

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Odontologia

Thayse Caroline de Abreu Brandi

**EFETIVIDADE DO LEITE BOVINO E FERMENTADO CONTENDO
PROBIÓTICO NA PROGRESSÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE
AO REDOR DE BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

Rio de Janeiro
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

Thayse Caroline de Abreu Brandi

**EFETIVIDADE DO LEITE BOVINO E FERMENTADO CONTENDO
PROBIÓTICO NA PROGRESSÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE
AO REDOR DE BRÁQUETES ORTODÔNTICOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadores:

Prof.^o Dr.^o Matheus Melo Pithon

Prof.^o Adjunto da UESB

Prof.^a Dra.^a Lucianne Cople Maia

Prof.^a Titular da Faculdade de Odontologia da UFRJ

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FO / UFRJ

Brandi, Thayse Caroline de Abreu.

P474a Efetividade do leite bovino e fermentado contendo probiótico na progressão da desmineralização do esmalte ao redor de bráquetes ortodônticos/ Thayse Caroline de Abreu Brandi. – Rio de Janeiro : [s.n.], 2018

66 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

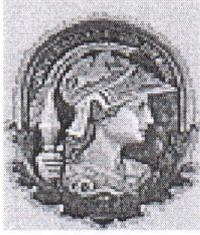
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Matheus Melo Pithon Co-orientador: Prof^a Dr^a.Lucianne Cople Maia

1. Introdução 2. Proposição 3. Delineamento 4. Desenvolvimento da pesquisa 5. Considerações finais 6. Conclusão

Black D3

CDD 617.69



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRANDI, THAYSE CAROLINE DE ABREU

**“EFETIVIDADE DE PRODUTOS LÁCTEOS CONTENDO PROBIÓTICO
FRENTE A ESMALTE DESMINERALIZADO AO REDOR DE
BRAQUETES ORTODÔNTICOS”**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, com parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 09 de março de 2018.

Aline de Almeida Neves

Profa. Dra. Aline de Almeida Neves

DO-Prof. Adjunto do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ

Luciana Pomarico Ribeiro

Profa. Dra. Luciana Pomarico Ribeiro

DO-Prof. Adjunto do Departamento de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ

Maristela Barbosa Portela

Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela

DO-Prof. Adjunto do Departamento de Odontoclínica da UFF

DEDICO

Aos meus pais, Guaraci e Alda, que se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Por todas as palavras de carinho a mim ditas nas horas de desespero. Pelo incentivo financeiro e emocional que foi depositado nessa jornada. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, obstáculos foram ultrapassados, barreiras foram vencidas, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada;

Aos meus irmãos, Gabriel e Marcelo, que sempre me acompanharam nas labutas no laboratório, independentemente de ser final de semana, madrugada ou feriado chuvoso. Minha eterna gratidão a vocês. Obrigada por sempre me olharem com admiração e orgulho, mesmo sem saber que muitas vezes tudo estava dando errado na vida e na pesquisa. Vocês não sabiam, mas a confiança que era depositada em mim, me fazia mais forte;

A minha filha, Valentina, meu coração fora do corpo, que sempre me recebeu com um sorriso no rosto e um abraço apertado depois de um dia inteiro sem me ver. Me desculpa se coloquei você na creche com 3 meses, mas era por um sonho. Sonho esse que concluo hoje e quero muito dividir com você. “Nunca deixe que digam a você que sonhos são uma bobagem, seria uma fatalidade se você acreditasse nisso” (Shakespeare). Espero que você se orgulhe de mim, como eu me orgulho. Obrigada por ter entrado na minha vida e ter me tornado uma pessoa melhor. Te amo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Antes de tudo, quero agradecer a **Deus**, por ter me concedido que tudo acontecesse com seu consentimento, por ter dado sentido aos meus sonhos, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente. Por ter feito que os dias de dor e angustia passassem rápido. E principalmente por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas, que me fizeram crescer e aprender a ser um ser humano melhor.

Dentre todas essas pessoas, a minha filha, que mudou o significado da vida pra mim, da forma de encarar o mundo e principalmente, que me ensinou o significado da palavra paciência. Uma coisinha tão pequena que me ensinou que nada acontece na hora e nem da forma que queremos, mas no momento certo. Nem sempre meus planos foram iguais ao de Deus, mas com certeza os dele sempre foram melhores.

“Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo”.

(Renato Russo)

Agradeço ao professor **Rodrigo Resende**, meu primo, por ter sido meu preceptor durante toda a minha jornada acadêmica até aqui. Muito obrigada por ter me apoiado no estágio no Salgado Filho desde o começo, por ter segurado minha mão e ter me ensinado a fazer a primeira sutura ainda na esponja, por ter escrito meu painel para minha primeira jornada científica ainda no 2º período. Por ter comemorado comigo meu ingresso na pós-graduação de Odontopediatria da UFRJ, assim como na aprovação no mestrado e por ter indicado meu nome para palestrar no CRO-RJ.

Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e apoio. Você é um exemplo de simplicidade, compreensão, bom humor e competência. Não

tive a sorte de ser sua aluna diretamente, mas sinto muito orgulho quando conheço ex-alunos seus que te elogiam. Todos que trabalham com o você admiram sua dedicação e amor ao trabalho com os alunos e orientados. Muito obrigada por ser esse exemplo e ter me ensinado a ser mestre.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.
(Carl Jung)

Agradeço ao professor **Roberto Vianna**, que me acolheu durante a graduação, na disciplina de APO, me convidando para fazer um painel a ser apresentado num congresso. O que eu não esperava naquela ocasião era que fosse gostar tanto de discutir artigos. Toda semana surgiam novos artigos, e cada vez mais eu gostava daquela rotina.

Muito obrigado professor, por cada palavra de carinho e acolhimento. Sua tranquilidade sempre em falar, sua calma, e principalmente seus conhecimentos sempre foram para mim referências. Por quantas vezes eu achava que algo que eu estava fazendo não tinha tanta significância ou importância, mas você não deixa eu me abater, falava logo que tudo tem seu valor. Minha eterna admiração!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

Agradeço a professora **Ana Paula Colombo**, que me orientou ainda na graduação, com quem tive o prazer de fazer iniciação científica por 3 anos e meio e aprender grande parte da bagagem de microbiologia que tenho. Muito obrigada por cada puxão de orelha, por sentar do meu lado e me ensinar do simples como “isolar

por esgotamento no bico” até coisas mais requintadas como “extração de DNA”, e principalmente, por me fazer amar laboratório.

Minha eterna gratidão por todos ensinamentos que foram passados a mim, a sua paciência, sua dedicação, seu empenho, sua garra e sua coragem. Tenho uma admiração por você inenarrável. Você é e sempre será uma referência na minha vida. Obrigada por dividir comigo seus conhecimentos, por cada ensinamento, e principalmente por sempre me mostrar, que mesmo depois de muito sabermos, ainda temos que continuar a estudar, reciclando sempre o conhecimento, “Pois a pesquisa é muito dinâmica, e pode ter certeza que lá no Japão algo novo está sendo pensado! ” .

