

INALDA MUNIZ DE ALMEIDA

**Estudo «In Vitro» da Flora Acidogênica Desenvolvida em
Bandas Ortodônticas. Ação do Flúor Fosfato Acidulado e do
Cepacol (Cloroeto de Cetilpiridínio)**

Tese apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências
(Ortodontia)

PIRACICABA, SP

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais

JOAQUIM e FLORISA MUNIZ DE ALMEIDA,

base da minha formação, uma homenagem pelo
seu amor, apoio e dedicação sempre presentes

As minhas irmãs IRACI e IVONE,
pelo seu apoio e incentivo
durante o curso

MINHA GRATIDÃO

nt

Ao Professor PEDRO BERTOLINI, Titular
da Disciplina de Microbiologia e
Imunologia desta Faculdade, pela
segura orientação neste trabalho.

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Professor Doutor Manoel Carlos Muller de Araujo, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Ortodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela confiança em nós depositada;
- A Professora Assistente Doutora Norma Sabino Prates, do Curso de Pós-Graduação em Ortodontia desta Universidade, pela amizade, leitura cuidadosa e valiosas sugestões na elaboração deste trabalho;
- Aos Professores Assistentes Doutores Maria Helena Castro de Almeida, Darcy Flávio Nouer e Everaldo de Oliveira Santos Bacchi, do Curso de Pós-Graduação em Ortodontia desta Universidade, pela amizade e formação especializada;
- A Doutora Sônia Vieira, Professora Titular da Disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia desta Universidade, pela inestimável colaboração no desenvolvimento da Análise Estatística;
- Ao Professor Doutor Jaime Cury, pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho;
- Aos Professores Jaime Lanna Marinho e Ricardo Gotardi, da Faculdade de Odontologia de Vitória, da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo estímulo e apoio na realização deste curso;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), que nos possibilitou a realização deste trabalho através de bolsa de estudo;

- A Senhora Ivany do Carmo Guidolim Gerola, Bibliotecária desta Faculdade, pela revisão das referências bibliográficas;
- A Senhora Dirce de Campos Crystal, Técnico em Laboratório, pela elaboração dos meios de cultura;
- Ao Senhor Adário Cangini, responsável pela ilustração fotográfica deste trabalho;
- Aos funcionários do curso Senhoras Maria Scagnolato Fernandes da Silva , Josilena Casati Lodi , Philomena dos Santos Orsini e Senhor Pedro de Oliveira Miguel, pela atenção e amizade no decorrer do curso;
- A Nádía , Maria dos Nascimento , Mittie , Marta , Raquel , José Félix e José Carlos pela amizade e apoio;
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ortodontia, pela manifestação de amizade e compreensão;
- A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Pág.
CAPÍTULO I	
1 - INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO II	
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
CAPÍTULO III	
3 - PROPOSIÇÃO	29
CAPÍTULO IV	
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 - Meios de Cultivo	38
CAPÍTULO V	
5 - RESULTADOS	43
CAPÍTULO VI	
6 - DISCUSSÃO	57
CAPÍTULO VII	
7 - CONCLUSÕES	64
CAPÍTULO VIII	
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DAS FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Dentes incubados em meio de tioglicolato em condições de aerobiose e anaerobiose ...	34
FIGURA 2 - Dente bandado incubado em meio de tioglicolato em condição de anaerobiose, após tratamento com Cepacol	35
FIGURA 3 - Colônias iodofílicas crescidas no meio de Gibbons	36
FIGURA 4 - Colônias acidogênicas crescidas no meio de Handelman	37
FIGURA 5 - Curvograma da porcentagem de Germes acidogênicos que cresceram no meio de Handelman	53
FIGURA 6 - Curvograma da porcentagem de <i>Streptococcus mutans</i> que cresceram no meio ágar-D.S.T.	54
FIGURA 7 - Curvograma da porcentagem de colônias iodofílicas que cresceram no meio de Gibbons	55

CAPITULO I

1 - INTRODUÇÃO

Desde a introdução do aparelho fixo ortodôntico, a descalcificação, manchas e cáries de dentes tem sido constante preocupação para o ortodontista.

Em 1937, GIBBIN¹⁸ salientava a responsabilidade do ortodontista, mostrando que todas as fases do tratamento são importantes e que todo esforço deveria ser feito no tocante ao controle da cárie dentária durante o tratamento ortodôntico. Afirmava ainda que o aparelho ortodôntico em si não seria a causa das cáries, mas um fator importante contribuindo para o aumento das mesmas, dependendo amplamente das condições de higiene bucal do paciente.

Em seu trabalho sobre a manutenção da integridade do esmalte durante o tratamento ortodôntico, BOX¹⁰ em 1940, enfatizava o desempenho do ortodontista num período que normalmente havia grande tendência para o desenvolvimento da cárie dentária.

O aparelho ortodôntico pela sua própria complexidade, pode ser causa ou fator de cárie dentária devido ao elevado número de áreas de retenções introduzidas na boca, dificultando a higienização. Por outro lado deve ser lembrado, que o tratamento ortodôntico normalmente coincide cronologicamente com o período crítico de aumento de cáries durante a adolescência (BACH⁵, 1953).

A descalcificação é passo inicial no desenvolvimento das lesões de cárie e todo esforço deveria ser feito

para prevenir sua formação.

Vários autores tem sugerido a prevenção dessa descalcificação através de uma série de medidas. Em 1953, BACH⁵ recomendava uma técnica correta de escovação e sempre que possível remover os arcos para permitir a escovagem das bandas e da porção exposta dos dentes.

Antes de começar o tratamento ortodôntico o paciente deveria submeter-se a um "check up" dentário, assim como visitar regularmente o dentista para exame e profilaxia, e reduzir o consumo de açúcar (LEVENS³³, 1962).

O ortodontista pode prevenir a desmineralização da superfície dos dentes desde que tome certas medidas como: 1) indicar uma dieta apropriada ; 2) confeccionar bandas bem adaptadas ; 3) empregar técnica correta de cimentação, recimentação regular e contínua verificação de bandas soltas ; 4) restaurar todas as cavidades antes da cimentação das bandas ; 5) aplicação de fluoretos ; 6) instrução e supervisão da higiene bucal ; 7) uso de várias técnicas de cobertura como selantes, vernizes e compósitos ; e 8) uso de colagem direta no lugar da cimentação das bandas (ZACHRISSON⁶², 1976).

Também o tipo de aparelho é importante e o ortodontista deve evitar aparelhos complexos, pois sabemos que os mesmos retêm alimentos, dificultando a higiene bucal (DOLCE¹⁶, 1950 ; QUINN⁴⁶, 1956).

Para prevenir a cárie dentária, o flúor tem sido usado de várias formas. Um dos métodos mais frequentemente

te usado em Ortodontia tem sido a aplicação tópica de fluoretos, principalmente em regiões de águas não fluoretadas. Entre as várias formas no uso do flúor temos: pastas profiláticas, gel, uso de bochechos, tabletes, dentríficos, cimentos, vernizes (ZACHRISSON⁶¹, 1975) e outros métodos, como o uso de elásticos Classe II contendo fluoreto de sódio (ZAPSKI⁶⁶, 1971).

Técnicas de cobertura como selantes, vernizes, e compósitos tem sido usadas, mostrando que os mesmos conferem certa proteção nas superfícies dos dentes antes da colocação do aparelho ortodôntico (HUGHERS²⁵ e colaboradores, 1979; YOUNIS⁶⁰ e colaboradores, 1979).

Vários trabalhos tem sido realizados mostrando a eficiência dos bochechos. Um estudo comparando bochechos de fluoretos de sódio e estanoso mostrou que o efeito antibacteriano do fluoreto estanoso era significativamente mais eficaz que do fluoreto de sódio na redução da população microbiana (ANDRES³ e colaboradores; GROSS & TINANOFF²⁰, 1977). Bochechos com solução de Gluconato de Clorhexidina a 0,2%, semanalmente, em dias alternados ou diários, tem mostrado bons resultados na prevenção da placa bacteriana (GARGIONE¹⁷, 1980). Mais recentemente, ITO²⁸ e colaboradores, em 1980, mostraram que com Cloreto de Cetilpiridínio a 1:2.000 os resultados obtidos no controle dos *Streptococcus mutans* e da placa dental foram excelentes, o que parece válido na prevenção da cárie dental.

Apesar da variedade de recursos no sentido de evitar a descalcificação sob bandas ortodônticas, do cuidado e conhecimento da técnica correta na construção dos aparelhos ortodônticos, existe receio dos profissionais clínicos gerais e dos pais dos pacientes com relação a descalcificação do esmalte dentário durante o tratamento ortodôntico. Assim sendo, propomo-nos estudar "in vitro" a ação tópica do Flúor Fosfato Acidulado e do Cloreto de Cetilpiridínio (Cepacol) sobre a flora acidogênica, em dentes bandados, no sentido de prevenir a formação de placa dentária e descalcificação do esmalte durante o tratamento ortodôntico.

CAPITULO II

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Na literatura dentária encontramos inúmeros trabalhos relatando a alta incidência de cárie, em pacientes sob tratamento ortodôntico.

Em artigo publicado em 1937 , NOYES⁴² relatou que esse fato estaria relacionado com uma higiene bucal deficiente. O autor analisou a incidência de cáries em pacientes durante o tratamento ortodôntico e concluiu que havia um ligeiro aumento, considerado pelo autor resultante de uma maior susceptibilidade à cárie, competência do ortodontista e cuidados do paciente ; bem como as falhas na cimentação para manter a união entre o esmalte e a banda ortodôntica.

Em 1938 , LEFKOWITZ & BODECKER³² relataram que o cimento através de seu componente líquido, que contém uma alta concentração de ácido fosfórico seria o responsável primário pela descalcificação que ocorria sob as bandas ortodônticas.

Baseado no princípio da existência de dois tipos de placa dentária, uma cariogênica e outra não, BOX¹⁰ em 1940, realizou um estudo afim de verificar em que essas placas diferiam e sua importância em pacientes com aparelho ortodôntico fixo. Verificou-se que, em indivíduos susceptíveis e portadores de placa cariogênica, com aparelho ortodôntico, a falta de higiene nas regiões cervicais é acentuada, podendo então favorecer o processo de cárie bem como sua extensão.

Em 1956, QUINN⁴⁶, através de um estudo clínico radiográfico, observou se as cáries progrediam ou não quando se desenvolviam sob bandas ortodônticas. Num período de 3 a 7 meses, os resultados indicavam que a velocidade de evolução das cáries é menor em dentes bandados do que em dentes sem bandas. Isto sugeria papel protetor das bandas cimentadas.

De acordo com BURRIL¹², em 1941, o tratamento ortodôntico e bactérias estão diretamente relacionados com a atividade de cárie. Observou, através de testes químicos e bacteriológicos realizados antes e durante o tratamento ortodôntico, que pacientes extremamente susceptíveis apresentaram menor incidência de cárie durante o período de tratamento; aqueles de baixa susceptibilidade, tenderam a se tornar mais susceptíveis, e o último grupo de susceptibilidade média apresentou resultados variáveis, ocorrendo alterações em ambos os sentidos.

Verificando as modificações na quantidade de bactérias acidófilas após a colocação do aparelho ortodôntico, OWEN⁴⁵, em 1949, concluiu que havia um aumento desses microrganismos associado com maior número de bandas ortodônticas, e que essas contagens não somente eram maiores após o aparelho ter sido colocado, mas também que a população tendia aumentar quanto maior o número de bandas cimentadas nos dentes.

Estudando a relação existente entre incidência de cárie e tratamento ortodôntico, DOLCE¹⁶ em 1950, verificou que a maior ocorrência de cáries não era devida ao aparelho or

ortodôntico ; porém, em certas circunstâncias, este pode exercer grande influência na atividade cariogênica.

Considerando o fato de que a cimentação das bandas é um procedimento técnico normalmente usado no tratamento ortodôntico, e que frequentemente os cimentos tem sido responsabilizados pela descalcificação sob bandas ortodônticas, MEYERS³⁹, em 1952, estudou "in vivo" o efeito de um verniz a base de Copal antes da cimentação das bandas. Usou 548 dentes os quais dividiu em dois grupos: o 1º grupo, do lado direito, constituiu-se de 275 dentes cobertos com verniz antes da cimentação e o 2º grupo, do lado esquerdo de 263 dentes cimentados de maneira convencional. Após seis meses das bandas eram removidas, os dentes limpos e secos eram examinados por observação direta. Dos dentes que haviam recebido o tratamento com verniz antes da cimentação, apenas 5,9% mostraram novos ataques após a remoção das bandas. Do grupo de dentes que não recebeu tratamento antes da cimentação, 27,4% apresentaram novas áreas de descalcificação.

