



## ADESÃO MICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ALINHADORES INVISÍVEIS: UM ESTUDO PILOTO

*Microbial adhesion and biofilm formation on invisible aligners: a pilot study*

Diego Romário da Silva<sup>1</sup>, Lucas de Oliveira<sup>2</sup>, Greziele Passamani<sup>3</sup>, Priscila Vieira da Silva<sup>4</sup>, Elizângela Araújo<sup>5</sup>, Fernanda Izaura<sup>6</sup>, Ana Paula Aguiar<sup>7</sup>, Marcus Vinícius Crepaldi<sup>8</sup>

### RESUMO

Apesar dos ganhos estéticos proporcionados pelo uso de aparelhos ortodônticos, a pesquisa ressalta que esses dispositivos, independentemente de sua tipologia, desempenham o papel de zonas de impacto que influenciam a adesão e colonização microbiana. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de adesão dos microrganismos *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em material de alinhadores invisíveis e em braquetes de aparelhos convencionais. Inóculos padronizados na concentração de  $10^8$  foram dispostos sobre as amostras em uma placa de 24 poços. Para a cepa fúngica foi utilizado Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com glicose e para a cepa bacteriana foi utilizado Brain Heart Infusion (BHI) com sacarose. Os microrganismos ficaram em contato com os corpos de prova durante o período de 24 h. Em seguida, as amostras foram coletadas, lavadas em solução de NaCl 0,9% e levadas ao banho de ultrassom, em tubos contendo 1 mL de NaCl 0,9%, para desprendimento das células do biofilme. Posteriormente, o conteúdo foi diluído sucessivas vezes e uma alíquota foi plaqueada em BHI ágar para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). A análise estatística foi realizada por ANOVA one way com pós teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que os dois microrganismos aderiram de forma semelhante nos dois tipos de aparelho. No entanto, *C. albicans* apresentou uma maior adesão em relação ao *S. mutans*. Apesar da facilidade de higienização proporcionada pelos alinhadores, seus materiais termoplásticos podem favorecer a formação de biofilme dental. Portanto, é crucial adotar uma abordagem cuidadosa, oferecer orientação eficaz sobre higiene oral e garantir acompanhamento contínuo da saúde bucal

durante o tratamento ortodôntico.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Adesão microbiana. Alinhadores invisíveis.

### ABSTRACT

Despite the aesthetic benefits provided by the use of orthodontic appliances, the research highlights that these devices, regardless of their typology, act as impact zones influencing microbial adhesion and colonization. Thus, the aim of this study was to assess the adhesion capacity of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* on invisible aligner material and conventional bracket surfaces. Standardized inocula at a concentration of  $10^8$  were placed on the samples in a 24-well plate. Yeast Nitrogen Base (YNB) supplemented with glucose was used for the fungal strain, and Brain Heart Infusion (BHI) with sucrose was used for the bacterial strain. The microorganisms were in contact with the specimens for 24 hours. Subsequently, the samples were collected, washed in a 0.9% NaCl solution, and subjected to ultrasonic bath in tubes containing 1 mL of 0.9% NaCl for biofilm cell detachment. The content was then serially diluted, and an aliquot was plated on BHI agar for subsequent Colony-Forming Units per milliliter (CFU/mL) counting. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-test ( $p < 0.05$ ). The results showed that both microorganisms adhered similarly to both types of appliances. However, *C. albicans* exhibited higher adhesion compared to *S. mutans*. Despite the ease of cleaning provided by aligners, their thermoplastic materials may favor dental biofilm formation. Therefore, it is crucial to adopt a careful approach, provide effective oral hygiene guidance, and ensure continuous monitoring of oral health during orthodontic treatment.

**Keywords:** Orthodontics. Microbial adhesion. Invisible aligners.

<sup>1</sup> Aluno do curso de pós-graduação em Ortodontia da Faculdade Faipe

<sup>2</sup> Aluno do curso de graduação em Biomedicina da UNIC

<sup>3</sup> Cirurgião-Dentista especialista em Ortodontia

<sup>4</sup> Docente graduação Faipe

<sup>5</sup> Docente graduação Faipe

<sup>6</sup> Docente graduação Faipe

<sup>7</sup> Docente graduação Faipe

<sup>8</sup> Docente graduação Faipe





## INTRODUÇÃO

A procura pelo tratamento ortodôntico têm aumentado exponencialmente nos últimos anos entre os pacientes jovens e adultos (VEDOVELO et al., 2019; OMRAN; DOWIE, 2023), não só para o reestabelecimento das funções do sistema estomatognático, mas sobretudo pelo aumento da pressão estética na sociedade atual (MILITI et al., 2021). Nesse contexto, o tratamento com aparelho fixo (AF) é a abordagem convencional e, ainda a mais realizada nas intervenções ortodônticas. No entanto, essa modalidade de aparelho apresenta desafios relacionados a estética, conforto do paciente e dificuldade de higienização. Assim, os alinhadores invisíveis (AI) foram idealizados para vencer esses desafios e otimizar o tratamento ortodôntico (MARAÑÓN-VÁSQUEZ et al., 2021).