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe; só levo a certeza de que muito pouco sei, ou que nada sei.”
(Almir Sater e Renato Teixeira)

De fato, todos que foram aqui agradecidos não estavam comigo no dia a dia, com exceção de Deus, porque esse estava sim. Mas todos, de fato foram importantes na formação da pessoa que sou hoje. E se hoje eu aqui estou, também se deve ao fato de vocês terem entrado na minha vida, e de me terem doado um pouco do conhecimento de cada um de vocês. Meu eterno agradecimento à todos.

“Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade – se tivermos a coragem de persegui-los.”
(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação como suplente até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” (provérbio africano).

Quero agradecer a todos aqueles que sempre confiaram em mim, desde sempre.

À minha família e aos meus verdadeiros amigos, sempre. Sempre mesmo.

Aos **meus pais**, por me terem dado educação, valores e por ter me ensinado a andar. Meu pai, nunca deixou de me amar, nem de confiar em mim, me alfabetizou, ensinando-me a ler e a calcular, viu como aprendi direitinho? Pai, meu amor eterno. À minha mãe, amor incondicional. Mãe, você que me gerou e me criou para a vida, não deixando eu me abater por nada nem ninguém. “Aquilo são piadinhas ao seu respeito? Não ligue, você sabe que você não é isso! ”. Mãe, você me fez forte, me fez mulher de cabeça erguida, empoderada, determinada, guerreira; meu pai me fez princesa de um castelo, passarinho no ninho – um dia vou ter que voar, mas por enquanto eu fico mais um pouco no ninho. Se eu acho meu caminho duro, o de vocês foi desbravador. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento. Vocês sempre foram e sempre serão meu maior exemplo de dignidade, respeito ao próximo, gratidão, e principalmente, professores. Se eu conseguir passar metade de todos os valores que vocês sempre passaram para mim e para os meus irmãos, tenho certeza que já serei uma grande mãe para a **Valentina**.

Aos meus irmãos **Marcelo**, que mesmo longe, mesmo do frio da Alemanha, liga todos os dias para falar comigo, saber como eu estou, ou as vezes para não falar nada, só mesmo para dizer “Bom dia! ”; e ao **Gabriel**, esse irmão que escuta todas minhas lamúrias diárias, que divide comigo as “brincas” da mamãe e a todos os gastos da nossa pequena-gigante Sophia (labrador). Meus irmãos que eu tenho amor de mãe, pois já tinha 10 anos quando eles chegaram na nossa família e

tiraram meu “trono de filha única” e a herança de 100%, mas que me deram muitas alegrias e a certeza de que minha vida com vocês é muito melhor. Obrigada por todas as idas ao fundão quase de madrugada, por estarem do meu lado em todas as minhas decisões e principalmente por nunca me deixarem ver os dias cinzas, eu amo vocês.

À minha vovó **Maria** que sempre fez aqueles quitutes gostosos que só vó sabe fazer! Espero que quando eu for vó saiba fazer essas coisas todas que a senhora sabe: crochê, tricô, ponto cruz, cozinhar e costurar. Por que no auge dos meus 31 anos eu ainda não sei pregar nem um botão! Obrigada vó, que Deus te conceda saúde e vida para muitos anos ainda ao nosso lado.

A todos os meus familiares, primos e tios, em especial a minha prima **Juliana**, irmã que Deus não me deu em útero. Obrigada por essa prima que sempre me “acorda” para a realidade. Que puxa minha orelha da maneira mais sutil do mundo, só com um olhar. Não existiria uma pessoa melhor no mundo para ser a madrinha da minha filha. Eu te admiro muito. Sua jornada não foi fácil, mas você nunca deixou se abater, sempre lutou muito. Obrigada por ser essa referência na minha vida e na vida da Valentina.

À minha madrinha, **tia Lúcia**, e minha prima e afilhada **Rafaela**, que mesmo distantes, estão por perto. Dindinha, obrigada por existir na minha vida. Amo vocês.

À minha sogra, **Denair**, e ao pai da Valentina, **Laelson**, por todo carinho e dedicação a nossa pequena Tina. Sem o cuidado de vocês para com ela, certamente eu acharia que fiz minhas escolhas no momento errado. Nunca me senti culpada ou uma péssima mãe por sair tarde da noite do laboratório, pois sabia que vocês estavam a cuidar dela com carinho. Obrigada por todo o apoio e cuidado com a joia mais preciosa da minha vida, minha filha.

*“Quando não souberes para onde ir, olha para trás e saberás pelo menos de onde vens”
(Provérbio africano).*

Aos meus amigos, mas que poderia chamar de irmãos que a vida me deu o direito de escolher: **Rafaella, Thalita, Barbara, Beatriz, Roberta, Marcinho e Regina**, vocês são prova vida do quanto eu sonhei com esse dia. Sempre riam quando alguém me perguntava: “o que eu fazia da vida?” E a resposta era “Sucesso”, ou melhor: “Você trabalha com o que?” E eu seguia “ Com amor!!”. Realmente eu sempre trabalhei com amor, e vocês sempre viram e comentaram isso. Sempre me olharam com admiração. E esse olhar sempre me deixou segura, e quando, por algum motivo da vida eu titubeava, bastavam 10 min de conversa para eu ter novamente segurança nas minhas mãos. Obrigada por me segurarem quando eu achava que ia cair. Por me darem força, e principalmente, por sempre confiarem em mim.

Às minhas amigas de graduação, **Marina** e **Lidiane**, que sempre me motivaram durante a graduação a correr atrás do meu sonho de fazer mestrado em odontopediatria. Nos trocamos muitas experiências ao longo desses 2 anos. Muito obrigada por essa amizade de 10 anos já. A UFRJ me deu eu não largo por nada desse mundo.

“A vida na terra é uma passagem, o amor uma miragem, mas a amizade é um “fio de ouro” que só se quebra com a morte. Você sabe? A infância passa, a juventude segue, a velhice a substitui, a morte a recolhe. A mais bela flor do mundo perde sua beleza, mas uma amizade fiel dura para a eternidade. Viver sem amigos é morrer sem deixar lembranças.”