Baseando-se na técnica de BLACK (1924), que usou aparelhos ortodônticos para o estudo de depósitos de cálculos salivares, APPLEMAN⁴ e colaboradores, em 1955, estudaram a composição bacteriana da placa dentária e verificaram que esta parece ser formada sob uma matriz de células epiteliais escamosas, as quais foram inicialmente atacadas por *Micrococcus* e possivelmente *Streptococcus*. Por comparação poucas bactérias do gênero *Lactobacillus* estavam presentes na pla

ca estudada, indicando que, se houve produção significativa do ácido nestas placas, os *Streptococcus* seriam os responsáveis.

Sobre as cáries em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, LEVENS³³, em 1962, observou que o número delas não aumentava necessariamente se fossem observados alguns princípios preventivos, e que ocorreu maior número de cáries nas superfícies linguais e vestibulares dos dentes anteriores, nas áreas não cobertas pelas bandas.

Na tentativa de determinar a diferença existente no número de bactérias acidogênicas e acidúricas presentes em pacientes portadores de aparelho ortodôntico, DIKEMAN¹⁵, em 1962, estudou amostra de saliva de 40 pacientes antes e após a colocação do aparelho ortodôntico, e verificou que a presença dos mesmos aumentou a contagem de *Lactobacillus* e *Stafilococcus*, mas não alterou apreciavelmente a contagem de leveduras e *Streptococcus*.

Observações sobre a incidência de cárie foram realizadas em 66 pacientes que receberam tratamento ortodôntico e 60 pacientes sem tratamento, sendo que nenhuma criança, havia sido submetida a aplicação tópica de flúor anteriormente. Os resultados mostraram que o aumento da incidência de cáries nos pacientes, foi estatisticamente significativo ao nível de 5% e que estas lesões, quanto a sua localização são influenciadas pelo tratamento ortodôntico (INGERVAL²⁷, 1962).

Segundo BLOOM & BLOW⁹, em 1964, as alterações provocadas pelo aparelho ortodôntico levam a um aumento de a-

tividades cariosas após a montagem do aparelho fixo, bem como a uma diminuição logo após a sua remoção. Verificaram ainda uma alteração da microflora oral, tendo sido notada uma correlação positiva entre o número de bandas e o aumento da população microbiana, particularmente de *Lactobacillus*.

O estudo do emprego de fluoretos, sob as mais variadas condições experimentais, tem sido objeto de pesquisa por inúmeros autores, no sentido de verificar seus efeitos sobre a cárie em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. Assim, GURSIN²¹, em 1965, estudou o efeito sobre a solubilidade do esmalte quando usava cimentos com adição de fluoreto estanoso no líquido do cimento e observou uma menor solubilidade do esmalte dentário.

Em 1967, ADAMS² estudou o efeito do aparelho ortodôntico fixo sobre a cariogenicidade, quantidade e morfologia microscópica dos lactobacilos orais. O autor utilizou indivíduos no início e no término do tratamento. Observou que o aparelho ortodôntico fixo alterou o meio bucal, afetando significativamente a morfologia e contagem total dos lactobacilos, em ambos os grupos estudados. Evidenciou também tendência de aumento na atividade cariogênica após a inserção do aparelho fixo e diminuição após remoção do aparelho.

SAKAMAKI & BAHN⁴⁹, em 1968, observaram que a bandagem ortodôntica influiu diretamente no número de Lactobacilos orais. Em indivíduos portadores de bandas, estes microrganismos cresceram preferencialmente sobre as margens da

banda, especialmente na margem gengival, sugerindo que esta região teria sua susceptibilidade à cárie aumentada ; e retornavam ao nível normal após remoção das mesmas.

KRASSE³⁰ e colaboradores, em 1968, encontraram estreptococos indutores de cárie em aproximadamente 80% de pessoas pertencentes a vários grupos populacionais na Suécia. Em um grupo selecionado observou-se uma correlação evidente entre atividade de cárie e número de estreptococos indutores.

Analisando o efeito de bochechos com cloreto de Cetilpiridínio na concentração de 0,045 associado brometo de domifem e Cloreto de Cetilpiridínio a 0,025 após escovação normal, STURZEMBERGER & LEONARD⁵³, em 1969, verificaram que o uso do Cloreto de Cetilpiridínio associado ao brometo de domifem reduziu a formação de placa dentária em 38%, e o uso de Cloreto de Cetilpiridínio a 0,025 reduziu 17%.

Tem sido sugerido que a descalcificação que ocorre no esmalte dentário é devido ao efeito do ácido fosfórico livre no cimento de fosfato de zinco durante a cimentação das bandas. A literatura apresenta-se um tanto confusa neste campo e sem conclusões definidas do possível efeito do ácido fosfórico. WISTH⁵⁸, em 1970, propôs-se estudar o efeito do cimento de fosfato de zinco sobre a superfície do esmalte e medir as diferenças na velocidade de descalcificação, sobre superfícies de esmalte que tinham sido cobertas com cimento de fosfato de zinco, comparadas com superfícies não cobertas.

Os resultados mostraram que a descalcificação sob bandas ortodônticas não era devido a ação do ácido fosfórico do cimento na união banda cimento. Ao contrário, mostraram que as superfícies dos dentes cobertos com cimento de fosfato aumentava a resistência a descalcificação. O período de observação foi de apenas três meses, que é consideravelmente menor do que o período normal, mas é aceitável esperar que a maior descalcificação pela ação do ácido ortofosfórico ocorra nas primeiras semanas após a cimentação. Esse experimento não pode ser diretamente comparado com uma situação clínica.

Usando um plano de irrigação bucal adicionado à escovação diária em indivíduos sob tratamento ortodôntico, HURTS & MADONIA²⁶, em 1970, verificaram uma redução de 86% no total da flora aeróbia da salina e de 66% da contagem de lactobacilos. Os resultados indicaram que a escovação e o uso da irrigação bucal foram mais eficazes na redução da flora microbiana do que apenas a escovação.

Em 1970, MUHLER⁴¹ estudou a incidência de cárie em crianças sob tratamento ortodôntico e crianças que haviam recebido tratamento ortodôntico; porém, sob profilaxia e fluoretação constantes, comparando com o grupo controle que não havia recebido tratamento ortodôntico. Concluiu que aquelas que participavam no programa ortodôntico e receberam terapia de Fluoreto estanoso antes da cimentação das bandas, tiveram um número significativamente menor de cáries com relação aos outros grupos tratados.

Trabalhando com amostras de placa dentária coletadas de indivíduos antes e após a colocação das bandas ortodônticas e arcos, BALENSEIFEN & MADONIA⁶, em 1970, encontraram aumentos estatisticamente significantes na quantidade de placa dentária, conteúdo de Carbohidratos e população microbiana de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus*, enquanto que o pH da saliva apresentava uma queda média de 0,4 unidades. Segundo os autores, o uso do aparelho ortodôntico estimula a troca ambiental que se caracteriza não apenas pelo aumento de placa local, bactérias ou carbohidratos, mas por uma concentração maior dessas substâncias por unidade de massa de placa.

Analisando a incidência de cárie em indivíduos portadores de aparelho fixo ortodôntico, ZACHRISSON & ZACHRISSON⁶³, em 1971, examinaram 123 pacientes ortodônticos que receberam aplicação tópica do Fluoreto de sódio antes, durante e após o período de tratamento ativo e sob rígidas condições de higiene bucal, durante um período de 19 meses. O grupo controle constituiu-se de pacientes que não se submeteram a tratamento ortodôntico, a nenhuma aplicação de fluoretos e não receberam instruções quanto a higiene bucal. Os resultados indicavam que de maneira geral, o número de novas alterações era pequeno, e a incidência total de cáries não foi nitidamente influenciada pelos aparelhos. Por outro lado, a distribuição das lesões foi significativamente diferente nos dois grupos, controle e experimental, ambos com vistas ao dente indi-

vidual e à superfície individual do dente.

Um outro estudo realizado nesse mesmo ano, os mesmos autores⁶⁴ verificaram uma correlação definida entre incidência de cáries e higiene bucal durante o tratamento ortodôntico. Com o aumento médio do Índice de Placa e Índice de Gengivite, houve concomitantemente um aumento quase linear, na média dos valores do Índice de Cárie. Nenhuma correlação definida era observada entre o número de novas lesões de cáries e a idade da criança, ou a duração do tratamento.

Em pesquisa realizada por SHKLAIR⁵² e colaboradores, em 1972, foi determinada a porcentagem de *Streptococcus mutans* em relação ao número total de *Streptococcus* em indivíduos cárie ativos. A prevalência e frequência mais alta de *Streptococcus mutans* ocorreu em amostras tomadas diretamente de lesões de cáries, e somaram 30,9% do total de *Streptococcus* presentes. Esta prevalência de *Streptococcus mutans* diminuiu à medida que as amostras eram obtidas afastando-se das lesões.

De acordo com LOESCHE³⁶ e colaboradores, em 1973, foi determinada a porcentagem de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* "in vivo", na placa dentária interproximal após 5 a 10 dias de aplicação tópica com Flúor Fosfato Acidulado gel ou com placebo gel. Após 6 dias de tratamento com Flúor Fosfato Acidulado, a porcentagem de *Streptococcus mutans* apresentou-se diminuída em 15 dos 17 pacientes, e com o placebo apenas 4 dos 10 pacientes. Após seis semanas de tra

tamento, 13 dos 17 pacientes usando o Flúor Fosfato Acidulado tinham diminuído a porcentagem de *Streptococcus mutans*, enquanto que no grupo placebo apenas 2 dos 9 pacientes mostravam níveis de diminuição. Antes do tratamento existia cerca de 5 a 7% de unidades de colônias de *Streptococcus mutans* e *Sanguis* na placa dentária. Após seis dias de tratamento com Flúor Fosfato Acidulado, havia uma redução de *Streptococcus mutans* de 75% e permanecia nas doze semanas seguintes. Flúor ou placebo não tinham efeito sobre a placa de *Streptococcus sanguis*. Esse estudo mostrou que a aplicação tópica do gel Flúor Fosfato Acidulado podia ter um efeito direto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, os mesmos autores ³⁷, em 1975, estudaram o efeito tópico do Flúor Fosfato Acidulado sobre a porcentagem em placa de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. A média de *Streptococcus mutans* antes do tratamento era cerca de 9% de unidades de colônias formadas na placa oclusal e 1% na placa proximal. O tratamento com Flúor Fosfato Acidulado causou uma redução de 45-75% na porcentagem de *Streptococcus mutans* nas amostras oclusais, mas não teve efeito sobre a porcentagem de *Streptococcus mutans* na placa proximal. Houve uma grande variação individual na porcentagem de *Streptococcus mutans* impedindo a demonstração de diferenças significantes entre Flúor Fosfato Acidulado e o grupo controle, quando foi empregada análise estatística. Ficou estabelecido que o Flúor Fosfato Acidulado

e o grupo controle, quando foi empregada análise estatística. Ficou estabelecido que o Flúor Fosfato Acidulado tinha um efeito específico antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* na placa oclusal, o que não ocorria com a placa proximal. Este efeito foi demonstrado doze semanas após o último tratamento.

Considerando-se, segundo os conhecimentos mais recentes, que a placa dentária é um elemento de capital importância nos mecanismos que determinam o aparecimento da cárie dentária, inúmeras substâncias foram investigadas no sentido de evitar a formação da placa. Dentre essas substâncias usadas encontram-se enzimas, tais como, dextranases (MANDEL³⁸, 1972), antibióticos como Vancomicina (KUSLICK³¹ e colaboradores, 1973 ; JORDAN²⁹ e colaboradores, 1973) , Kanamicina (LOESCHE & NAFE³⁵, 1973), e antissépticos que abrangem desde peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio até compostos orgânicos complexos como as guanidinas. Trabalhos feitos com Clorhexidina mostraram inibir marcadamente a formação de placa e agir eficazmente sobre *Streptococcus mutans* (SCHIOTT⁵⁰, 1973) , o qual segundo se crê desempenha importante papel na formação das cáries de superfícies lisas.