Os alinhadores invisíveis foram propostos inicialmente por Kesling em 1945, que sugeriu o uso de um único posicionador após o tratamento ortodôntico com aparelhos fixos para correções finais. Com o avanço no desenvolvimento de materiais termoplásticos para uso ortodôntico, posteriormente foi desenvolvida a contenção plástica removível com capacidade de aplicar forças e realizar pequenos movimentos dentários (SHERIDAN, 1993). Após sucessivas alterações, a Invisalign® (Align Technology, Santa Clara, Califórnia) finalmente introduziu uma série de alinhadores de poliuretano semi-elásticos transparentes e removíveis (MEIER; WIEMER; MIETHKE, 2003), que hoje é o objetivo da maioria dos pacientes que buscam alinhamento dentário de forma mais confortável e estética (SYCIŃSKA-DZIARNOWSKA et al., 2022).

Aparelhos ortodônticos atuam como zonas de impacto que podem alterar a adesão e colonização microbiana, podendo servir como reservatórios de microrganismos e potenciais fontes de infecção (BRUSCA et al., 2007). Independentemente do tipo de aparelho e da forma de movimentação ortodôntica, os mais variados dispositivos usados na ortodontia podem dificultar a higienização bucal pelo paciente e favorecer o acúmulo de biofilme supra e gengival, afetando o microbioma oral. Assim, o tratamento ortodôntico pode resultar em efeitos adversos, incluindo descalcificação do esmalte, gengivite e doença periodontal (MÜLLER et al., 2021).

O braquete do Aparelho Autoligável (AA) é a opção mais higiênica, indicada para pacientes com má higiene bucal, quando comparado com Aparelhos Convencionais (AC). No entanto, ainda assim favorece o acúmulo de microrganismos nas suas áreas retentivas (TRIPATHI et al., 2023). O conforto e a estética relacionada aos AI são incontestáveis, mas a literatura ainda é incipiente em relação à adesão de microrganismos, formação de biofilme e desenvolvimento de doenças orais biofilme-dependentes, como cárie e doença periodontal, quando do uso desses aparelhos. Assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar a capacidade de formação dos patógenos orais *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Candida albicans* (*C.*



*albicans*) em materiais de alinhadores invisíveis.

## **METODOLOGIA**

### **Microrganismos e condições de cultivo**

Nesta pesquisa foram utilizados os microrganismos orais *S. mutans* UA159 e *C. albicans* MYA 2876. Os microrganismos foram reativados em meio de cultura específico para cada espécie e encubados por 24 h a 37° C.

### **Formação do biofilme**

Corpos de prova confeccionados a partir da face vestibular do incisivo central superior de placas oclusais ortodônticas, padronizados no tamanho 1,5 x 1,5 cm. Cada grupo experimental foi composto por um n de 3. Toda a amostra foi descontaminada com álcool 70% mais radiação ultravioleta. Os corpos de prova foram transferidos para uma placa de poliestireno de 24 poços e cobertos com 200 µL de um inóculo de 10<sup>8</sup> células, de cada microrganismo. Para o biofilme de *S. mutans* foi utilizado meio de cultura Brein Heart Infusion (BHI) suplementado com 1% sacarose (Cai et al., 2016) e para *C. albicans* meio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com 5% de glicose (Silva et al., 2019). Após 24 h o meio se cultura antigo foi substituído por um novo e incubado por mais 24 h, totalizando 48 h. Após esse tempo, as amostras foram removidas da placa e imersas em solução de NaCl 0,9% para remoção das células não aderidas. Finalmente, os dispositivos foram levados ao banho de ultrassom em um eppendorf contendo 900 µL de NaCl 0,9%. Após 10 diluições sucessivas, alíquotas das últimas 4 diluições foram plaqueadas em meio de cultura específico para cada e incubado novamente, para posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