Chico Xavier

Aos alunos da turma do Mestrado, ao meu M2, por todas as dicas, principalmente as de como bater uma boa foto para as sequencias da **Drª Ivete**, com um agradecimento em especial a **Paula Pires**, por tornar meus dias mais leves com aquele ar de mineira que estudou em São Paulo, mas que mora em Parati. Você é

única. Sua alegria é contagiante, mas não, eu não tenho nenhuma balinha, nem chiclete para te dar hoje. Ao meu M1 só tenho uma coisa a dizer, vocês vão deixar saudade. Em especial a **Gabrielle Carrozino**, que sempre topava um almocinho fora do Fundão, até porque precisamos comer bem de vez em quando; e a **Kriss Melani**, que sempre me arrancava lágrimas com suas palavras de admiração pela minha pessoa. Kriss você sem sombra de dúvidas foi a melhor dupla que poderiam ter me dado no segundo ano de mestrado. Foi um prazer conhecer mais sobre a sua cultura e seu país. E a todos os alunos da minha turma: **Júlio, Jéssica, Patrícia, Ana Lúcia, Stefânia, Rafaela**, por me receber já “no meio do jogo”, e com paciência me orientar na “partida”. Confesso que entrar e ir direto para a aula do **Ronir** foi assustador, mas como “uma criança que demora a descer pra brincar porque estava de castigo” foi muito bom rever e vivenciar tudo com vocês. Amava receber as mensagens do **Hiorran** quando ainda estava em casa dizendo: “Cadê você? Você está fazendo falta!”, mas estar com vocês todos os dias foi melhor. A todos da minha turma uma eterna gratidão por todo o carinho recebido, em especial a **Karla Mihayra**, que foi o meu presente do mestrado. Uma amizade que surgiu e eu não quero nunca mais perder. “Quando será o próximo congresso?”.

Aos alunos do doutorado e pós-doutorado, todos vocês foram especiais nessa trajetória, não vou citar para não correr o risco de esquecer alguém, mas durante esses anos todos em que estive na pediatria não poderia deixar de falar em especial de algumas pessoas que foram muito importantes na minha caminhada como o **Thiago Isidro, Adrielle Mangabeira** e a **Adilis Alexandrino** por todos os conselhos, por todas as dúvidas tiradas, por todas as ajudas prestadas no laboratório e nos cálculos estatísticos. Muito obrigada por tudo.

À minha aluna de iniciação científica, meu anjo, minha microbiologista, minha confidente, minha gargalhada certa, minha companheira das saídas tardes do fundão, **Amanda Monteiro**. Nenhuma das palavras que eu usar aqui vai de fato descrever o que eu sinto por você e a quão grata eu sou por tudo que vivenciamos juntas. Muito obrigada do fundo do meu coração. Esse trabalho também é seu. Você merece tudo de melhor que o mundo possa oferecer. Tenho certeza que seu caminho será de muito sucesso. Você merece.

Aos alunos de graduação por fazerem parte desse meu processo de amadurecimento, em especial aos alunos da clínica de quarta-feira de APO e a minha “Família UFRJ”, família essa que recebi em 2008, quando ingressei na graduação.

Aos funcionários minha eterna gratidão por todos os momentos de amparo e carinho que tiveram comigo. Em especial ao **João** por sempre me acudir nos quesitos de informática e documentações; ao **Robson** pelas gargalhadas durante os momentos de “cafezinho na copa”; à **Kátia** pelos controles de comportamento que sempre salvaram meus tratamentos de canal na clínica de bebê; à **Rose** por todas as sessões de psicólogo que fazia comigo e sempre aliviava meu “coraçãozinho”; e a todos os outros funcionários aqui não citados, mas que sempre colaboraram para que esses anos todos fossem maravilhosos.

Aos professores que estiveram presentes nesses dois anos de amadurecimento e crescimento, que de uma forma ou outra contribuíram de alguma forma para eu ser que eu sou hoje: **prof^o Thomaz, João, Rogério** e as **prof^a Fernanda, Andrea G., Andrea P., Laura, Gloria e Dr^a Ivete**, meu mais sincero “muito obrigada”. Orgulho eterno de ter feito parte dessa família.

Aos membros da minha banca: efetivos (**prof^a Luciana, Aline e Maristela**) e suplentes (**prof^o Marcelo e prof^a Tatiana**) muito obrigada por terem dedicado seu tempo à leitura do meu material.

Ao professor **Adriano Cruz** e seu aluno de doutorado **Hugo Leandro**, por me fornecer os leites, sempre solícitos para todas as dúvidas e novas demandas de fornecimento.

Aos meus orientadores **Matheus** e **Lucianne**, por tudo! Pela paciência, pelo carinho, pelos puxões de orelha, pela dedicação e principalmente, por dividirem todos os seus conhecimentos comigo. Não foi fácil, mas conseguimos. Ou melhor, estamos conseguindo! Meu eterno carinho e agradecimento a vocês por tudo.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao **CNPq** pelo auxílio e apoio concedido, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À **FAPERJ** pelo incentivo, suporte financeiro e por acreditar no potencial desse estudo.

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

A Lâmpada por Thomas Edison

Quando Thomas Edison (1847-1931) inventou a lâmpada, não saiu logo a primeira tentativa. Edison realizou mais de mil experiências até ao ponto de um dos seus colaboradores que trabalhava na sua oficina perguntou-lhe se Edison não se desanimava com tantos fracassos, ao que Edison respondeu: "Fracassos? Não sei do que falas, em cada experiência descubro um dos motivos pelo qual a lâmpada não funciona. Agora sei mais de mil maneiras de como não fazer a lâmpada. "

RESUMO

BRANDI, Thayse Caroline de Abreu. Efetividade de produtos lácteos contendo probiótico frente a esmalte desmineralizado ao redor de bráquetes ortodônticos. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Objetivo: verificar a ação de produtos lácteos contendo ou não probióticos sob associação de cepas de *Streptococcus mutans* (SM) e *S salivarius* (SS), a adesão desses produtos à superfície de bráquetes ortodônticos e avaliar a progressão da desmineralização em blocos de dente bovino ao redor de bráquetes ortodônticos após o esmalte ter sido exposto a produtos lácteos contendo probióticos. **Materiais e métodos:** *pool* de cepas ATCC de SM e SS foi formado e plaqueado sobre placa de Petri contendo meio de cultura *brain heart infusion* agar (BHI). Cada poço foi preenchido com 150µl dos produtos a serem testados, formando os grupos: **L** - Leite bovino; **LP** - Leite bovino com probiótico; **LF** - Leite fermentado e **LFP** - Leite fermentado com probiótico. Na sequência as placas foram incubadas por 48h, em estufa à 37°C. Após isso foi feita a medição do halo formado entre o produto e o meio. Na outra avaliação foi formado biofilme sobre o disco de membrana com o mesmo *pool* de cepas. Após o tratamento foi feito de acordo com o grupo: P1 (água); P2 (L); P3 (LP); P4 (LFP), seguido pela diluição seriada, plaqueamento e a contagem total de microorganismos. Para a adesividade dos produtos lácteos, bráquetes ortodônticos foram submergidos em cada solução (L, LP, LF e LFP), as quais foram incubadas a 37°C/24h. Posteriormente, cada bráquete foi transferido para um *ependorf* contendo solução salina estéril, que foi submetida a diluições seriadas, posteriormente incubadas a 37°C/48h sob microaerofilia para contagem das UFC/mL. Na avaliação da desmineralização foram utilizados 42 dentes bovinos previamente cortados em blocos com 64 mm². Bráquetes foram colados na superfície do esmalte e divididos em 6 grupos aleatoriamente: G1 (controle negativo), G2 (controle positivo), G3 (L), G4 (LP), G5 (LF) e G6 (LFP). Com a exceção do G1, todos os outros foram colocados em BHI suplementado com 2% de sacarose com 1x10⁶ células/ml de SM (ATCC 25175) e SS (ATCC 7073) durante 24 horas. Posteriormente, foram tratados diariamente com os produtos teste por 5 minutos por um total de 4 dias. Após o tratamento, foi avaliado os valores de microdureza superficial final, índice de perda mineral e microdureza interna. **Resultados:** não houve formação de halo de inibição entre os produtos e o meio de cultura (p<0.05); no disco de membrana não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (p=0.679); o GLP e o GLFP apresentaram adesividade aos bráquetes ortodônticos (p=0.056). Todos os grupos G1, G2, G3, G4, G5 e G6, apresentaram perda mineral no final do experimento. **Conclusões:** não foi possível verificar a bacterioterapia a partir de produtos lácteos contendo probióticos em cepas de SM e SS, e não foi possível prevenir a progressão da cárie em torno dos bráquetes ortodônticos.