Analisando propriedades antibacterianas de bochechos com Fluoreto Estanoso, a 0,50% e Fluoreto de Sódio, a 0,27%, numa concentração equivalente de íon flúor, ANDRÉS³ e colaboradores, em 1974, verificaram que após cinco horas o uso de bochechos com Fluoreto estanoso foi significativamente

mais eficaz que bochechos com fluoreto de sódio, na redução da população microbiana estudada, ou seja do total de aeróbios, anaeróbios, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivaris*. Os dados também sugeriram que propriedades bactericidas dos bochechos com Fluoreto estanoso podem ser atribuídos mais ao íon estanho do que ao íon flúor.

Em 1974, ABRAMOVICH & SABELLI¹ estudaram o efeito tópico do Fluoreto estanoso sobre a superfície do esmalte. Os dentes incubados durante 14 dias em meio base contendo *Streptococcus mutans* sofreram processo de cárie, com excessão do grupo que recebeu aplicação tópica de Fluoreto estanoso mostrando neste último grupo um efeito protetor do Fluoreto estanoso contra a descalcificação no esmalte dentário.

Através de um exame clínico, HIRSCHFIEL & JOHNSTON²², em 1974, compararam a ação do Flúor orgânico com o Flúor Fosfato Acidulado e com o Fluoreto estanoso. Observaram uma redução na descalcificação do esmalte dentário com o Flúor Orgânico Amino-ácido e com o Flúor Fosfato Acidulado. Com o Flúor orgânico aplicado topicamente, ocorria uma redução significativa na descalcificação do dente abaixo das bandas ortodônticas. O tratamento com 8% de Fluoreto estanoso não produziu diminuição significativa na descalcificação.

Em 1975, HOLBECH²⁴ e colaboradores, realizaram pesquisa clínica sobre a eficácia de um antisséptico bucal a base de Cloreto de Cetilpiridínio e o efeito no acúmulo de placa e índice gengival. Eles usaram um antisséptico bucal

disponível comercialmente sob o nome de Cepacol, que contendo Cloreto de Cetilpiridínio na concentração de 0,050 p/v, usado sob a forma de bochechos após as refeições, três vezes por dia, determinou a redução cerca de 30% no acúmulo de placa, tanto na superfície bucal como na lingual dos dentes. Foi evidenciado também um efeito residual temporário, o qual pareceu limitar-se principalmente às superfícies linguais dos dentes.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, CIANCIO¹³ e colaboradores, em 1975, estudaram o uso de bochechos contendo composto de amônio quaternário (Cepacol), no sentido de determinar seu efeito na redução de formação de placa dentária, na ausência de qualquer outra forma de higiene bucal que não fossem os bochechos. Para esse estudo foram selecionados 35 pacientes de ambos os sexos, com idades entre 25 a 50 anos. Todos os pacientes eram examinados inicialmente para verificar os índices de Placa e Gengival. Os pacientes bochechavam com 20 cc. de cepacol, durante 15 minutos antes e após a primeira e a última refeição, por um período de duas semanas e eram examinados no fim de cada semana. Os resultados desse estudo mostraram que havia um aumento na formação de placa de 72% em pacientes usando placebo e de apenas 36% naqueles que bochecharam com Cepacol.

Em 1975, ZACHRISSON⁶¹ salienta que todas as medidas de prevenção são importantes e podem ser combinadas, mas o uso do Flúor tem apresentado excelentes resultados na

prevenção da cárie dentária. O autor recomenda como procedimento de rotina para os pacientes ortodônticos o seguinte: aplicação tópica de gel Flúor Fosfato Acidulado antes da inserção do aparelho e recimentação regular, bochechos adicionais diários com diluições de Fluoreto de Sódio ou Flúor Fosfato Acidulado e o uso regular de dentrífícios com Flúor durante todo o tratamento ortodôntico.

No ano seguinte, o mesmo autor ⁶² analisando a incidência de cárie e sua severidade em pacientes ortodônticos sob a proteção tópica do Flúor, mostrou que as lesões não aumentavam tanto, porém sua localização diferiu significativamente de pessoas não tratadas ortodonticamente e que as bandas protegiam as superfícies dentárias completamente cobertas, tornando-as menos susceptíveis a desmineralização.

Com a finalidade de determinar o efeito de bochechos com Fluoretos de Sódio e Estano sobre a colonização de bactérias no esmalte dentário, TINANOFF⁵⁵ e colaboradores, em 1976, estudaram "in vivo" a ação desses bochechos uma a duas vezes por dia durante sete dias. As amostras de esmalte eram examinadas em microscópio eletrônico e os autores observaram que o Fluoreto de sódio quando usado uma vez por dia tinha pouca influência sobre a placa desenvolvida em dois dias, mas quando usado duas vezes ao dia um destacamento da bactéria era visto. O Fluoreto Estano usado uma ou duas vezes ao dia reduziu consideravelmente a microflora no início da formação da placa.

Em 1977, GROSS & TINANOFF²⁰ dando continuação aos seus trabalho elaborado em 1976, em que usaram mi-

croscopia eletrônica, adicionaram a esse estudo métodos quantitativos microbiológicos para analisarem o efeito de bochechos de Fluoreto estanoso sobre o desenvolvimento inicial de placa "in vivo". Verificaram que, após bochechos com Fluoreto Estanoso, a quantidade total de bactérias e o número de *Streptococcus* de dois dias de placa eram reduzidos cerca de 98%.

ROCHA BARROS⁴⁷ e colaboradores, em 1976, pesquisaram "in vivo" o efeito do antisséptico Cloreto de Cetilpiridínio a 1:4.000, 1:8.000 e 1:16.000, por meio de 11.520 culturas realizadas a partir de material colhido do sulco gengival e observaram as alterações do número de estreptococos e do número mais provável de enterococos quando decorridos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos da aplicação do antisséptico, comparando-se o número de germes contado em cada um desses tempos, com o número estimado antes da aplicação do antisséptico. Verificaram que as grandes reduções obtidas pela aplicação de solução a 1:4.000 e a 1:8.000 foram semelhantes e consideraram essas reduções como decorrentes da antissepsia. Já a solução de 1:16.000 mostrou comportamento semelhante ao do controle realizado com água destilada. Os resultados obtidos nas condições experimentais relatadas permitiram indicar o Cloreto de Cetilpiridínio a 1:4.000 e 1:8.000, como solução efetiva para antissepsia do sulco gengival, previamente a realização de trabalhos odontológicos que a exijam.

Analisando o efeito do Cloreto de Cetilpiridínio na prevenção da formação da placa dentária, BARNES⁷, e co

laboradores, em 1976 , procuraram verificar se um efeito residual poderia ser demonstrado após o período de duas semanas sem uso de bochechos. Esse autor investigou 120 pacientes adultos, divididos em três grupos num período de 31 dias. Os pacientes do 1º grupo fizeram bochechos com solução de Cloreto de Cetilpiridínio associado a brometo de domifem ; o 2º grupo bochechou com Cloreto de Cetilpiridínio e o 3º grupo com o Placebo. Todos os pacientes que continuaram com sua prática normal de higiene bucal eram examinados três vezes para determinar o Índice de Placa dentária. Esses exames eram feitos um dia antes de iniciar, um dia após o término e 15 dias após os procedimentos dos bochechos. Os autores observaram que o Cloreto de Cetilpiridínio apresentou um efeito parcial na redução da placa existente. O Cloreto de Cetilpiridínio com brometo de domifem foi levemente mais eficaz que o Cloreto de Cetilpiridínio e nenhum apresentou efeito residual significativo após o período de duas semanas sem uso dos bochechos.

Em 1976 , TILLERY⁵⁴ e colaboradores, usaram 132 pré-molares avulsionados e dividiram os mesmos em quatro grupos iguais. O 1º grupo com 33 dentes recebeu aplicação tópica de Flúor Fosfato Acidulado ; o 2º grupo aplicação tópica de Fluoreto Estanoso; o 3º grupo uma camada de polímero adesivo; e o 4º grupo figurou como controle. Adaptaram e cimentaram bandas em cada dente e após a cimentação a união de cimento entre a superfície de esmalte e a banda era quebrada pela ação de um alicate removedor de bandas, deixando a banda solta.

Os quatro grupos de dentes foram imersos em uma gelatina descalcificante durante onze semanas, quando os dentes foram removidos e foram feitos os registros produzidos pela descalcificação. Comparados com os dentes do grupo controle, os dentes tratados com cobertura de polímero adesivo, Flúor Fosfato Acidulado e Fluoreto Estanoso produziram uma redução estatisticamente significativa na descalcificação da superfície dos dentes com bandas soltas. Comparando os três primeiros grupos estudados, verificaram que a técnica de cobertura com polímero adesivo proporcionou maior proteção contra a descalcificação do esmalte dentário.

Segundo TOSELLO⁵⁶, em 1977, que estudou a influência da colocação do aparelho ortodôntico fixo, correlacionando-o com Índice de Gengivite, Índice de Cárie Dentária, Índice de Higiene Oral e pH da saliva, bem como a influência da colocação do aparelho fixo, sobre microrganismos do gênero *Streptococcus*, especialmente *Streptococcus mutans*, a colocação do aparelho ortodôntico fixo determinou: maior Índice de Gengivite, maior número de cáries, porém estatisticamente não significativa, provavelmente em decorrência do curto período experimental; formação de maior quantidade de placa dentária, por dificultar a higienização bucal e grande queda numérica do pH da saliva, diretamente relacionada ao número de bandas do aparelho, e grande aumento do número de microrganismos *Streptococcus mutans*, embora este aumento não tenha alcançado um grau estatisticamente significativo.

Analisando o efeito tópico de soluções de Flúor Fosfato Acidulado e Fluoreto de Sódio sobre a superfície do esmalte dentário "in vitro" quando o principal produto de reação é o Fluoreto de Cálcio, ZHRADNIK⁶⁵ e colaboradores, em 1978, observaram que houve uma redução da desmineralização induzida pela colonização de *Streptococcus mutans*, mas eram ineficazes contra a demineralização por tampão ácido de lactato ; e que o Fluoreto de Cálcio (CaF_2) formado sobre a superfície dos dentes durante o tratamento seria o responsável pela proteção observada.

Em estudo sobre a prevenção da descalcificação durante o tratamento ortodôntico, HUGHES²⁵ e colaboradores, em 1979 , analisaram 120 dentes pré-molares extraídos e com superfície vestibular livre de cáries. Os dentes foram divididos em cinco grupos iguais. O 1º grupo foi tratado com Nuva Seal , o 2º com verniz Copalite , o 3º com material polímero adesivo Protector , o 4º com verniz Veneer Portrait e o 5º viu como controle. Bandas ortodôntidas foram selecionadas e cimentadas em cada dente a esse cimento era quebrado com alicate removedor de bandas. Cada grupo era dividido em três subgrupos com oito dentes e submersos em gelatina descalcificante por 7 , 14 e 21 semanas, quando então as bandas eram removidas e determinada a presença ou ausência de manchas brancas e descalcificação em cada dente. A área de descalcificação era diretamente proporcional a quantidade de tempo que o dente era imerso na solução de gelatina, e após 21 semanas apenas os

dentes do 1º grupo tratados com Nuva Seal continuavam livres de descalcificação.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, YOUNIS⁶⁰ e colaboradores, em 1979, analisaram 120 dentes pré-molares extraídos usando o mesmo material e métodos descrito pelos autores no trabalho anterior e também verificaram que o Nuva Seal provou ser o melhor na proteção do dente contra a descalcificação por 21 semanas.

Em 1979, MIRANDA & PIZSOLITTO⁴⁰, estudaram a eficiência do Flúor na redução de estreptococos orais em quatro grupos de crianças de ambos os sexos na faixa etária de 7 a 13 anos, residentes em diferentes locais. Os grupos 1 e 4 residiam em local cujo abastecimento de água era fluoretada. Sendo o grupo 4 formado de crianças com Índice C. P. O. zero. O grupo 2 ingeria água de poço semi-artesiano sem tratamento, sendo que semanalmente faziam bochechos com solução de flúor, a 0,2%. No grupo 3 as crianças bebiam água de fonte natural sem tratamento. Os autores evidenciaram redução significativa do número de estreptococos no grupo 2 e em menor proporção nos grupos 1 e 4 quando comparados ao grupo 3.

Analisando o efeito de dentríficos contendo Fluoreto Estanoso / Estanho pirofosfato na inibição de placa dentária, durante o tratamento ortodôntico com aparelhagem fixa, OGAARD⁴³ e colaboradores, em 1980, verificaram que devido a dupla ação sobre a placa e o dente, a escovação com esse dentrífico podia ser recomendada como complemento e não como

substituto de outras formas de fluoretos nessa categoria de pacientes.

