

Haake SK. Microbiologia periodontal. *In*: Carranza FA, Newman MG. **Periodontia Clínica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997. p. 87-93.

Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Brüch M. Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. **Dent Mater.** 1993; 9(5):312-6.

Hannig M. Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo*. **Eur J Oral Sci.** 1999; 107(1): 55-64.

Hayacibara MF, Rosa OPS, Koo H, Torres SA, Costa B, Cury JA. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. **J Dent Res.** 2003; 82(4): 267-71.

Jendresen MD, Glantz PO. Clinical adhesiveness of selected dental materials: an *in vivo* study. **Acta Odontol Scand.** 1981; 39(1): 39-45.

Jenkins GN. **The Physiology and Biochemistry of the Mouth.** 4. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1978. p. 286-87.

Jorge AOC. **Microbiologia Bucal.** São Paulo: Santos; 1995. p. 31-43.

Krembel J, Frank RM, Deluzarche A. Fractionation of human dental plaques. **Arch Oral Biol.** 1969; 14: 563-5.

Lang NP, Mombelli A, Attström R. Placa e cálculos dentais. *In*: Carranza FA, Newman MG. **Periodontia Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997. p. 66-91.

Listgarten MA. The structure of dental plaque. **Periodontol 2000**. 1994; 5: 52-65.

Lytle HA, Bowden GH. The level of mercury in human dental plaque and interaction *in vitro* between biofilms of *Streptococcus mutans* and dental amalgam. **J Dent Res**. 1993; 72(9): 1320-4.

Marsh P, Martin M. **Oral Microbiology**. 3. ed. Londres: Capman & Hall; 1992. p. 56-97.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. **J Ind Microbiol**. 1995; 15(3): 169-75.

Mayhall CW. Películas não mineralizadas da superfície do esmalte. *In*: Menaker L, Morhart RE, Navia JM. **Cáries Dentárias: Bases Biológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1984. p. 132-48.

Nassar U, Meyer AE, Ogle RE, Baier RE. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. **Periodontol 2000**. 1995; 8: 114-24.

Netuschil L, Brex M, Vohrer KG, Riethe P. Vital fluorescence to asses *in vitro* and *in vivo* the antibacterial effects of amalgams. **Acta Stomatol Belg**. 1996; 93(3): 129-34.

Netuschil L, Vohrer KG, Riethe P, Kasloff Z, Brex M. Antibacterial effects of amalgams on *Mutans Streptococci* in an *in vitro* biofilm test prodedure. **Acta Stomatol Belg**. 1996; 93(2): 73-8.

Nicholson JW, Aggarwal A, Czamecka B, Limanoska-Shaw H. The rate of change of pH of lactic acid exposed to glass-ionomer dental cements. **Biomaterials**. 2000; 21(19): 1989-93.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. **Ann Rev Microbiol**. 2000; 54: 49-79.

Orstavik D. Antibacterial properties of and element release from some dental amalgams. *Acta Odontol. Scand.* 1985; 43(4): 231-9.

Palaghias G. Corrosion of dental amalgams in solutions of organic acids. *Sand J Dent Res.* 1986; 94: 267-73.

Patel M, Tawfik H, Myint Y, Blocklehurst D, Nicholson JW. Factors affecting the ability of dental cements to alter the pH of lactic acid solutions. *J Oral Rehabil.* 2000; 27(12): 1030-3.

Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man: a review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 1-14.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation: an *in vivo* study in man. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 138-44.

Rönström A, Attström R, Egelberg J. Early formation of dental plaque on plastic films: light microscopic observations. *J Periodont Res.* 1975; 10(1): 28-35.

Sá Filho FPG. *Fisiologia Oral*. São Paulo: Santos; 2004. p. 36-67.

Sales D, Sae-Lee D, Matsuya S, Ana ID. Short-term fluoride and cations release from polyacid-modified composites in a distilled water and an acidic lactate buffer. *Biomaterials.* 2003; 24(10): 1687-96.

Satou J, Fukunaga A, Morikawa A, Matsumae I, Satou N, Shintani H. Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restoratives. *J Oral Rehabil.* 1991; 18: 421-9.

Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H, Okuda K. Streptococcal adherence on various restorative materials. *J Dent Res.* 1988; 67(3): 588-91.

Saxton CA. Scanning Electron Microscopy study of the formation of dental plaque. *Caries Res.* 1973; 7(2): 102-19.

Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. *In vitro* bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. **J Oral Rehabil.** 1998; 25(1): 52-8.

Smales RJ. Plaque growth on dental restorative materials. **J Dent.** 1981; 9(2): 133-40.

Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. **J Dent.** 2002; 30: 47-51.

Suljak JP, Reid G, Wood SM, McConnell RJ, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. **J Dent.** 1995; 23(3): 171-6.

Svanberg M, Krasse B, Örnerfeldt HO. *Mutans Streptococci* in interproximal plaque from amalgam and glass ionomer restorations. **Caries Res.** 1990; 24(2): 133-6.

Thylstrup A, Fejerskov O. **Cariologia Clínica.** 3. ed. São Paulo: Santos; 2001. p. 28-67.

Tulberg A. An experimental study of the adhesion of bacterial layers to some restorative dental materials. **Scand J Dent Res.** 1986; 94(2): 164-73.

Updegraff DM, Chang RWH, Joss RW. Antibacterial activity of dental restorative materials. **J Dent Res.** 1971; 50(2): 382-7.

Van Dijken JWV, Kalfas S, Litra V, Oliveby A. Fluoride and *Mutans Streptococci* levels in plaque on aged restorations of resin-modified glass ionomer cement, compomer and resin composite. **Caries Res.** 1997; 31: 379-83.

Wallman-Björklund C, Svanberg M, Emilson CG. *Streptococcus mutans* in plaque from conventional and from non-gamma-2 amalgam restorations. **Scand J Dent Res.** 1987; 95(3): 266-9.

Weitman RT, Eames WB. Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. **J Am Dent Assoc.** 1975; 91: 101-6.

Willershausen B, Callaway A, Ernst CP, Stender E. The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials: an *in vitro* study. **Int Dent J.** 1999; 49: 231-9.

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by Confocal Laser Scanning Microscopy. **J Dent Res.** 2000; 79(1): 21-7.

Yamamoto K, Noda H, Kimura K. Adherence of oral streptococci to composite resin restorative materials. **J Dent.** 1989; 17: 225-9.

Zalkind MM, Keisar O, Ever-Hadani P, Grinberg R, Sela MN. Accumulation of *Streptococcus mutans* on light-cured composites and amalgam: an *in vitro* study. **J Esthet Dent.** 1998; 10(4): 187-90.