Palavras chave: Ortodontia; Bráquetes; Probióticos; Esmalte; Biofilme dentário.

ABSTRACT

BRANDI, Thayse Caroline de Abreu. Efetividade de produtos lácteos contendo probiótico frente a esmalte desmineralizado ao redor de bráquetes ortodônticos. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Aim: To verify the action of dairy products with or without probiotics on strains of *Streptococcus mutans* (SM) and *S salivarius* (SS), the adhesion of these products to the surface of orthodontic brackets and to evaluate the progression of demineralization in blocks of bovine teeth around orthodontic brackets after the enamel has been exposed to dairy products containing probiotics. **Materials and methods:** pool of SM and SS ATCC strains was formed and plated on Petri dish containing brain heart infusion agar (BHI) medium. Following the methodology of Antoniazzi et al. (2015) the well was filled with 150µl of the products to be tested, forming the following groups: L - Bovine milk; LP - Bovine milk with probiotic; LF - Fermented milk and LFP - Fermented milk with probiotic. The plates were then incubated for 48 h in an oven at 37 °C. After this the measurement of the halo formed between the product and the medium with millimeter ruler was made. Following the methodology of Antônio et al. (2012) biofilm was formed on the membrane disc with the same pool of strains. After the treatment was done according to the group: P1 (water); P2 (L); P3 (LP); P4 (LFP), followed by serial dilution, plating and total count of microorganisms. For the adhesiveness of the dairy products, orthodontic brackets were submerged in each solution (L, LP, LF and LFP), which were incubated at 37°C / 24h. Subsequently, each bracket was transferred to an ependorf containing sterile saline solution, which was submitted to serial dilutions, then incubated at 37°C / 48h under microaerophilia to count the CFU/mL. In the evaluation of the demineralization, 42 bovine teeth previously cut in blocks with 64 mm² were used. Bacteria were glued on the enamel surface and divided into 6 groups randomly: G1 (negative control), G2 (positive control), G3 (L), G4 (LP), G5 (LF) and G6 (LFP). With the exception of G1, all others were placed in BHI supplemented with 2% sucrose with 1x10⁶ cells / ml SM (ATCC 25175) and SS (ATCC 7073) for 24 hours. Subsequently, they were treated daily for 5 minutes for a total of 4 days. After the treatment, the values of final surface microhardness, mineral loss index and internal microhardness were evaluated. **Results:** there was no inhibition halo formation between the products and the culture medium (p <0.05); in the membrane disc no statistical differences were observed between the groups (p = 0.679); GLP and GLFP showed adhesiveness to orthodontic brackets (p = 0.056). All groups G1, G2, G3, G4, G5 and G6 presented mineral loss at the end of the experiment. **Conclusions:** it was not possible to verify bacteriotherapy from dairy products containing probiotics in MS and SS strains, and it was not possible to prevent the progression of caries around orthodontic supports.

Key-words: Orthodontic; Brackets; Probiotics; Enamel; Dental biofilm

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Preparo dos dentes bovinos, colagem dos bráquetes, indução de biofilme e análise da microdureza superficial final e interna.....31

Artigo 2

Figure 1. Schematic representing the laboratory stages developed.....61

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1. Grupos avaliados nos testes de formação do halo de inibição e no teste de aderência.....48

Tabela 2 . Grupos avaliados no teste de disco de membrana.48

Tabela 3.. Teste de disco de membrana.48

Artigo 2

Table 1 . Moisture, Protein Fat, and calcium of milk, probiotic milk, fermented milk and probiotic fermented milk.62

Table 2 . Surface microhardness of enamel around orthodontic brackets before and after treatments62

Table 3 . Percentage of loss of superficial microhardness and internal microhardness, according to the treatments.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Cultura <i>brain heart infusion</i> agar
h	Hora
IFRJ	Instituto Federal do Rio de Janeiro
kgf/mm ²	Quilograma força por milímetro quadrado
L	Leite bovino
LP	Leite bovino com probiótico
LF	Leite fermentado
LFP	Leite fermentado com probiótico
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
seg.	Segundos
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
SS	<i>Streptococcus salivarius</i>
UFC	Unidade formadoras de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

GL	Grupo Leite bovino
GLP	Grupo Leite bovino com probiótico
GLF	Grupo Leite fermentado
GLFP	Grupo Leite fermentado com probiótico
G1	Grupo Controle negativo
G2	Grupo Controle positivo
G3	Grupo Leite bovino
G4	Grupo Leite bovino com probiótico
G5	Grupo Leite fermentado
G6	Grupo Leite fermentado com probiótico
P1	Grupo Água
P2	Grupo Leite bovino
P3	Grupo Leite bovino com probiótico
P4	Grupo Leite fermentado com probiótico
°C	Graus Celsius
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 PROPOSIÇÃO	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos específicos – 1ª Fase	26
2.3 Objetivos específicos – 2ª Fase	26
3 DELINEAMENTO DA PESQUISA	27
3.1- 1ª Fase do Estudo – Formação de halo de inibição, biofilme em membrana e tratamento, e adesividade em braquetes (Experimento I)	27
3.1.1 Teste de halo de inibição	27
3.1.2 Disco de Membrana	28
3.1.3 Teste de Aderência	29
3.2- 2ª Fase do Estudo – Formação de biofilme de <i>pool</i> de cepas ATCC de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>salivarius</i> e tratamento (Experimento II)	30
3.2.1 Tipo de Estudo	30
3.2.2 Desenho do Estudo.....	30
3.2.3 Preparo dos Blocos de Esmalte Bovino	31
3.2.4 Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte.....	32
3.2.5 Preparo do inóculo	32
3.2.6 Colagem dos braquetes e divisão da amostra em grupos	33
3.2.7 Ciclo de formação do biofilme sobre os blocos de esmalte bovino	34
3.2.8 Análise de microdureza superficial final e cálculo da perda de dureza	34
3.2.9 Microdureza Transversal.....	35
4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	36
4.1 Artigo 1 -	37
Análise da atividade antimicrobiana de probióticos e sua adesividade a braquetes ortodônticos: Estudo in vitro.....	37

4.2 Artigo 2	49
- EFFECT OF LACTEAL PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC IN THE	49
PROGRESSION OF TOOTH DECAY AROUND ORTHODONTIC BRACKETS ...	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma doença localizada, causada pelo desequilíbrio no acúmulo bacteriano (Kleinberg,2002). O processo cariioso é iniciado pela fermentação bacteriana dos carboidratos, levando a formação de ácidos orgânicos e a uma queda do pH do biofilme (Kleinberg,2002; Schuler, Haberstroh et al., 2018). Quando os depósitos microbianos permanecem aderidos ao dente por um extenso período, ocorrem quedas acentuadas do pH levando a uma perda da integridade do esmalte dental (Shim, Han et al., 2018; Souza, Oliveira et al., 2018).