Em 1980, ITO²⁸ e colaboradores, estudaram a influência de bochechos com soluções de Cloreto de Cetilpiridínio nas concentrações de 0,025% e 0,050% sobre a formação da placa dentária e sobre o Índice Gengival no qual fazia também a contagem do número total de *Streptococcus mutans*. Os pacientes estudados, além da higiene oral costumeira, fizeram bochechos com essas soluções e com um placebo durante uma semana. Um grupo usou bochechos antes e outro após as refeições principais, com 15 ml das soluções ativa e da usada como placebo. Com relação a placa dental, os grupos apresentaram um mesmo comportamento, quer bochechando antes, quer após as refeições. Comparando-se a solução de Cloreto de Cetilpiridínio, a de concentração 0,050% inibiu de forma estatisticamente significativa, a formação de placa dentária. Essa inibição foi acompanhada da redução quantitativa do número de *Streptococcus mutans*. Os demais microorganismos pesquisados não apresentaram alterações numéricas que pudessem ser relacionadas com a ação das soluções. Não foi encontrado nenhum efeito residual do Cloreto de Cetilpiridínio, bem como não foram observados efeitos sobre o Índice Gengival que pudessem ser atribuídos às soluções utilizadas.

SHANNON⁵¹, em 1980, realizou estudo para verificar a ação do Fluoreto de Sódio e Fluoreto Estanoso quando incorporados ao cimento de oxifosfato de zinco, na redução da

solubilidade e aumento da microdureza do esmalte humano. Foram usados um total de 70 dentes humanos pré-molares e cada dente foi seccionado mesiodistalmente, separando superfície vestibular e lingual. Metade do dente era usado como controle e a outra metade recebia o cimento contendo fluoretos nas concentrações de 1.000 , 2.000 ou 4.000 ppm dos dois fluoretos testados. A comparação entre o controle e cimento contendo Fluoreto era sempre feita num mesmo dente. O cimento contendo Fluoreto Estanoso reduziu significativamente a solubilidade nas três concentrações. Os cimentos com Fluoreto Estanoso apresentaram-se mais eficazes que os com Fluoreto de Sódio na dureza da superfície do esmalte. O Fluoreto Estanoso é desta forma mais eficaz que o Fluoreto de Sódio quando usado nos cimentos ortodônticos.

CAPITULO III

3 - PROPOSIÇÃO

No sentido de prevenir a formação de placa e descalcificação do esmalte dentário, durante o tratamento ortodôntico, propomo-nos neste trabalho verificar:

- 1 - As melhores condições de crescimento da flora acidogênica em bandas ortodônticas, nas condições experimentais "in vitro".
- 2 - A prevalência dessa flora em meios de cultivo adequados ao desenvolvimento dos diversos tipos de microrganismos acidogênicos.
- 3 - Os efeitos da solução de Flúor Fosfato Acidulado e do Cloreto de Cetilpiridínio (Cepacol) sobre a referida flora.

CAPITULO IV

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira fase deste trabalho, usamos 16 pré-molares hígidos extraídos de pacientes jovens, com idades variando entre 12 e 15 anos. Os dentes foram separados em grupos de dois e em todos eles foram adaptadas bandas de lâminas 004 x 150 mm, formando anéis de diâmetros muito próximos. A seguir foram amarrados com fio de ligadura 010 mm numa das extremidades de um fio suporte de aço inoxidável com 1,5 milímetro de diâmetro por 10 centímetros de comprimento. Cada um desses conjuntos foi colocado em tubos de ensaio de 200 x 12 milímetros, contendo 10 mililitros de meio de tioglicolado adicionado de Glicose ou de açúcar comum, nas concentrações finais de 0,5% e 4% respectivamente. Nestes tubos semeou-se 1 mililitro de uma diluição de 1 miligrama de material de placa em 10 mililitros de salina levedurada. Esse inóculo foi obtido de raspados de placa dentária de cáries incipientes de três escolares de idades de 10, 11 e 12 anos respectivamente, com índice C.P.O. elevado. Procedeu-se a incubação à temperatura de 37°C. Os dentes colocados na porção superior do tubo permitiram o desenvolvimento de uma flora em condições de aerobiose e os colocados na porção inferior em condições de anaerobiose. Diariamente, os conjuntos de dentes foram transferidos para novos tubos de tioglicolato para manter o crescimento bacteriano em sua fase exponencial e após 3, 5, 9 e 13 dias foram os mesmos submetidos ao seguinte procedimento: os dentes foram removidos do suporte cortando-se os fios de amarrado que amarravam os mesmos, e as bandas de cada deles foram

removidas em condições de assepsia e colocadas separadamente em frascos com pērolas de vidro contendo 10 mililitros de salina levedurada, agitando-se vigorosamente por dois minutos com a finalidade de promover a dispersão das células bacterianas. A seguir procedia-se às diluições decimais até 10^{-10} . Desta última diluição semeávamos 0,1 mililitro em placas de ágar-Sangue para verificar o crescimento da totalidade das espécies bacterianas contidas no material. Da diluição 10^{-7} semeávamos 0,1 mililitro nos meios de Gibbons, D.S.T. e Handelman. A distribuição do material diluído na superfície dos meios referidos, distribuídos em placa de Petri, foi feita com auxílio de uma alça de vidro em "L", com todos os cuidados de assepsia.

A seguir, as placas semeadas em duplicata, foram incubadas em aerobiose e anaerobiose através do Sistema "Gaz Pack". Após 72 horas de incubação fazia-se a contagem das colônias com o auxílio de um microscópio estereoscópico, sob aumento de oito vezes. No meio de D.S.T.-ágar com 40% de açúcar comum foram anotadas as colônias de *Streptococcus mutans* que se caracterizaram essencialmente pelo aspecto de vidro fosco. A identificação do gênero e espécie foi feita através das provas de fermentação do Manitol e Sorbitol na concentração final de 1% no meio básico de C.T.A.-ágar.

As colônias formadoras de polissacarídeos intracelular crescidas no meio de Gibbons, foram identificadas banhando-se a superfície do meio, onde se situavam as colônias,

com solução iodo-iodetadas (Iugol). Aquelas de coloração marrom claro e escuro foram consideradas positivas. As colônias acidogênicas que cresceram no meio de Handelman caracterizavam-se por apresentarem simplesmente halo amarelado pela viragem do indicador, ou halo transparente resultante da descalcificação do fosfato de cálcio dibásico.

A metodologia empregada na segunda fase do trabalho consistiu dos seguintes passos: determinadas as melhores condições de crescimento ou seja uso de açúcar comum como fonte de Carbono e incubação em anaerobiose foram elas empregadas para o estudo da ação de soluções de Flúor Fosfato Acidulado e do Cloreto de Cetilpiridínio (Cepacol) sobre a flora acidogênica.

Para as averiguações pretendidas neste caso, empregamos três grupos de quatro dentes dispostos como na fase anterior, em condição de anaerobiose e em substrato de açúcar comum. O primeiro grupo de dentes foi tratado, antes de iniciar a incubação no meio, por uma solução de Flúor Fosfato ondulado (Na F^1 , 1,23% F^-), de pH 3,0 durante cinco minutos. Os dentes deste grupo e dos demais foram transferidos diariamente para novos tubos com meio de cultura.

Os dentes do segundo grupo foram banhados diariamente em solução de Cloreto de Cetilpiridínio (Cepacol) a 0,050% e logo a seguir, colocados em tubos estêreis por dois minutos e novamente introduzidos no meio contendo tioglicolato.

Os dentes do terceiro grupo foram usados como controle.

Após o 5º dia de incubação procedeu-se à sementeira do material crescido nas bandas ortodônticas, da mesma maneira descrita anteriormente. Para a identificação dos microrganismos e contagens de colônias a metodologia empregada foi semelhante a da primeira fase.

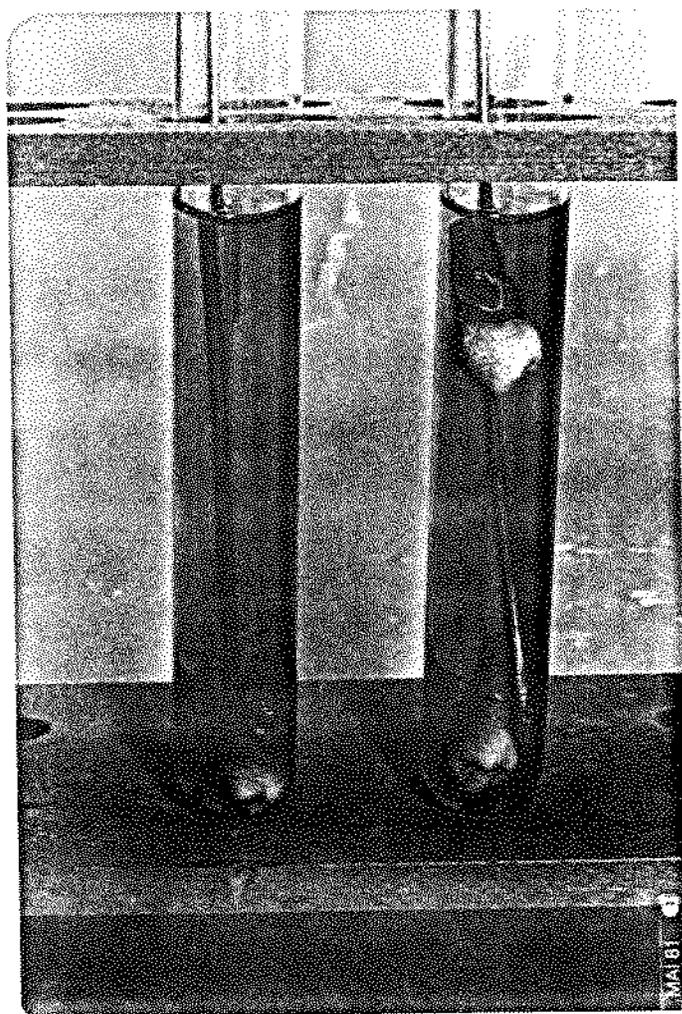


FIGURA 1 - Dentes incubados em meio de tioglicolato em condições de aerobiose e anaerobiose.

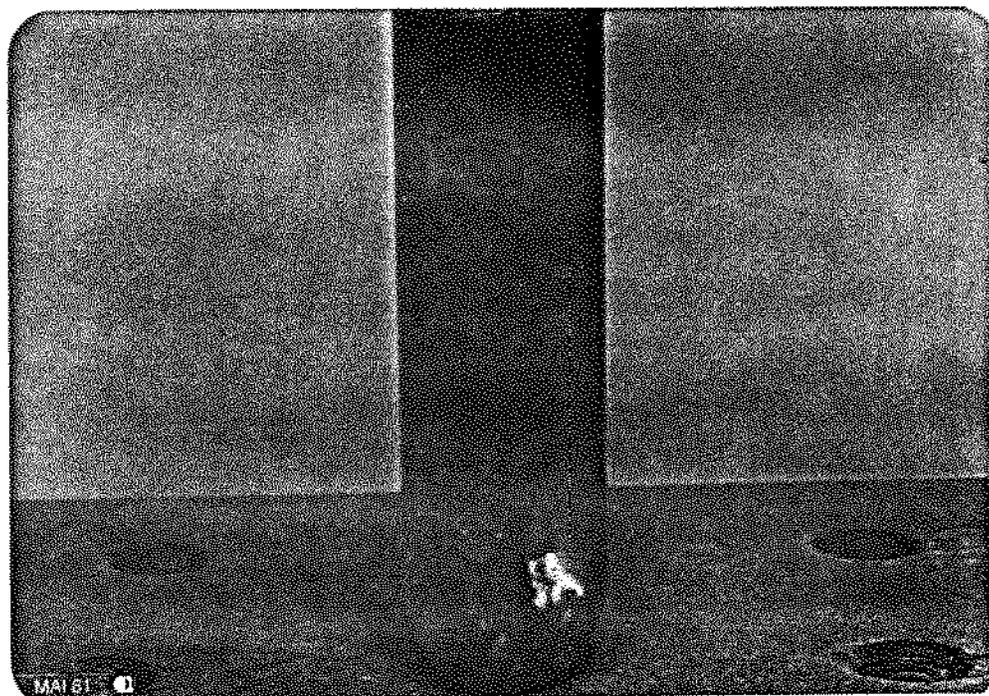


FIGURA 2 - Dente bandado incubado em meio de tioglicolato em condição de anaerobiose, após tratamento com Cepacol. Observar crescimento de flocos aderentes ao conjunto.