### **Análise estatística**

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. O tipo de variável para quantificação do UFC é quantitativo discreto numérico. Após análise da distribuição de dados, considerada distribuição normal, foi realizada uma análise de variância ANOVA one-way com pós teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $\alpha < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A figura 1 apresenta a quantificação de UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro) de um biofilme monoespécie de duas espécies de microrganismos, *C. albicans* e *S. mutans*, em dois tipos de materiais: alinhadores invisíveis e braquetes de aparelhos convencionais, que são usados como controle. *C. albicans* demonstrou uma maior capacidade de adesão e formação de biofilme em comparação com *S. mutans*. De maneira surpreendente, ambas as espécies microbianas aderiram de maneira semelhante tanto no material de alinhador invisível quanto no braquete de aparelho convencional ( $p > 0,05$ ).

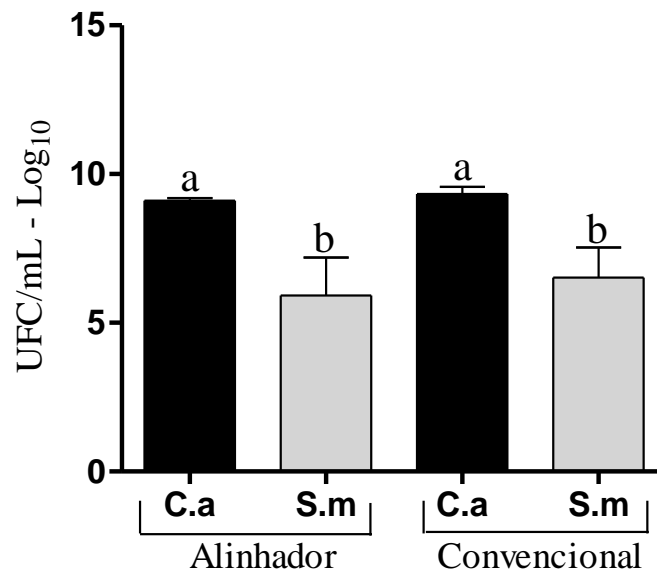


Figura 1 - Biofilme *duo* espécie de *C. albicans* MYA 2876 (C.a) e *S. mutans* UA159 (S.m) em material de alinhador invisível e braquetes de aparelho convencional. Letras diferentes representam estatística (ANOVA one-way mais Tukey – p,0,05).

A cavidade bucal humana abriga cerca de 700 espécies microbianas distintas, a maioria das quais possui a capacidade de formar biofilmes, comunidades microbianas envolvidas por uma matriz de polímeros auto-secretada. Estes biofilmes exibem uma resistência até 1000 vezes maior do que microrganismos planctônicos (Marsh, 2004). Adesão a práticas de higiene bucal e remoção mecânica apropriadas do biofilme permitem uma coexistência simbiótica com esses microrganismos (DAS et al., 2023).

Apesar da cavidade bucal abrigar diferentes bactérias que formam o biofilme dental cariogênico, *S. mutans* ainda é a mais estudada. Esse microrganismo é amplamente associado ao desenvolvimento de cárie dentária em humanos, principalmente crescendo em biofilmes sobre superfícies de esmalte. Por essa razão, tem sido o microrganismo mais estudado quando se deseja avaliar o potencial anticárie de alguma substância. Outro microrganismo comum em cáries dentárias humanas é a *C. albicans*, que frequentemente interage com o *S. mutans* (LU et al., 2023). *C. albicans* é comumente identificada em biofilmes de placas de crianças afetadas por cárie na primeira infância, uma condição oral difundida e dispendiosa. A presença de *C. albicans* tem sido associada a um aumento no crescimento de *S. mutans* nos biofilmes, no entanto, as interações químicas subjacentes ao acúmulo bacteriano ainda requerem uma investigação mais aprofundada (KIM et al., 2017). No entanto, alterações significativas na cavidade bucal, como a instalação de dispositivos ortodônticos, podem perturbar a microbiota, levando a uma disbiose que contribui para o desenvolvimento de doenças orais dependentes de biofilme, como cáries e doença periodontal (ABDULKAREEM et al., 2023).



Um estudo revelou que pacientes que passaram por um ano de terapia ortodôntica fixa apresentaram uma incidência notavelmente maior e um aumento significativo nas lesões de cárie ativa em comparação com aqueles que não utilizaram aparelho fixo. Esses resultados destacam a necessidade de uma atenção especial à saúde bucal durante o tratamento ortodôntico e ressaltam a importância de estratégias preventivas para mitigar os riscos associados ao desenvolvimento de cáries nesse contexto (PINTO et al., 2020).