A utilização de aparelhos ortodônticos dificulta a higienização, propiciando maior acúmulo bacteriano e levando aos pacientes maior susceptibilidade da ocorrência de lesões cariosas no esmalte dentário (Tufekci, Dixon et al., 2011). A infância e adolescência são períodos da vida onde mais se inicia os tratamentos ortodônticos, em virtude de que nesse período de vida é onde ocorre o desenvolvimento da oclusão e do crescimento facial (Fonseca, Silva et al., 2018; Nichols, Antoun et al., 2018). A prevenção envolve normalmente o controle não específico do biofilme, pois este é o fator iniciador (Mhaske, Ambiti et al., 2018; Zhang, Ab Malik et al., 2018). Dessa maneira é possível manter o biofilme em níveis compatíveis com a saúde e prevenindo a disbiose (degradação da homeostase microbiana) concomitante ao risco de doença (Allaker e Stephen, 2017).

Na prática ortodôntica, lesões de manchas brancas ativas são observadas com relativa frequência em torno de aparelhos ortodônticos, especialmente quando a higiene bucal é ruim (Knosel, Bojes et al., 2012; Gizani, Petsi et al., 2016; Allaker e Stephen, 2017). A prevenção da desmineralização durante o tratamento ortodôntico é um dos maiores desafios enfrentados pelos clínicos, apesar dos avanços modernos em prevenção da cárie (Knosel, Bojes et al., 2012; Gizani, Petsi et al., 2016).

Medida preventiva que não dependa da colaboração do indivíduo tem sido desenvolvido, afim de minimizar este problema, tal como colagem dos bráquetes

com materiais que liberem flúor (Pascotto, Navarro et al., 2004). Apesar dessa, o problema de manchas brancas ainda mostram-se frequentes, necessitando novos artifícios para eliminar, definitivamente, esse problema.

Recentemente, tem sido atribuído a uma nova classe de produtos a capacidade de controlar a instalação e progressão da cárie dentária, esses produtos são os probióticos (Alok, Singh et al., 2017). Probiótico é definido pela Organização Mundial da Saúde como sendo microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Manuals of food quality control. 11. Management of food control programmes. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991).

As espécies mais comumente utilizadas e pesquisadas pertencem ao gênero dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Bourdichon, Casaregola et al., 2012), microrganismos estes comumente encontrados na cavidade bucal, inclusive nas lesões de cárie (Chhour, Nadkarni et al., 2005). Esses microrganismos têm sido relacionados com benefícios à saúde bucal, como a produção de substâncias inibitórias do crescimento de *Streptococcus sobrinus* (Meurman, 2005; Meurman e Stamatova, 2007) e *Streptococcus mutans* (Nikawa, Makihira et al., 2004).

Para que o probiótico seja capaz de exercer um efeito anticariogênico, primeiramente a bactéria deve ser capaz de aderir à superfície dental; segundo, ela deve-se tornar parte do biofilme dental; e finalmente, ela deve competir com as bactérias cariogênicas reduzindo o nível de colonização destas (Comelli, Guggenheim et al., 2002), dessa maneira os probióticos são um tipo de bacterioterapia (Seminario-Amez, Lopez-Lopez et al., 2017). O veículo mais estudado, utilizado e amplamente difundido para administração dos probióticos é o iogurte. Uma das vantagens de importância clínica deste veículo relaciona-se ao quadro de intolerância à lactose. Indivíduos que a possuem, podem consumir este alimento adicionado de probiótico, pois toleram melhor a lactose presente no iogurte (Fuller, 1991; Petti, Tarsitani et al., 2001). No entanto, outros veículos foram testados e ainda estão em experimento, por diferentes autores e têm se mostrado tão eficientes quanto o iogurte, como leite e queijo (Ahola, Yli-Knuutila et al., 2002; De Moreno De Leblanc, Dogi et al., 2008).

Partindo dos fatos expostos surge os seguintes questionamentos: seriam os probióticos, presentes no leite bovino e no leite fermentado, capazes de realizar bacterioterapia, e dessa maneira, se aderir ao biofilme aderido aos bráquetes e prevenir a instalação e progressão de manchas brancas ao seu redor? Na busca de respostas a esses e outros questionamentos propõe-se a realização desse estudo que visa também testar a hipótese de que leite bovino e leite fermentado com probiótico previnem a progressão de manchas brancas ao redor de bráquetes ortodônticos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o leite bovino e leite fermentado, contendo ou não probiótico, apresentam capacidade de realizar bacterioterapia, aderir aos bráquetes ortodônticos e seu efeito no esmalte bovino previamente desmineralizados ao redor de bráquetes ortodônticos.

2.2 Objetivos específicos – 1ª Fase

- Avaliar as características microbiológicas e físico/química dos leites fermentados;
- Comparar a adesão do leite bovino e leite fermentado contendo probiótico aos bráquetes ortodônticos.

2.3 Objetivos específicos – 2ª Fase

- Avaliar a microdureza superficial do esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodônticos previamente desmineralizados, antes e após os mesmos terem sido expostos a tratamento com produtos lácteos contendo probiótico e o desafio cariogênico;
- Avaliar a sub-superfície do esmalte após a realização dos tratamentos propostos;
- Comparar o efeito dos tratamentos, com leite bovino e leite fermentado, contendo probiótico no esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodôntico.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Esse estudo foi dividido em duas fases laboratoriais, na primeira fase, buscou-se avaliar a ação tópica local do probiótico e a adesão do leite bovino e do leite fermentado ao bráquete e na segunda fase avaliou o efeito do probiótico ao esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodônticos.

3.1- 1ª Fase do Estudo – Formação de halo de inibição, biofilme em membrana e tratamento, e adesividade em braquetes (Experimento I)

3.1.1 Teste de halo de inibição

3.1.1.1 Formação do inóculo

O inóculo foi formado de um *pool* com $1,5 \times 10^8$ células/ml de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e com $1,5 \times 10^8$ células/ml de *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), que estavam mantidas em -80°C e foram reativadas em placas contendo meio de cultura BHI, sob microaerofilia, em estufa à 37°C por 48 horas. Posteriormente a densidade óptica observada foi conferida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220 UV-VIS spectrophotometer, Equipar Ltda., Curitiba, Brasil) com turbidez variando entre 0,08 à 0,12, equivalente a uma solução-padrão na escala 0,5 McFarland.