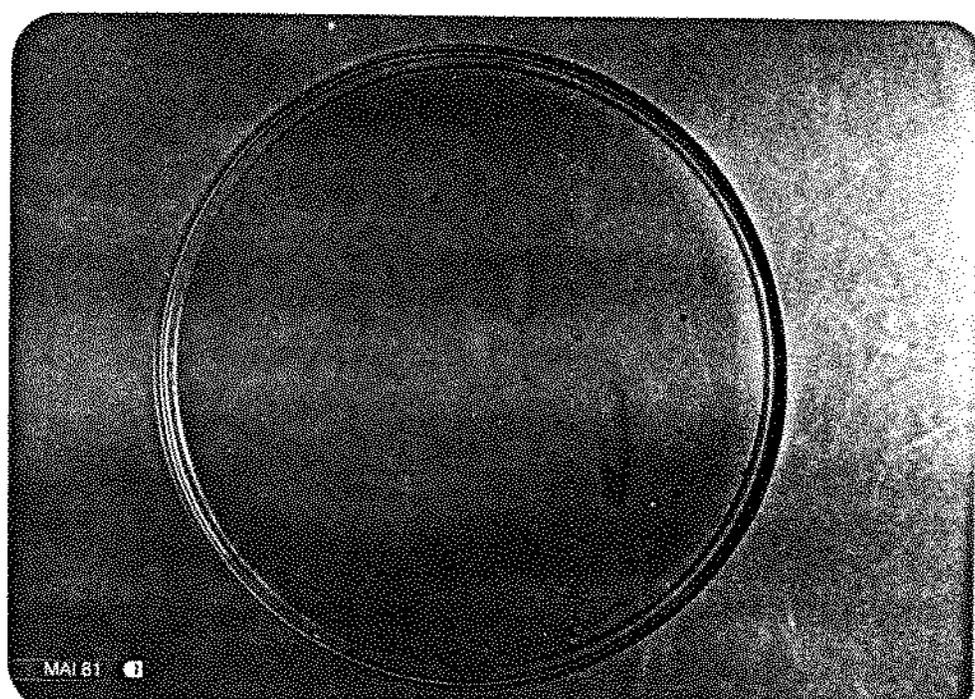


FIGURA 3 - Colônias iodofílicas crescidas no meio de Gibbons.

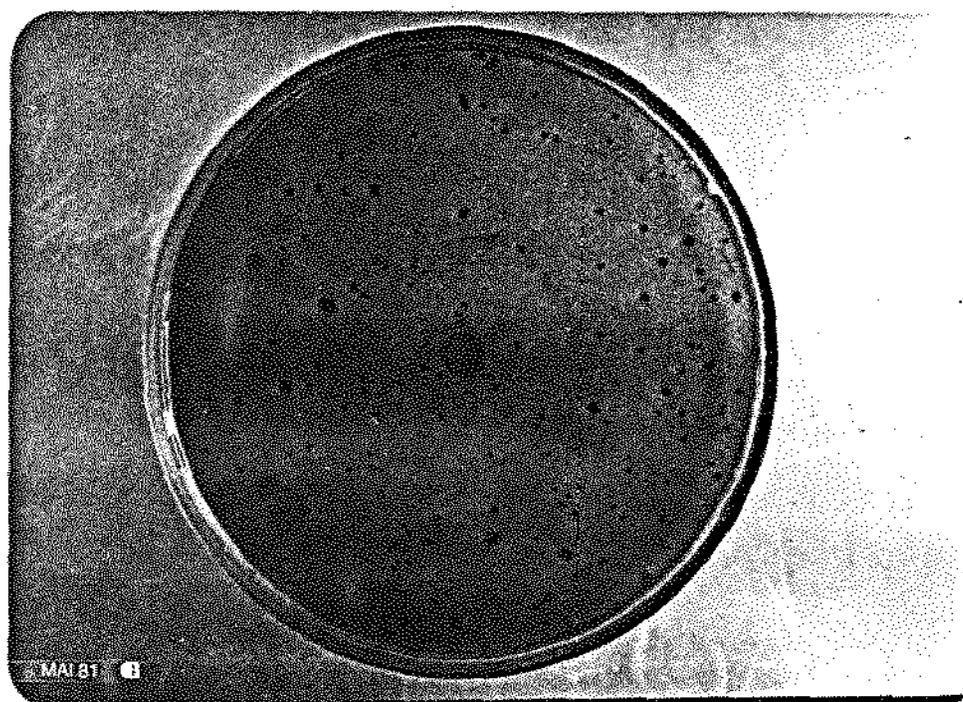


FIGURA 4 - Colônias acidogênicas crescidas no meio de Handelman.

MEIOS DE CULTIVOS USADOS

1 - Ágar-sangue

Infuso de carne (DIFCO)	50 g
Tryptona (DIFCO)	1 g
Cloreto de Sódio (BACKER)	0,5 g
Ágar-ágar (DIFCO)	1,5 g
Água destilada	100 ml

Acertar o pH a 7,2 , esterilizar a 121⁰C por 15' . Deixar esfriar até 45⁰C e adicionar sangue na concentração final de 10% , distribuindo a seguir, em placas de Petri.

2 - Meio de D.S.T. (Oxoid)

Proteose-peptona	1,0 g
Infuso de carne de vitela	1,0 g
Glicose	0,2 g
Açúcar comum (União)	4,0 g
Cloreto de Sódio	0,3 g
Fosfato dissódico	0,2 g
Acetato de Sódio	0,1 g
Sulfato de adenina	0,001 g
Hidrocloreto de guanina	0,001 g
Uracil	0,001 g
Xantina	0,001 g
Cristal violeta	0,00008 g
"Ionagar" nº 2	1,2 g
Água destilada	100 ml

Verificar o pH, esterilizar por 15' a 121⁰C e distribuir em placas.

3 - Meio de Gibbons

Triptona (Oxoid)	2,0 g
Fosfato de potássico (Queel)	0,4 g
Fosfato monopotássico (Queel)	0,1 g
Cloreto de Sódio (BACKER)	0,2 g
Ágar-ágar (DIFCO)	1,5 g
Água destilada	100 ml

Acertar o pH a 7,2 , esterilizar por 15' a 121°C. Refriar a 45°C e adicionar solução de glicose de maneira a obter concentração final de 2%. Distribuir em placas.

4 - Meio básico para a fermentação de carboidrato (CTA - B.B.L.)

Cistina (MERCK)	0,05 g
Trypticase (B.B.L.)	2,0 g
Cloreto de Sódio (BACKER)	0,5 g
Sulfito de Sódio (MERCK)	0,00017 g
Vermelho de fenol (MERCK)	0,00017 g
Ágar-ágar (DIFCO)	0,25 g
Água destilada	100 ml

Acertar o pH a 7,2 , esterilizar a 118°C por 15'. Adicionar, assepticamente soluções de manitol ou sobitol, de maneira a obter concentração final de 1% e distribuir em tubos de ensaio em quantidade de 3 ml.

5 - Solução reveladora de iodo

Iodo metálico (MERCK)	6,2 g
Iodeto de potássio (B. HERZOG)	2,0 g
Água destilada	100 ml

Guardar a solução em frasco escuro.

6 - Meio de HALDELMAN

Nutriente ágar	2,4%
Fosfato monopotássico (QUEEL)	0,12
Fosfato dipotássico (QUEEL)	0,12
Extrato de levedo (DIFCO)	0,5
Glicose (CARLO ERBA)	0,5
Bromocresol púrpura (MERCK)	0,0032
Água destilada	100 ml

O pH foi acertado a 7,2 e o meio esterilizado a 121^oC por 15' e distribuído em placas de Petri. Após a semeadura de diluição do material de placa, cobria-se com uma camada de 10 ml do mesmo meio adicionado de fosfato de cálcio dibásico na concentração final de 8%.

7 - Meio de Tioglicolato

Extrato de carne (DIFCO)	500 g
Cloreto de sódio (BACKER)	5 g
Fosfato dipotássico (QUEEL)	2 g
Proteose peptona (DIFCO)	10 g
Dextrose (CARLO ERBA)	5 g
Tioglicolato de Sódio (DIFCO)	0,5 g
Ágar-agar (DIFCO)	0,5 g
Azul de metileno (DIFCO)	0,002 g

Esterilizar em autoclave por 15(em 15 libras de pressão (121 a 125^oC)

8 - Salina com extrato de levedura

NaCl (BACKER)	8,5 g
Extrato de levedo (DIFCO)	0,5 g
Água destilada	1.000 ml

O pH foi acertado para 7,2 com solução de NaOH normal (N).

A distribuição foi feita na quantidade de 9 ml por tubo de ensaio para as diluições seriadas e 10 ml em frasco contendo p \bar{e} rolas de vidro para homogeneiza \tilde{c} o do material de placa contido na banda.

Esteriliza \tilde{c} o a 121 $^{\circ}$ C por 15 minutos.

CAPITULO V

5 - RESULTADOS

Na primeira fase deste trabalho, procurou-se estabelecer a melhor condição de crescimento de microrganismos acidogênicos desenvolvidos em bandas ortodônticas adaptadas a dentes extraídos, colocados em substratos de Glicose ou Sacarose e inoculados nas condições de aerobiose e anaerobiose. Para isso foram feitas contagens do número de colônias de microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultivo de ágar-sangue , D.S.T.-ágar , Gibbons e Handelman, decorridos diferentes tempos, em dias, após a semeadura (Tabelas 1 , 2 , 3 e 4).

A seguir, para cada meio de cultura, obteve-se a proporção de microrganismos em relação ao número de células viáveis no ágar-sangue. Tais valores expressos em porcentagem, estão apresentados nas Tabelas 6 , 7 e 8 .

Para melhor visualizar os valores obtidos, foram traçados curvogramas, que mostram a porcentagem de microrganismos em função do tempo de semeadura. Tais curvogramas estão apresentados nas Figuras 5 , 6 e 7.

Na segunda fase deste trabalho procuramos estudar o efeito do Flúor Fosfato Acidulado e do Cepacol sobre o crescimento de microrganismos acidogênicos. Com esta finalidade foram obtidos os dados que estão apresentados nas Tabelas 9 , 10 e 11.

Em virtude dos dados serem de contagem, conforme podemos visualizar nas Tabelas 9 , 10 e 11 , foram feitas

análises de variância, considerando-se a raiz quadrada desses dados, para cada meio. Tais análises encontram-se nas Tabelas 12 , 13 , 14 e 15.

Os valores de F , obtidos através dessas análises, são todos significantes ao nível de 5%.

Aplicou-se então o teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para comparação de médias. Com base nas contagens obtidas, foram calculadas as médias, em termos de raiz quadrada, apresentadas na Tabela 16. Nessa Tabela também constam as diferenças mínimas significantes (D.M.S.), obtidas através do teste de Tukey.