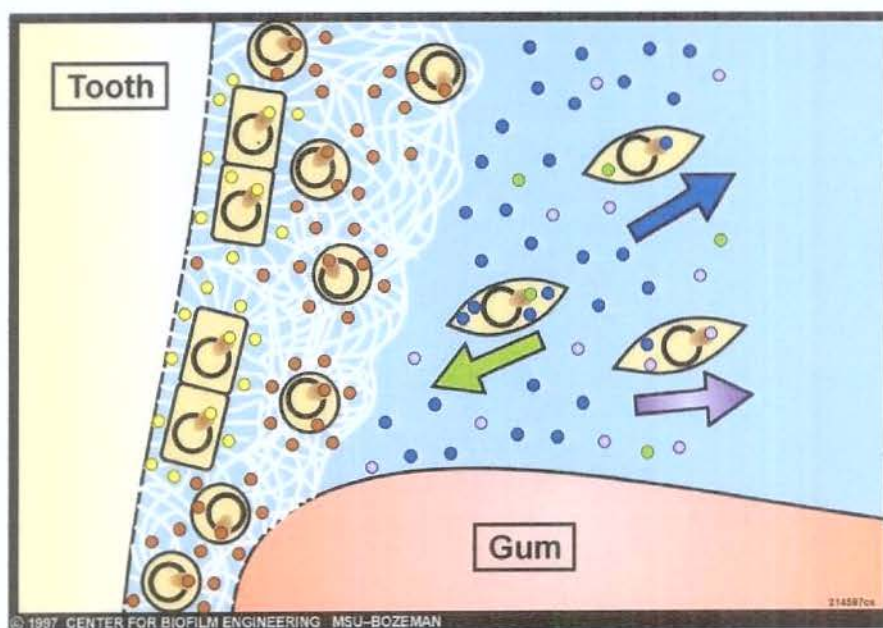
ANEXOS

Tabela: **Biofilmes Prejudiciais**

SISTEMA	IMPACTO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME
Vaso sanitário	Degradação cosmética
Torres de refrigeração de água	Redução de calor e transferência de massa
Permutadores de calor	Redução da transferência de calor
Manufatura de papel	Degradação da qualidade do produto
Processamento de alimentos	Contaminação
Metaloplastia	Degradação do fluido da metaloplastia
Processamento de fotografias	Defeitos de impressão
Osmose reversa	Redução da permeabilidade da membrana, degradação do material
Piscinas	Degradação cosmética, riscos à saúde
Esgotos caseiros	Lentidão no escoamento
Equipamentos de processamento	Corrosão e biodeterioração
Recuperação secundária de óleo	Obliteração dos poços de injeção de água e corrosão
Canos de água para beber	Riscos à saúde
INFECÇÕES MÉDICAS	
Geral	Infecções
Placa dental	Cárie, gengivite, periodontite
Dispositivos implantados: lentes de contato, catéter urinário, catéter vascular, catéter venoso central, catéter Hickman, catéter de diálise peritoneal, “stent” biliar, dispositivo ortopédico, válvula protética cardíaca, marcapasso cardíaco, tubo endotraqueal, tubo nasogástrico, unidades de hemodiálise	Infecções persistentes, endocardite, contaminação, bloqueio do dreno
Infecções crônicas: otite, osteomielite, prostatite bacteriana, infecções do trato biliar, pneumonia, fibrose cística, válvula cardíaca nativa	Infecções persistentes

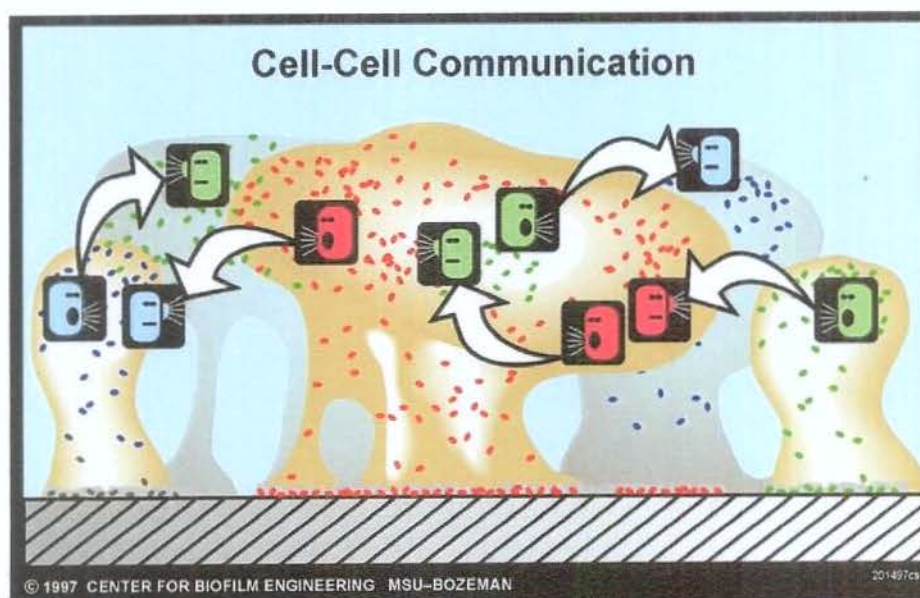
Fonte: Center for Biofilm Engineering at Montana State University – Bozeman, 2004.

Figura 1- Sinalização Molecular



Fonte: Center for Biofilm Engineering at Montana State University – Bozeman, 2004.

Figura 2- Comunicação Intercelular



Fonte: Center for Biofilm Engineering at Montana State University – Bozeman, 2004.