3.1.1.2 Plaqueamento e formação do halo

O *pool* de cepas ATCC de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), foi formado e plaqueado com a ajuda de um *swab* estéril, sobre placa de Petri contendo meio de cultura *brain heart infusion* agar (BHI). Após, isso criou-se um orifício no centro da placa utilizando-se o maior forame de uma ponteira de pipeta estéril. O Agar foi removido da ponta da pipeta com auxílio de uma ponta de agulha. Para selar o fundo da placa foi colocado 100µl ágar-

ágar (56C) sem encostar no fundo, no furo ou na placa, este conjunto ficou sob refrigeração (10°C) por 10 min.

O poço de cada placa foi preenchido com 150µl dos produtos a serem testados, de acordo com os grupos a serem avaliados:

L (Leite bovino);

LP (Leite bovino com probiótico);

LF (Leite fermentado);

LFP (Leite Fermentado com Probiótico).

As placas foram então incubadas por 24 h, em estufa à 37°C. Após isso foi feita a medição do halo formado com régua milimetrada. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2 Disco de Membrana

3.1.2.1 *Formação do inóculo*

Para o teste de disco de membrana a formação do inóculo foi idêntica quando da realização ao halo de inibição.

3.1.2.2 *Formação do biofilme em membrana*

Em placas de Petri contendo 20ml de BHI agar (Difco, Sparks, EUA), com auxílio de pinças estéreis, foram inseridas as membranas, previamente autoclavadas. Posteriormente foi adicionado 40µL do inóculo ao centro da membrana. O conjunto foi inoculado por 48hr, em microaerofilia, na estufa à 37°C. (Antonio et al., 2012).

3.1.2.3 *Tratamento e diluição seriada*

A membrana, contendo o biofilme formado foi levada a *ependorf* contendo 1mL dos produtos controle e experimentais:

P1 (Controle negativo - água);

P2 (Controle positivo - Leite);

P3 (Leite com probiótico);

P4 (Leite fermentado com probiótico);

A membrana ficou em repouso por 5 min, e posteriormente foi agitada mecanicamente por 1 min (momento 0). Após isso iniciou-se diluição seriada, com a remoção de 100µL e adicionado a 900µL de solução salina e agitado por 30 segundos (momento 1). Esse processo foi repetido em 8 momentos. O tratamento e a diluição foram realizados em duplicata.

3.1.2.4 Plaqueamento das diluições

100µL das suspensões celulares dos momentos 5, 6, 7 e 8 foram plaqueadas em triplicata, com o auxílio de alça Drigaus em placas contendo 20ml de BHI ágar (Difco, Sparks, EUA), e incubado por 48h, em microaerofilia, na estufa à 37°C. Após isso foi feita a contagem total dos microorganismos por grupo.

3.1.3 Teste de Aderência

3.1.3.1 Adesão dos produtos lácteos aos bráquetes

Os bráquetes ortodônticos (Edgewise Slim REF 10.65.203, Sorocaba, São Paulo, Brasil), previamente esterilizados, foram colocados com auxílio de pinça estéril em Ependorfs, contendo o produto a ser testado, em duplicata. Os produtos foram divididos de acordo com o grupo (L, LP, LF, LFP). O ependorf contendo o conjunto (Bráquetes+Produto) ficou incubado por 24h, em estufa à 37°C (Souza et al., 2013).

3.1.3.2 Diluição seriada e plaqueamento das diluições

Após o período de incubação, os bráquetes foram removidos dos produtos e imersos em 1000 µl de solução salina seguido de agitação mecânica por 3 min (momento 0). Após isso iniciou-se diluição seriada, com a remoção de 100µL e adicionado a 900µL de solução salina e agitado por 30 seg. (momento 1). Esse processo foi repetido em 3 momentos. O tratamento e as diluições foram feitas em duplicata.

Os momentos 1, 2 e 3 tiveram 100µL das soluções plaqueadas em triplicata, pela técnica de gota (Souza et al.,2013), em placas contendo 20ml de BHI agar (Difco, Sparks, EUA), após isso seguiu-se contagem total dos microorganismos.

3.2- 2ª Fase do Estudo – Formação de biofilme de *pool* de cepas ATCC de *Streptococcus mutans* e *salivarius* e tratamento (Experimento II)

3.2.1 Tipo de Estudo

O presente estudo experimental *in vitro*, cego, randomizado, controlado; com abordagem indutiva e técnica de documentação direta foi realizado no Laboratório de Pesquisa Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

3.2.2 Desenho do Estudo

Foram utilizados 42 blocos de esmalte bovino de 64 mm², foram obtidos a partir de incisivos bovinos previamente selecionados, onde dentes com trincas, machas e fraturas eram excluídos. A seleção dos dentes foi feita a partir do valor inicial de microdureza de superfície (310 ±10%). Bráquetes ortodônticos (Morelli, Sorocaba, Brasil) foram colados à superfície do esmalte com adesivo ortodôntico (Transbond XT, Monrovia, EUA). Parte do esmalte exposto foi coberto com isolante na cor vermelha para evitar exposição aos agentes experimentais. Os corpos de prova foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, de acordo com a figura 1. Com exceção do grupo controle negativo todos os outros foram colocados em BHI suplementado com sacarose a 2% com 1x10⁶ células/mL de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), durante 24 horas. Posteriormente, foram lavados em água deionizada durante 30 seg, e tratados, diariamente, por 5 minutos, por um total de 4 dias. Após o tratamento, foram avaliadas: a microdureza superficial final e a microdureza interna.



Figura 1. Preparo dos dentes bovinos, colagem dos bráquetes, indução de biofilme e análise da microdureza superficial final e interna.

3.2.3 Preparo dos Blocos de Esmalte Bovino

Dentes bovinos foram avaliados em estereomicroscópio (Zeiss – 475200 – 9901, West Germany) com aumento de 40x afim de seleção inicial. Dentes que apresentavam cárie, manchas, trincas ou outros defeitos no esmalte, foram excluídos.

Após seleção inicial, os mesmos foram individualmente fixados com cera pegajosa em placas acrílicas (60x20x 6 mm), visando mantê-los imóveis para recorte do esmalte de interesse. Os cortes foram realizados em cortadeira automática (ISOMET Low Speed Saw cutting machine - model n 11-1280-170, Lake Bluff, IL, USA), obedecendo à seguinte ordem de execução: **(1)** remoção da porção radicular do dente, restando somente o remanescente coronário; **(2)** secção da porção coronária no sentido longitudinal com o auxílio simultâneo de dois discos diamantados com um espaçador de 8 mm entre eles, obtendo-se assim, um fragmento com 8 mm de largura méso-distal; **(3)** secção do fragmento em sua porção média, separando, em tamanhos iguais, a porção vestibular da porção lingual. **(4)** Na porção vestibular realizaram-se novas secções de 8 mm de

espessura, envolvendo esmalte e dentina. Ao final foram obtidos 64 blocos de esmalte nas dimensões 8x8 mm (figura 1).