TABELA 1 - Número de colônias de microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultivo de ágar-Sangue , D. S.T. - ágar, Gibbons e Handelman , após dois dias de semeadura

Condições de cultivo	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
Glicose Aero	245	22	59	84
Glicose Anaero	221	18	57	77
Açúcar Aero	147	36	45	80
Açúcar Anaero	136	84	22	82

TABELA 2 - Número de colônias de microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultivo de ágar-Sangue , D. S.T. - ágar, Gibbons e Handelman , após cinco dias de semeadura

Condições de cultivo	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
Glicose Aero	253	30	78	120
Glicose Anaero	279	20	64	79
Açúcar Aero	165	42	70	92
Açúcar Anaero	147	85	65	98

TABELA 3 - Número de colônias de microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultivo de ágar-Sangue , D. S.T. - ágar, Gibbons e Handelman , após nove dias de semeadura

Condições de cultivo	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
Glicose Aero	351	38	85	131
Glicose Anaero	347	29	78	105
Açúcar Aero	278	48	83	115
Açúcar Anaero	254	105	72	110

TABELA 4 - Número de colônias de microrganismos que se desenvolveram nos meios de cultivo de ágar-Sangue , D. S.T. - ágar, Gibbons e Handelman , após treze dias de semeadura

Condições de cultivo	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
Glicose Aero	427	104	104	154
Glicose Anaero	379	97	97	143
Açúcar Aëro	325	101	100	135
Açúcar Anaero	314	89	89	122

TABELA 5 - Células viáveis que cresceram no meio de ágar-Sangue em diferentes condições de cultivo

Condições Semeadura	Glicose		Açúcar comum	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
10 (20 dia)	245	221	147	136
20 (50 dia)	253	279	165	147
30 (90 dia)	351	347	278	254
40 (130 dia)	427	379	325	314

TABELA 6 - Porcentagem de germes acidogênicos que cresceram no meio de Handelman em relação ao número de colônias viáveis que cresceram no ágar-Sangue

Condições Semeadura	Glicose		Açúcar comum	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
10 (20 dia)	34,98	34,84	54,42	60,29
20 (50 dia)	47,43	28,32	55,76	66,67
30 (90 dia)	37,32	30,26	41,37	43,31
40 (130 dia)	36,06	37,73	41,54	38,54

TABELA 7 - Porcentagem de *Streptococcus mutans*, que cresceram no meio D.S.T. , em relação ao número de células viáveis que cresceram no ágar-Sangue

Condições	Glicose		Açúcar comum	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
1º (2º dia)	8,98	8,14	24,49	61,76
2º (5º dia)	11,86	7,17	25,45	52,82
3º (9º dia)	10,83	8,36	17,27	41,34
4º (13º dia)	24,35	25,59	31,08	28,34

TABELA 8 - Porcentagem de colônias iodofílicas que cresceram no meio de Gibbons, em relação ao número de colônias viáveis que cresceram no ágar-Sangue

Condições	Glicose		Açúcar comum	
	Aerobiose	Anaerobiose	Aerobiose	Anaerobiose
1º (2º dia)	24,08	25,79	30,61	16,18
2º (5º dia)	30,83	22,94	42,42	44,22
3º (9º dia)	24,22	22,48	29,86	28,35
4º (13º dia)	24,36	25,59	30,77	28,34

TABELA 9 - Contagens de microrganismo submetidos a ação do Cepacol de acordo com os meios de cultivo

Dente	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
1	135	0	0	18
2	246	0	7	19
3	150	0	4	16
4	200	2	6	12
Total	731	2	17	65

TABELA 10 - Contagens de microrganismos submetidos a ação do Flúor Fosfato Acidulado de acordo com os meios de cultivo

Dente	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
1	160	3	20	15
2	164	5	35	31
3	163	1	32	30
4	141	3	33	28
Total	628	12	120	104

TABELA 11 - Contagens de microrganismos de acordo com os meios de cultivo, no grupo de dentes controle

Dente	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
1	242	28	52	32
2	271	35	79	40
3	231	12	28	27
4	410	25	53	40
Total	1.154	100	212	139

TABELA 12 - Análise de variância para a raiz quadrada dos dados obtidos no meio de ágar-Sangue

Causas de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	2	42,02	21,01	7,02 *
Resíduo	9	26,94	2,99	
Total	11	68,96		

(*) Significativo ao nível de 5%

40201 BC

TABELA 13 - Análise de variância para a raiz quadrada dos dados obtidos no meio D.S.T.

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	2	44,12	22,06	35,89 *
Resíduo	9	5,53	0,61	
Total	11	49,65		

(*) Significativo ao nível de 5%

TABELA 14 - Análise de variância para a raiz quadrada dos dados obtidos no meio de Gibbons

Causas de variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	2	60,73	30,36	22,38 *
Resíduo	9	12,21	1,35	
Total	11	72,94		

(*) Significativo ao nível de 5%

TABELA 15 - Análise de variância para a raiz quadrada dos dados obtidos no meio de Handelman

Causas de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	2	6,94	3,47	9,52 *
Resíduo	9	3,28	0,36	
Total	11	10,22		

(*) Significativo ao nível de 5%

TABELA 16 - Média da raiz quadrada das contagens, nos diferentes meios e sob a ação das soluções empregadas e diferença mínima significante, para a comparação de médias

Soluções	Meios de cultivo			
	A. Sangue	D.S.T.	Gibbons	Handelman
Cepacol	13,42	0,35	1,77	4,02
Fluor	12,52	1,68	5,45	5,05
Controle	16,86	4,92	7,17	5,88
D.M.S.	3,42	1,55	2,30	1,19

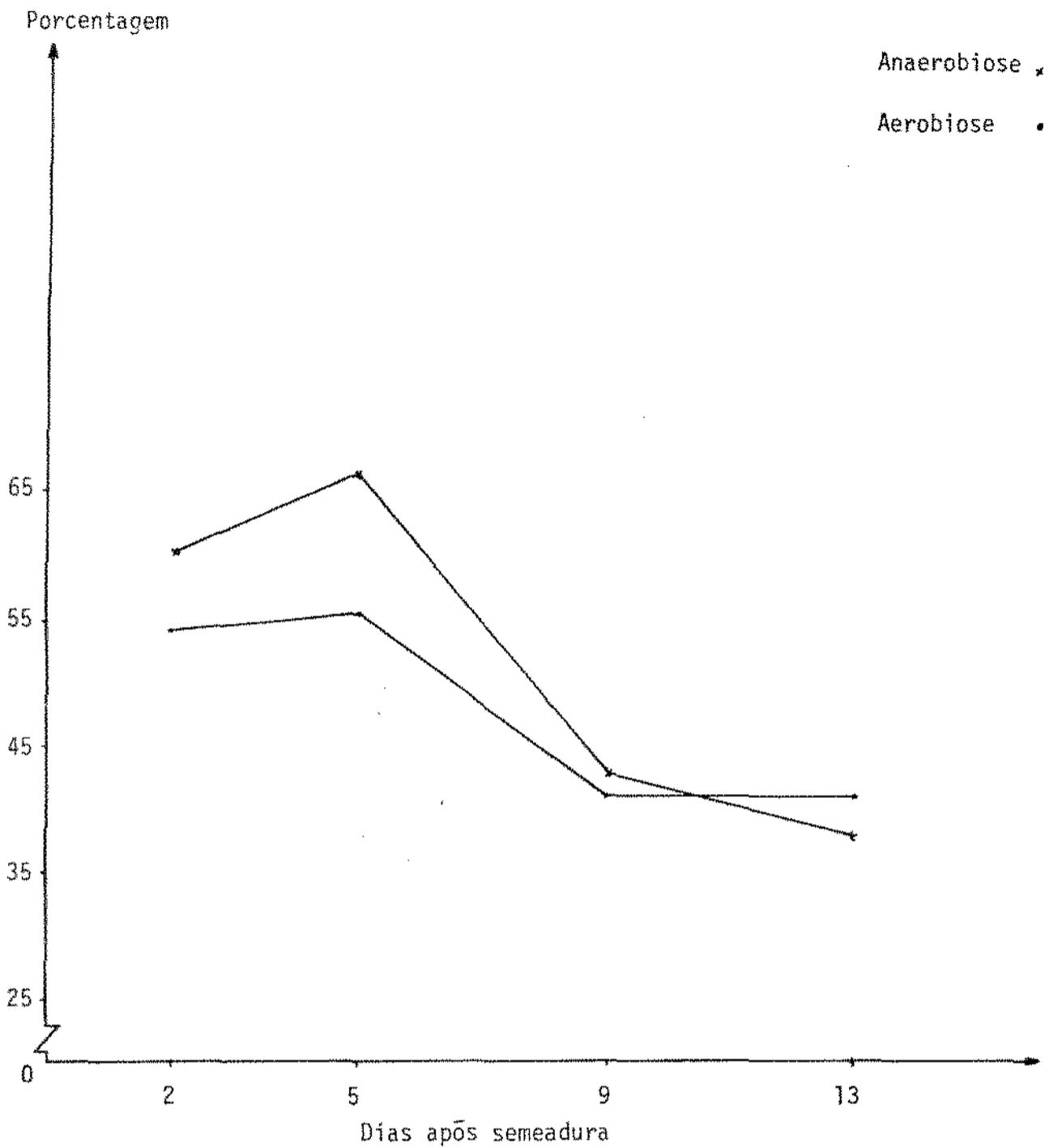


FIGURA 5 - Curvograma da porcentagem de Germes acidogênicos que cresceram no meio de Handelman, usando o açúcar comum como substrato, em relação ao número de colônias viáveis que cresceram no ágar-Sangue, em função do tempo de sementeira.

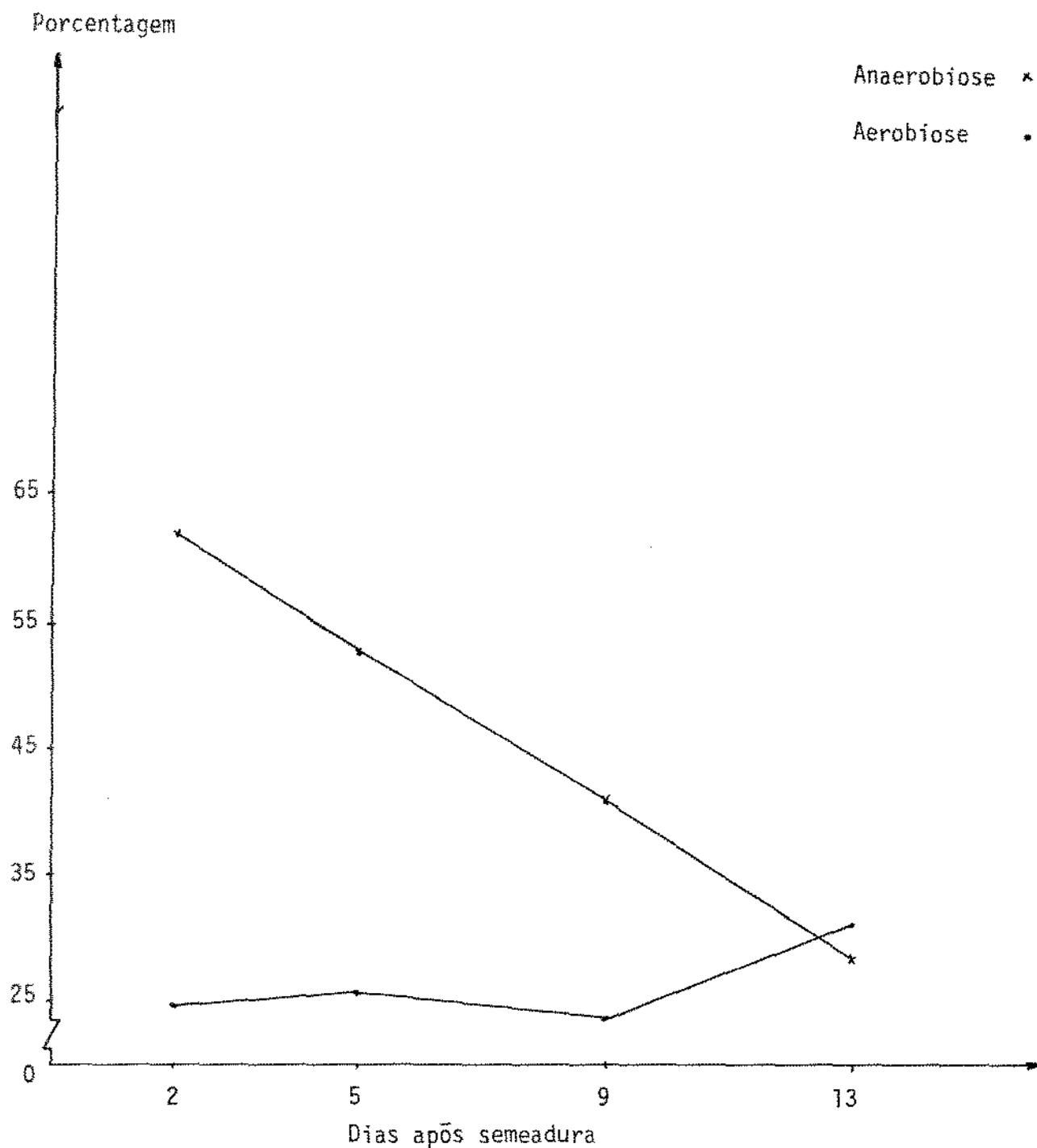


FIGURA 6 - Curvograma da porcentagem de *Streptococcus mutans* que cresceram no meio ágar - D.S.T., usando açúcar comum como substrato, em relação ao número de colônias viáveis que cresceram no ágar Sangue, em função do tempo de sementeira.