Nesta pesquisa avaliamos a capacidade de adesão de *S. mutans* e *C. albicans* em corpos de provas confeccionados com material de alinhadores invisíveis e em aparelhos convencionais. Os resultados demonstraram que, apesar de *C. albicans* ter apresentado uma maior capacidade de adesão, não houve diferença estatística entre os aparelhos. Tanto o material de alinhadores invisíveis quanto os aparelhos convencionais apresentaram formação de biofilme pelas duas cepas analisadas em quantidade semelhante, não apresentando diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Esse resultado resalta a importância de motivação para higienização bucal nos pacientes, independente da modalidade de aparelho que utilizem.

Apesar da comodidade que os alinhadores invisíveis proporcionam, incluindo facilidade de higienização, se o paciente for deficiente nesse processo de desorganização do biofilme, existe possibilidade de os alinhadores também servirem de nicho para formação de biofilme denta e, conseqüentemente, desenvolvimento de doenças orais biofilme-dependentes. A presença de sulcos, microfissuras e abrasões na superfície dos alinhadores cria um ambiente propício para a adesão bacteriana e o subsequente desenvolvimento de biofilmes de placa. Nesse contexto, a remoção eficaz do biofilme da placa bacteriana nos alinhadores é essencial. Uma estratégia bem-sucedida parece envolver a combinação de métodos mecânicos e químicos. Essa abordagem visa não apenas eliminar o biofilme, mas também evitar a adsorção de pigmentos, contribuindo assim para a manutenção da estética dos alinhadores (ROUZI et al., 2023).

Além disso, é preciso considerar que os materiais usados nos alinhadores podem apresentar toxicidade ao tecido gengival. Um estudo avaliou a toxicidade de diferentes sistemas de alinhadores em fibroblastos gengivais. Todos os sistemas avaliados (Invisalign, Eon, SureSmile e Clarity) demonstraram toxicidade em diversos graus (leve a moderado) nos materiais termoplásticos utilizados. Houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, indicando impactos variados na biocompatibilidade (ALHENDI et al., 2022). Apesar da toxicidade, nesse caso, poder estar vinculada a limitações do método *in vitro*, é preciso considerar que um controle inadequado do biofilme pode gerar processos inflamatórios na gengiva que podem potencializar essa toxicidade *in vivo*. Assim, esses resultados ressaltam a importância de considerações críticas sobre a toxicidade dos materiais termoplásticos empregados nos dispositivos ortodônticos, destacando a necessidade de pesquisa e desenvolvimento contínuos para otimizar a segurança e a saúde dos pacientes



durante o tratamento ortodôntico.

Os dispositivos intraorais, independente da sua finalidade, podem funcionar como fator de retenção de microrganismos e potencializar o desenvolvimento de doenças orais biofilme-dependentes. Dessa forma, independente da modalidade de aparelho escolhido para o tratamento ortodôntico, é necessária uma abordagem cautelosa de orientação de higiene oral e acompanhamento da saúde bucal ao longo do tratamento. A combinação de cuidados adequados durante o uso dos dispositivos ortodônticos e a escolha criteriosa de materiais são elementos essenciais para assegurar a eficácia do tratamento, minimizando riscos potenciais à saúde bucal dos pacientes. Essa abordagem holística é crucial para promover resultados ortodônticos bem-sucedidos e a manutenção da saúde bucal a longo prazo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A complexidade da microbiota bucal, com suas distintas espécies microbianas e a capacidade de formação de biofilmes, destaca a importância crítica da higiene oral durante o tratamento ortodôntico. O estudo específico sobre a adesão de *S. mutans* e *C. albicans* em materiais de alinhadores invisíveis e aparelhos convencionais ressalta a necessidade de motivação para a higienização bucal independentemente do tipo de dispositivo utilizado. Apesar da comodidade oferecida pelos alinhadores, sobretudo a facilidade de higienização, os materiais termoplásticos usados para sua fabricação podem favorecer a formação de biofilme dental. Dessa forma, a influência de dispositivos intraorais como potenciais reservatórios microbianos destaca a necessidade de uma abordagem cuidadosa, orientação adequada de higiene oral e acompanhamento contínuo da saúde bucal durante o tratamento ortodôntico.