Na sequência os blocos foram planificados e polidos em Politriz Metalográfica (APL4, Arotec, Cotia, SP) com lixas d'água nas granulações 600, 1200 e 4000, para posterior análise da microdureza superficial inicial.

3.2.4 Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte

Previamente ao experimento para formação do biofilme, foi avaliado o microdureza superficial para seleção dos blocos de esmalte. Para essa análise foi utilizado microdurômetro (Buehler, MICROMET 5104, 679-MIT4-00335, Yokohama, Kanagawa, Japan) com um penetrador diamantado tipo Knoop, sob uma carga de 25 gramas durante 10 segundos. Cinco indentações foram realizadas no centro de cada corpo de prova, espaçadas uma das outras em 100 µm (de Mazer Papa et al., 2010), obtendo-se um valor em kgf/mm² para cada indentação.

A média de 340±10% dos valores de dureza encontrados representou a microdureza superficial inicial da amostra. Todas as amostras foram armazenadas em ambiente umedecido com água Milli-Q, até o início da fase experimental.

3.2.5 Preparo do inóculo

O inóculo utilizado foi constituído de um pool com 1x10⁶ células/mL de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), previamente selecionadas. Que foram colocados em BHI (Difco, Sparks, EUA), suplementado com sacarose a 2%.

As cepas foram suspensas em solução salina e colocada em agitador de vórtex durante 15 segundos, na sequência a densidade celular foi, avaliada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220 UV-VIS spectrophotometer, Equipar Ltda., Curitiba, Brazil) em comprimento de onda de 625nm. De acordo com a densidade apresentada a mesma foi ajustada acrescentando-se meio suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 – cerca de 1x10⁶ UFC/mL (McFarland, 1907).

3.2.6 Colagem dos bráquetes e divisão da amostra em grupos

Foram colados bráquetes ortodônticos na superfície de esmalte, com o auxílio do condicionamento ácido e sistema adesivo de passo único (Self etching Prime, 3M Unitek, Monrovia, EUA) e com compósito ortodôntico (Transbond XT, 3M Unitek, Monrovia, EUA), seguindo o protocolo proposto pelos fabricantes. Os bráquetes utilizados foram acessórios para incisivos centrais inferiores (Edgewise Slim, Morelli, Sorocaba, Brasil). A área remanescente foi coberta com esmalte de unha na cor vermelho (Riisque, São Paulo Brasil). Confeccionado as amostras as mesmas foram divididas, aleatoriamente, em 6 grupos (n=7), de acordo com o tratamento que receberam, aonde:

G1- controle negativo – amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2%;

G2- controle positivo – amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2% contendo cepas ATCC;

G3- amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2% contendo cepas ATCC e seguido de imersão 1x ao dia por 5 minutos em leite de vaca fermentado sem probiótico;

G4- amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2% contendo cepas ATCC e seguido de imersão 1x ao dia por 5 minutos em leite de vaca fermentado com probiótico;

G5- amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2% contendo cepas ATCC e seguido de imersão 1x ao dia por 5 minutos em leite fermentado sem probiótico;

G6- amostra imersa em meio BHI acrescido de sacarose 2% contendo cepas ATCC e seguido de imersão 1x ao dia por 5 minutos em leite fermentado com probiótico.

3.2.7 Ciclo de formação do biofilme sobre os blocos de esmalte bovino

Os blocos de esmalte foram randomizados e fixados em placas de poliestireno contendo 12 poços (TPP, Zellkultur Testplatte) por meio de cera pegajosa (Soares et al., 2015). Esse sistema de placas/blocos foi esterilizado em luz ultravioleta por 1 hora, antes do ensaio microbiológico (Bertolini, Portela et al., 2014).

Adicionado em cada poço: 1500µL do meio de cultura (BHI+sacarose 2%), as cepas e o bloco do grupo. Esse conjunto ficou no poço durante 24 horas. Posteriormente os blocos foram removidos dos poços e lavados em água deionizada durante 30seg, e colocados, diariamente, no tratamento por 5 min, por um período de 4 dias. O tratamento será composto por probióticos, que foram manufaturados no Laboratório de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), sob a supervisão do Professor Adriano Cruz.

Tanto o leite quanto o leite fermentado foram processados, e partir deste processamento foi realizada a inclusão dos probióticos (*Lactobacillus casei*). Para ambos os produtos foram realizadas, ao longo do tempo, as contagens dos probióticos, a fim de verificar sua viabilidade. Também foi avaliado a concentração de gorduras, proteínas e cálcio dos produtos formulados e testados. Após esse período total de 5 dias, foram realizadas as análises do esmalte tratado.

3.2.8 Análise de microdureza superficial final e cálculo da perda de dureza

Após o ensaio de formação do biofilme, os blocos foram removidos dos poços, limpos com auxílio de uma gaze umedecida com água Milli-Q e submetidos à análise de microdureza superficial final. Os mesmos parâmetros do ensaio de microdureza superficial inicial foram seguidos, onde novas cinco indentações foram realizadas, equidistantes 150 µm das primeiras marcações (indentações iniciais) e também espaçadas uma das outras em 100 µm (de Mazer Papa et al. 2010). Foi obtido a média desses cinco valores, o que representará a dureza final da amostra. O cálculo do percentual de perda de dureza (%PD) foi conduzido obedecendo-se a seguinte expressão: $\%PD = (dureza\ final - dureza\ inicial / dureza\ inicial) \times 100$ (Nassur, Pomarico et al., 2013).

3.2.9 Microdureza Transversal

Para avaliação da microdureza transversal, os blocos foram seccionados longitudinalmente com auxílio de máquina de corte (ISOMET Low Speed machine, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA). Uma das metades de cada bloco foi acoplada ao tarugo de acrílico e lixadas em politriz metalográfica em lixas d'água nas granulações de 600, 1200 e 4000 e a avaliação foi efetuada pelo microdurômetro (Buehler) com um indentador Knoop com carga de 25g por 10 segundos.

Duas seqüências de identações (distantes 100 μ m entre si) foram realizadas seguindo as seguintes distancias: de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 μ m de profundidade (Nassur et al., 2013). Os tratamentos foram comparados para cada profundidade e pela área de perda mineral. A leitura da microdureza transversal foi efetuada por um único examinador de maneira cega.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 Artigo 1: Análise da bacterioterapia de probióticos e sua adesividade em bráquetes ortodônticos – estudo in vitro

Artigo a ser submetido (Journal of dairy Science ou International journal of food microbiology);

4.1 Artigo 2: Effect of lacteal products containing probiotic in the progression of tooth decay around orthodontic brackets

Artigo submetido (The Angle Orthodontist).

4.1 Artigo 1 - Análise da atividade antimicrobiana de probióticos e sua adesividade a bráquetes ortodônticos: Estudo in vitro

Autores:

Thayse Caroline de Abreu Brandi¹
Amanda Nunes Monteiro¹
Hugo Leandro Azevedo da Silva²
Adriano Gomes da Cruz²
LucianneCople Maia¹
Matheus Melo Pithon¹

¹ Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, Faculdade de Odontologia,
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

² Instituto Federal de Ciências e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ,
Brasil.