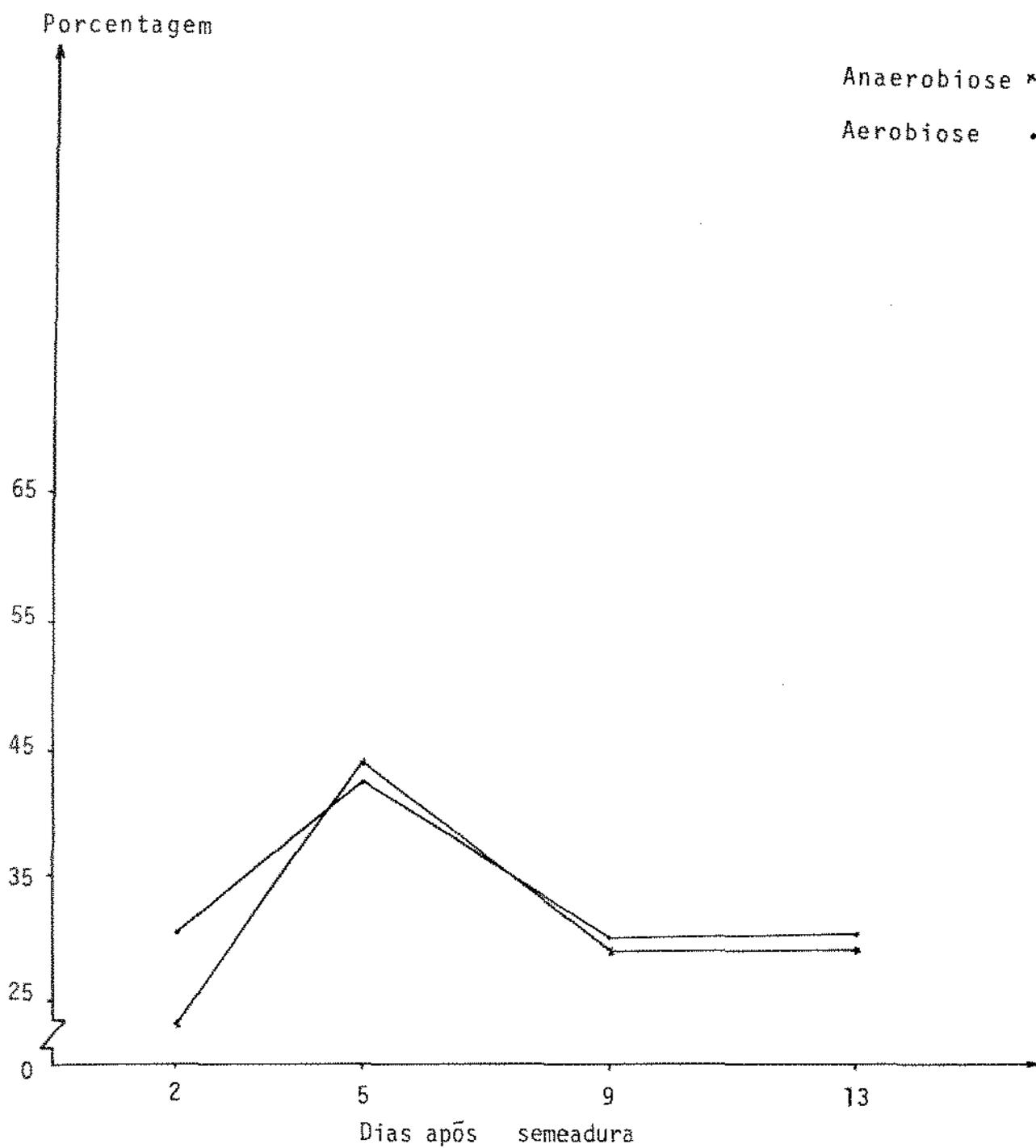


FIGURA 7 - Curvograma da porcentagem de colônias iodofílicas que cresceram no meio de Gibbons, usando açúcar comum como substrato, em relação ao número de colônias viáveis que cresceram no ágar Sangue, em função do tempo de sementeira.

CAPITULO VI

6 - DISCUSSÃO

Na primeira fase deste trabalho procuramos verificar quais as melhores condições de desenvolvimento da flora acidogênica que se desenvolve em bandas ortodônticas. Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, podemos observar o número de colônias que se desenvolveram nos meios de cultivo empregados, após 2, 5, 9 e 13 dias de semeadura.

Considerando que os crescimentos ocorreram em toda superfície da banda, os cálculos foram feitos em função do número total de colônias crescidas no ágar-Sangue.

Na Tabela 5, podemos verificar que no meio de ágar-Sangue, onde se desenvolvem quase todos os tipos de microrganismos, o aumento de germes ocorre de dia para dia. Isso é explicável pelo fato que a passagem diária dos dentes para novo meio permite um inóculo de bactérias num estágio de fase exponencial de crescimento. Podemos notar que houve maior crescimento de microrganismos em todos os meios até o 13º dia, período final das observações.

No meio de Handelman (Tabela 6), os germes acidogênicos, onde se pode incluir lactobacilos, estafilococos e leveduras, apresentaram de um modo geral crescimento mais intenso após o 5º dia, decrescendo até o 9º dia, mantendo-se em níveis mais ou menos semelhantes até o 13º dia de semeadura (Figura 5). Ainda no referido meio, o crescimento em anaerobiose e com açúcar comum foi mais pronunciado do que nas demais condições de cultivo.

OWEN⁴⁵ , DIKEMAN¹⁵ , BLOOM & BLOWN⁹ e ADAMS² , também verificaram aumento estatisticamente significativo de lactobacilos orais antes e após a terapia ortodôntica. Acreditavam que este fato ocorria devido ao aparelho ortodôntico dificultar a higiene, modificando o ambiente bucal e aumentando a atividade de cáries por meio da concentração de lactobacilos na saliva.

A análise do crescimento de *Streptococcus mutans* , detectada pela semeadura em D.S.T. - ágar com 40% de açúcar comum (Tabela 7), indica que inicialmente houve uma contagem elevada demonstrando grande número desse germe em relação a flora total, quando a incubação era feita em condições de anaerobiose após o 2º dia de semeadura. A seguir, o número de células decresceu consideravelmente. O crescimento em aerobiose foi baixo desde o início, permanecendo mais ou menos no mesmo nível até o 9º dia, para aumentar nas culturas até o 13º dia de semeadura ; houve portanto uma variação no crescimento de *Streptococcus mutans* dentro de certos limites, menor porém que o crescimento em anaerobiose (Figura 6).

Considerando-se que nos mecanismos de formação de placa inicialmente há elevada incidência de microrganismos do gênero estreptococos e que após o 2º dia a flora da placa se diversifica sobremaneira, parece-nos lícito afirmar, através visualização das Figuras 5 , 6 e 7 , que "in vitro" ocorrem os mesmos mecanismos de formação e desenvolvimento de placa evidenciados em dentes de indivíduos. Uma relação nítida

entre aumento do número de *Streptococcus mutans* e cárie dentária tem sido estabelecida por KRASSE³⁰ e colaboradores.

No meio de Gibbons (Tabela 8), o número de colônias sintetizadoras de polissacarídeo intracelular, nas condições de anaerobiose, aumentou consideravelmente após o 5º dia, diminuiu após o 9º dia e houve ligeiro aumento após o 13º dia de semeadura (Figura 7).

O número de bactérias que acumulam polissacarídeo intracelular tem sido relacionado com a atividade cariogênica. GIBBONS¹⁹ verificou que nos indivíduos cárie-sensíveis a porcentagem de microrganismos capazes de sintetizar amilopectina, isolados de placa dentária, é cerca de 54% e nas cárie-resistentes de 29%.

BALESNEIFEN & MADONIA⁶ notaram que a placa dentária em pacientes ortodônticos apresentava aumento estatisticamente significativa na população microbiana de *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis*. Como estas bactérias são sintetizadoras de amilopectina, a ocorrência delas em crescimento elevado no meio de Gibbons indica a importância dos nossos resultados.

Na segunda parte deste trabalho, estudamos a influência do Cepacol e do Flúor Fosfato Acidulado, sobre os microrganismos estudados (Tabelas 9 e 10).

Baseados nos nossos resultados obtidos na primeira fase deste trabalho, através dos quais evidenciamos que no açúcar comum, em condições de anaerobiose, ocorria maior

crescimento de microrganismos quando comparado à glicose e em condição de aerobiose ; repetimos os mesmos procedimentos usando bandas adaptadas a dentes colocados em condição de anaerobiose e em caldo de tioglicolato com 5% de açúcar comum.

A seguir, usando a raiz quadrada dos dados apresentados nas Tabelas 9 , 10 e 11 , foram elaboradas as análises de variâncias, segundo os meios empregados (Tabelas 12, 13 , 14 e 15). Comparando as médias da raiz quadrada das contagens obtidas, o teste de Tukey permitiu estabelecer que o número de microrganismos crescidos nos meios ágar-Sangue e D. S.T. - ágar foi, em média, significativamente maior nos dentes do grupo Controle que nos tratados com Cepacol e Flúor Fosfato Acidulado (Tabela 16). Esse resultado indica que tais substâncias exercem uma ação que impede o crescimento de uma ou mais espécies de bactérias. Com relação ao Flúor pode ocorrer uma redução na produção de ácidos (COX & LEVIN¹⁴ , WHIGHT & JENKINS⁵⁹ , redução da solubilidade do esmalte dentário (LILIEHAL³⁴ , inibição da adsorção do dextrano à hidroxapatita (ROLLA⁴⁸) , ação direta de fluoretos sobre bactérias de placa à superfície dos dentes (BIBY & VAN KESTEREN⁸).

Os resultados apresentados na Tabela 16 parecem concordar com os obtidos "in vitro" por ZAHRADINIK⁶⁵ e colaboradores, que observaram redução da desmineralização induzida pela colonização de *Streptococcus mutans* sobre o esmalte dentário pela qual seria responsável o Fluoreto de Cálcio formado sobre a superfície dos dentes, durante o tratamento.

O Flúor Fosfato Acidulado nas condições experimentais desse trabalho, também determinou redução no número de bactérias armazenadoras de polissacarídeo intracelular. Segundo HODGE & SCHNICIDER²³, o Ion Flúor combinando-se com o esmalte inibiria sistemas vitais de enzimas, inclusive aqueles responsáveis pela produção de polissacarídeo intracelular.

No meio de Gibbons as contagens de colônias iodofílicas obtidas em dentes tratados com Cepacol foi, em média, significativamente menor que nos tratados com Flúor e nos do grupo Controle. No meio de Handelman, as contagens de germes acidogênicos feitas em dentes tratados com Cepacol foram, em média, significativamente menores que as obtidas em dentes do grupo Controle (Tabela 16).

Observando os resultados que constam na Tabela 16, verificamos que, em todos os meios empregados, o Cepacol usado em banhos diários determinou redução estatisticamente significativa da flora pesquisada. O número total de microrganismos diminuiu consideravelmente em relação ao do grupo Controle, bem como nos dentes submetidos à ação do Flúor Fosfato Acidulado. Essa redução também foi evidenciada por HOLBECH²⁴ e colaboradores e ITO²⁸ e colaboradores empregando soluções de Cepacol na concentração de 0,050%.

Segundo BURNETT¹¹ e colaboradores, o Cloreto de Cetilpiridínio parece atuar sobre a membrana celular bacteriana, favorecendo a saída de enzimas e metabólitos essenciais. Por outro lado, para ITO²⁸ e colaboradores o efeito anti-pla-

ca ocorreria por ligações da sua carga positiva com a negativa das bactérias em pH fisiológico, alterando a barreira osmótica da membrana celular.

A redução da flora estudada reflete-se no mecanismo de formação da placa dentária. Dentro desse raciocínio, os nossos resultados seriam concordantes com os de STURZEMBERGER & LEONARD⁵³ que usaram Cloreto de Cetilpiridínio na concentração de 0,025% e observaram uma redução na formação de placa de 17%.

CIANCIO¹³ e colaboradores também usaram em seus trabalhos bochechos com Cepacol na ausência de qualquer outra forma de higiene bucal, antes e após a primeira e a última refeição. Os autores mostraram aumento na formação de placa de 72% em pacientes usando placebo e de apenas 36% naquelas que usaram Cepacol.

Devemos assinalar ainda como fato a ser investigado, que nos dentes tratados com Cepacol, verifica-se um crescimento sob forma de flocos nas superfícies dos mesmos.

Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, mostrando a eficiência do Cepacol na redução de microrganismos acidogênicos da placa dentária em bandas ortodônticas, sugerimos o seu uso sob forma de bochechos diários durante o tratamento ortodôntico ou ainda o uso da aplicação tópica do Flúor Fosfato Acidulado antes da cimentação das bandas e bochechos diários com Cepacol.