## REFERÊNCIAS

- ABDULKAREEM, A. A. et al. Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. **J Oral Microbiol.**, v. 15, n. 1, p. 2197779, 2 Apr. 2023. Doi: 10.1080/20002297.2023.2197779.
- ALHENDI, A.; KHOUNGANIAN, R.; ALMUDHI, A. Cytotoxicity assessment of different clear aligner systems: An in vitro study. **Angle Orthod.**, v. 92, n. 5, p. 655–60, 7 Jun. 2022. Doi: 10.2319/121621-919.1.
- BRUSCA, M.I. et al. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganisms in vitro. **Angle Orthod.**, v. 77, n. 2, p. 331-6, Mar. 2007.
- CAI, J.N. et al. Functional Relationship between Sucrose and a Cariogenic Biofilm Formation. **PLoS One.**, v. 11, p. 6, p. e0157184, 8 Jun. 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0157184.
- DAS, A. et al. Biofilm modifiers: The disparity in paradigm of oral biofilm ecosystem. **Biomed Pharmacother.**, v. 164, p. 114966, Aug. 2023. Doi: 10.1016/j.biopha.2023.114966.
- KESLING, H.D. The philosophy of the tooth positioning appliance. **American Journal of**





**Orthodontics and Oral Surgery**, v. 31, n. 6, p. 297-304, 1945.

KIM, D. et al. Candida albicans stimulates Streptococcus mutans microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. **Sci Rep.**, v. 7, p. 41332, 30 Ja. 2017. doi: 10.1038/srep41332.

LU, Y. et al. Roles of Streptococcus mutans-Candida albicans interaction in early childhood caries: a literature review. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 13, p. 1151532, 16 May 2023. Doi: 10.3389/fcimb.2023.1151532.

MARAÑÓN-VÁSQUEZ, G. A. et al. Reasons influencing the preferences of prospective patients and orthodontists for different orthodontic appliances. **Korean J Orthod.**, v. 51, n. 2, p. 115-125, 25 Mar. 2021. Doi: 10.4041/kjod.2021.51.2.115.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, v. 38, p. 3, p. 204-11, May/June. 2004. Doi: 10.1159/000077756.

MEIER, B.; WIEMER, K.B.; MIETHKE, R.R. (2003) Invisalign: patient profiling-analysis of a prospective survey. **J Orofac Orthop.**, v. 64, n. 5, p. 352–358, 2003.

MILITIA, S. F. et al. Psychological and social effects of oral health and dental aesthetic in adolescence and early adulthood: an observational study. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 17, p. 9022, 27 Aug. 2021. Doi: 10.3390/ijerph18179022.

MÜLLER, L.K. et al. Biofilm and Orthodontic Therapy. **Monogr Oral Sci.**, v. 29, p. 201-213, 2021. Doi: 10.1159/000510193.

OMRAN, R.; DOWIE, A. Increased demand for orthodontic treatments during the COVID-19 pandemic: a commentary. **Br Dent J.**, v. 234, n. 2, p. 84-87, Jan. 2023. Doi: 10.1038/s41415-023-5451-3.

PINTO, A.S. et al. Association between fixed orthodontic treatment and dental caries: a 1-year longitudinal study. **Braz Oral Res.**, 2020 Nov 13, v. 35, p. e002, 13 Nov. 2020. Doi: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0002.

ROUZI, M. et al. Impact of Clear Aligners on Oral Health and Oral Microbiome During Orthodontic Treatment. **Int Dent J.**, v. 73, n. 5, p. 603-611, Oct. 2023. Doi: 10.1016/j.identj.2023.03.012.

SHERIDAN, J.J.; LeDOUX, W.; McMINN, R. Essix retainers: fabrication and supervision for permanent retention. **J Clin Orthod.**, v. 27, n. 1, p. 37–45, 1993.

SILVA, D.R. et al. Anadenanthera Colubrina vell Brenan: anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Braz Oral Res.**, v. 33, p. e023, 2019. Doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.

SYCIŃSKA-DZIARNOWSKA, M. et al. Predicting interest in orthodontic aligners: a google trends data analysis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 19, n. 5, p. 3105, 6 Mar. 2022. Doi: 10.3390/ijerph19053105.

TRIPATHI, V. et al. Comparative Study of Microbial Adhesion on Different Orthodontic Brackets - An In Vivo Study. **J Pharm Bioallied Sci.**, v. 15, Suppl 2, p. S1270-S1273, Jul. 2023.

VEDOVELLO, S. A. S. et al. Exploring the perception of orthodontic treatment need using the Dental Aesthetic Index and Index of Orthodontic Treatment Need. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 156, n. 6, p. 818-822, Dec. 2019. Doi: 10.1016/j.ajodo.2019.01.020.