CAPITULO VII

7 - CONCLUSÕES

Pela discussão dos resultados obtidos nas duas fases desta pesquisa "in vitro", podemos concluir que:

- a - Em bandas ortodônticas adaptadas a dentes humanos, cultivados em condições de aerobiose e anaerobiose desenvolveu-se flora acidogênica mais numerosa em anaerobiose e presença de sacarose.
- b - Essa flora "in vitro", atinge um máximo de crescimento cinco dias após a semeadura para depois diminuir.
- c - O tratamento com Cloreto de Cetilpiridínio (Cepacol) de dentes "in vitro", revelou-se eficiente na redução de células viáveis de microrganismos, do número de colônias de *Streptococcus mutans*, do número de colônias iodofílicas e de germes acidogênicos, enquanto que o tratamento com Flúor Fosfato Acidulado revelou-se eficiente apenas na redução de células viáveis de microrganismos e do número de colônias de *Streptococcus mutans*.

CAPITULO VIII

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABRAMOVICH, A. & SABELLI, C. A. Action of *Streptococcus mutans* on dental enamel pretreated with stannous fluoride. J. dent. Res., 53: 94-7, 1974.
- 2 - ADAMS, R. J. The effects of fixed orthodontic appliances on the cariogenicity, quantity and microscopic morphology of oral lactobacilli. J. oral Med., 22: 88-98, 1967.
- 3 - ANDRES, C. J. *et alii*. Comparason of antibacterial properties of stannous fluoride and sodium fluoride mouthwashes. J. dent. Res., 53: 457-60, 1974.
- 4 - APPLEMAN, M. D. *et alii*. The use of an orthodontic appliance as a means of studying the undisturbed Flora of the teeth. Br. dent. J., 99: 331-34, 1955.
- 5 - BACH, E. N. Incidence of caries during orthodontic treatment. Am. J. Orthod., 39: 756-78, 1953.
- 6 - BALENSEIFEN, J. W. & MADONIA, J. V. Study of Dental Plaque in Orthodontic Patients. J. dent. Res., 49: 320-4, 1970.
- 7 - BARNES, G. P. *et alii*. Effects of two cetylpyridinium chloride containing mouthwashes on bacterial plaque. J. Periodont., 47: 419-23, 1976.
- 8 - BIBBY, B. G. & KESTEREN, M. V. The effect of fluorine on mouth bacteria. J. dent. Res., 19: 391-401, 1940.

- 9 - BLOOM, R. H. & BLOWN JR., L. R. A study of the effects of orthodontic appliances on the oral microbial flora. Oral Surg., 17: 658-67, 1964.
- 10 - BOX, H. K. The maintenance of enamel integrity during orthodontic treatments. Am. J. Orthod., 26: 1138-45, 1940.
- 11 - BURNETT, G. W. *et alii*. Microbiologia oral & doenças infecciosas. 4^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koo gan, 1978. p. 101-2.
- 12 - BURRIL, D. Y. Effect of orthodontic treatment on caries susceptibilit. J. dent. Res., 20: 253-4, 1941.
- 13 - CIANCIO, S. G. *et alii*. Effect of a quaternary ammonium type mouthrinse on formed plaque. J. dent. Res., 54: 191, 1975. (Abstract nº 585).
- 14 - COX, G. J. & LEVIN, M. M. Fluorine and dental health. A. A. Adv. Sci., 19: 68, 1942.
- 15 - DIKEMAN, L. A study of acidogenic and aciduric micror-organisms in orthodontic and non-orthodontic patients. Am. J. Orthod., 48: 127-8, 1962.
- 16 - DOLCE, J. J. Caries incidence relation to orthodontic therapy. Am. J. Orthod., 36: 534-45, 1950.
- 17 - GARGIONE, C. A. O uso do gluconato de clorhexidina na prevenção da placa bacteriana em crianças portadoras de paralisia cerebral. Revta. Ass. paul. Cirurg. dent., 34: 220-5, 1980.

- 18 - GIBBIN, F. E. Control of caries during orthodontic treatment. Int. J. Orthod. Oral Surg., 23: 1205-11, 1937.
- 19 - GIBBONS, R. J. Storage of carbohydrates by plaque micro-organisms and its relationship to dental caries. Adv. Fluor. Res. & dent. Caries Prev., 2: 1964.
- 20 - GROSS, A. & TINANOFF, N. Effect of SnF mouthrinse on initial bacterial colonization of tooth enamel. J. dent. Res., 56: 1179-83, 1977.
- 21 - GURSIN, A. V. A study of effect of stannous fluoride incorporated in dent cement. J. oral Ther. Pharmac., 1: 630-6, 1965.
- 22 - HIRSCHFIELD, R. S. & JOHNSTON, L. C. Descalcification under orthodontic bands. Angle Orthod., 44: 218-21, 1974.
- 23 - HODGE, W. R. & SCHNEIDER, L. E. Effects of fluoride on streptococcal growth and intracellular polysaccharide production. J. dent. Res., 52: 87, 1973. (Abstract n° 114).
- 24 - HOLBECHE, J. D. *et alii*. Uma pesquisa clínica sobre a eficácia de um antisséptico bucal à base de cloreto de cetilpiridínio. I - Efeito no acúmulo da placa e na condição da gengiva. Aust. dent. J., 20: 397-404, 1975.
- 25 - HUGHES, D. O. *et alii*. Preparations to prevent enamel decalcification during orthodontic treatment compared. Am. J. Orthod., 75: 416-20, 1979.

- 26 - HURST, J. E. & MADONIA, J. V. The effect of an oral irrigating device on the oral hygiene of orthodontic patients. J. Am. dent. Ass., 81: 678-82, 1970.
- 27 - INGERVAL, B. The influence of orthodontic appliances on caries frequency. Odont. Revy., 13: 175-90, 1962.
- 28 - ITO, I. Y. *et alii*. Efeitos do cloreto de cetilpiridínio na inibição da placa dental e nas condições clínicas da gengiva humana. Odont. Moderno., 7: 3-15, 1980.
- 29 - JORDAN, H. V. & SUMMERY, D. L. Root surface caries review of the literature and significance of the problem. J. Periodont., 44: 158-63, 1973.
- 30 - KRASSE, B. *et alii*. The occurrence of certain "caries inducing" Streptococci in human dental plaque material. Archs oral Biol., 13: 911-8, 1968.
- 31 - KUSLICK, R. S. *et alii*. Effect of topical Vancomycin on plaque and chronic gingival inflammation. J. Periodont., 44: 366-8, 1973.
- 32 - LEFKOWITZ, W. & BODECKER, C. F. Concerning the vitality of the calcified dental tissues. J. dent. Res., 17: 453, 1938.
- 33 - LEVENS, P. Prevention of caries in the patients undergoing orthodontic treatment. J. Am. dent. Ass., 65: 316-8, 1962.

- 34 - LILIENTHAL, B. The effect of fluoride on acid formation by salivary sediment. J. dent. Res., 35: 197-204, 1956.
- 35 - LOESCHE, W. J. & NAFE, D. Reduction of supragingival plaque accumulations in institutionalized Down's syndrome patients by periodic treatment with topical Karamycin. Archs oral Biol., 18: 1131-43, 1973.
- 36 - ———, *et alii*. The effect of topical acidulated fluoride on percentage of *Stroptococcus mutans* and *Stryptococcus sanguis* in interproximal plaque samples. Caries Res., 7: 283-96, 1973.
- 37 - ———, *et alii*. Effect of topical acidulated phosphate fluoride on percentage os *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in plaque. Caries Res., 9: 139-55, 1975.
- 38 - MANDEL, I. D. New approaches to plaque prevention. Dent. Clin. N. Am., 16: 661-71, 1972.
- 39 - MEYERS, M. J. Protection of Enamel under orthodontic bands. Am. J. Orthod., 38: 866-74, 1952.
- 40 - MIRANDA, V. C. & PIZSOLITTO, A. C. Influência do flúor na redução de estreptococos orais em crianças. Revta. Ass. paul. Cirug. dent., 33: 179-83, 1979.
- 41 - MUHLER, J. C. Dental caries-orthodontic appliance SnF₂. J. Dent. Child., 37: 218-81, 1970.

- 42 - NOYES, H. J. Dental caries and the orthodontic patient. J. Am. dent. Ass. dent. Cosmos., 24: 1243-54, 1937.
- 43 - OGAARD, B. *et alii*. Plaque-inhibition effect in orthodontic patients of a dentrifice containing stannous fluoride. Am. J. Orthod., 78: 266-72, 1980.
- 44 - ONISI, M. *et alii*. Influences of orthodontic appliances on oral lactobacillus count and distribution of bacterial plaque of the tooth. Bull. Tokyo med dent. Univ., 8: 244, 1961.
- 45 - OWEN, O. W. Study of bacterial count (lactobacilli) in saliva related to orthodontic appliances. Am. J. Orthod., 35: 672-8, 1949.
- 46 - QUINN, G. W. The progress of dental caries beneath orthodontic bands. A clinical study. Am. J. Orthod., 42: 793, 1956.
- 47 - ROCHA BARROS, V. M. *et alii*. Efeitos de diferentes concentrações do cloreto de cetilpiridínio na antissepsia do sulco gengival. Revta. Fac. Farm. Odont. Rib. Preto., 13: 115-26, 1976.
- 48 - ROLLA, G. Adsorption of dextran to saliva-treated hidroxyapatite. Arch oral Biol., 16: 527-33, 1971.
- 49 - SAKAMAKI, S. T. & BAHN, A. N. Effect of orthodontic banding on localized oral lactobacilli. J. dent. Res., 47: 275-9, 1968.

- 50 - SCHIOTT, C. R. The effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. In: LOE, H., ed. Symposium on chlorhexidine in the prophylaxis of dental diseases. J. Periodont. Res., 8: (Suppl. 12): 7-10, 1973.
- 51 - SHANNON, I. L. Comparison of orthodontic cements containing sodium fluoride or stannous fluoride. Am. J. Orthod., 78: 640-5, 1980.
- 52 - SHKLAIR, I. L. *et alii*. Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. J. dent. Res., 51: 882, 1972.
- 53 - STURZEMBERGER, O. P. & LEONARD, G. J. The effect of a mouthwash as adjunct in tooth cleaning. J. Periodont., 40: 299-301, 1969.
- 54 - TILLERY, T. J. *et alii*. Preventing enamel decalcification during orthodontic treatment. Am. J. Orthod., 70: 435-9, 1976.
- 55 - TINANOFF, N. *et alii*. The effect of NaF and SnF₂ mouthrinse on colonization of tooth enamel: T.E.M. and S.E.M. studies. Caries Res., 10: 415-26, 1976.
- 56 - TOSELLO, A. L. B. B. Influência do aparelho ortodôntico fixo, tipo multi-bandas, sobre a incidência de *Streptococcus mutans* e suas implicações na saúde bucal. Piracicaba, 1977. Tese Mestrado. F.O.P.
- 57 - VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, Ed. Campus, 1981. Cap. 14, p. 223-45.

- 58 - WISTH, J. The role of zinc phosphaste cement in enamel surface changes on banded teeth. Angle Orthod., 40: 329-33, 1970.
- 59 - WRIGHT, D. E. & JENKINS, G. N. The effect of fluoride on the acid production of saliva-glucose mixtures. Br. dent. J., 96: 30-3, 1954.
- 60 - YOUNIS, O. *et alii*. Enamel decalcification in orthodontic treatment. Am. J. Orthod., 75: 678-81, 1979.
- 61 - ZACHRISSON, B. U. Fluoride application procedures in orthodontic practice, current concepts. Angle Orthod., 45: 72-81, 1975.
- 62 - ————. Cause and prevention of injuries to teeth and supporting structures during orthodontic treatment. Am. J. Orthod., 69: 285-300, 1976.
- 63 - ———— & ZACHRISSON, S. Caries incidence and orthodontic treatment with fixed appliances. Scand. J. dent. Res., 79: 183-92, 1971.
- 64 - ———— & ————. Caries incidence and oral hygiene during orthodontic treatment. Scand. J. dent. Res., 79: 394-401, 1971.
- 65 - ZAHRADNIK, R. T. *et alii*. Effect of fluoride topical solutions on enamel demineralization by lactate buffers and *Streptococcus mutans* "in vitro". J. dent. Res., 57: 940-6, 1978.

- 66 - ZAPSKI, E. G. The effect of sodium fluoride released
from elastic on the oral streptococcus salivarius
population of saliva in orthodontic patients. Am.
J. Orthod., 59: 301, 1971.