Correspondence Author – Matheus Melo Pithon, Discipline of Pediatric Dentistry of the School of Dentistry - UFRJ Caixa Postal: 68066 – Cidade Universitária - CCS CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ – Brazil E-mail: matheuspithon@gmail.com Fax/phone: +5521 39382101

RESUMO

Objetivo: verificar a ação bacterapêutica de produtos lácteos contendo ou não probióticos sob *pool* de *Streptococcus mutans* (SM) (ATCC 25175) e *S salivarius* (SS) (ATCC 7073), além da adesão desses produtos à superfície de braquetes ortodônticos. **Material e Métodos:** *pool* de cepas ATCC de SM e SS foi formado e plaqueado sobre placa de Petri contendo meio de cultura *brain heart infusion agar* (BHI). Após formação do meio um orifício foi feito no centro da placa seguido do seu preenchimento com 150µl dos produtos a serem testados, formando os seguintes grupos: GL - Leite bovino; GLP - Leite bovino com probiótico; GLF - Leite fermentado e GLFP - Leite fermentado com probiótico. Na sequência as placas foram incubadas por 48h, em estufa à 37°C. Após isso foi feita a medição do halo formado entre o produto e o meio com régua milimetrada. Já no disco de membrana foi formado biofilme com o mesmo *pool* de cepas, sob discos de membrana. Após isso foi feita a diluição seriada contendo o produto de acordo com o grupo: P1 (água); P2 (L); P3 (LP); P4 (LFP), seguido do plaqueamento e a contagem total de microorganismos. Para a adesividade dos produtos lácteos, bráquetes ortodônticos foram submergidos em cada solução (GL, GLP, GLF e GLFP), as quais foram incubadas a 37°C/24h. Posteriormente, cada bráquete foi transferido para um ependorf contendo solução salina estéril, que foi submetida a diluições seriadas., posteriormente incubadas a 37°C/48h sob microaerofilia para contagem das UFC/mL. Para análise dos dados utilizou-se os testes Levene, Shapiro-Wilk e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** não houve formação de halo de inibição entre os produtos e o meio de cultura ($p < 0.05$); no disco de membrana não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0.679$); o grupo tratado leite bovino com probiótico e leite fermentado com probiótico apresentaram adesividade aos bráquetes ortodônticos ($p = 0.056$). **Conclusão:** Os achados do presente estudo permitem concluir que, em estudos *in vitro*, não foi possível verificar a bacterioterapia a partir de produtos lácteos contendo ou não probióticos em cepas de SM e SS.

Keys word: Membrane disc, halo inhibition, adhesiveness, brackets, probiotics

INTRODUÇÃO

A presença de aparelho ortodôntico fixo dificulta a higienização e potencializa o acúmulo de biofilme bacteriano nas superfícies dentárias (Julien, Buschang et al., 2013; Lucchese e Gherlone, 2013) cujas bactérias produzem ácidos a partir da fermentação dos restos alimentares levando ao processo carioso por meio da desmineralização dos cristais de hidroxiapatita do esmalte dentário (Featherstone, 2004; Robinson, 2009; Wolff e Larson, 2009). Gera-se, assim, um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização desempenhados pela saliva.

Apesar dos avanços na área da prevenção da cárie, evitar a desmineralização ao redor dos bráquetes ortodôntico, ainda é um desafio a ser enfrentado (Sanpei, Endo et al., 2010). Na presença dos acessórios ortodônticos o biofilme dental tem sua natureza alterada ocasionando um aumento significativo na população de *Streptococos* e *Lactobacilos* (Beyth, Redlich et al., 2003). O *Streptococcus mutans* é considerado o microrganismo que apresenta maior relevância nesse processo, sendo descrito como agente etiológico da cárie dentária, pois promove a produção de ácidos e é capaz de produzir polissacarídeos extracelulares (Beyth, Redlich et al., 2003). A busca de uma terapêutica que reduza a população desses microrganismos é anseio da comunidade científica em todo mundo, haja vista as repercussões negativas que a cárie promove nos indivíduos. Aplicação de flúor nas mais variadas formas, uso de colutórios contendo agentes bactericidas são algumas maneiras de minimizar o processo, entretanto esses apresentam efeitos colaterais muitas vezes indesejáveis. Nos dias atuais existe uma preocupação muito grande quando a necessidade de se desenvolver terapêuticas que ao invés de agir por si só, auxiliem o organismo a se defender. Dessa forma os probióticos tornaram-se evidência em diversos ramos da saúde (Corbitt, Campagnolo et al., 2018).

Probiótico é definido pela Organização Mundial da Saúde como sendo microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Guarner, Perdigon et al., 2005). A administração oral de probióticos beneficia a saúde bucal, evitando o crescimento da microbiota danosa a saúde oral (Meurman, 2005).

Nessa perspectiva surge alguns questionamentos, será que leite bovino e fermentado, contendo probiótico, teriam ação terapêutica frente a biofilme misto de *S. mutans* e *S. salivarius* e adesão aos bráquetes ortodônticos? Esse trabalho se propôs a verificar a hipótese de que a presença de probiótico conferiria aos leites poder bacterapêutico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Atividade anti-bacteriana

Formação do inóculo

O inóculo foi constituído de um *pool* com $1,5 \times 10^8$ células/ml de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), mantidas a -80°C e foram reativas em placas de BHI, sob microaerofilia, em estufa à 37°C por 48 horas. Posteriormente a densidade óptica observada foi conferida em espectrofotômetro (Biospectro SP-220 UV-VIS spectrophotometer, Equipar Ltda., Curitiba, Brazil) com turbidez variando entre 0,08 à 0,12, equivalente a uma solução-padrão na escala 0,5 McFarland.

Plaqueamento e formação do halo

O *pool* de cepas ATCC de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius* foi formado e plaqueado com a ajuda de um *swab* estéril, sobre placa de Petri contendo meio de cultura *brain heart infusion agar* (BHI). Após, isso criou-se um orifício no centro da placa utilizando-se o maior forame de uma ponteira de pipeta estéril. O meio Agar foi removido com auxílio de uma ponta de agulha. Para selar o fundo da placa foi colocado 100 μl ágar-ágar (56C) sem encostar no fundo da placa ou no BHI, este conjunto ficou sob refrigeração (10°C) por 10 min.

O poço de cada placa foi preenchido com 150 μl dos produtos a serem testados, de acordo com os grupos a serem avaliados (Tabela 1).

As placas foram então incubadas por 24h, em estufa à 37°C. Após isso foi feita a medição do halo formado com régua milimetrada. O experimento foi realizado em triplicata.

Disco de Membrana

Formação do inóculo

Para o teste de disco de membrana a formação do inóculo foi idêntica quando da realização ao halo de inibição.

Formação do biofilme em membrana e diluição seriada

Em placas contendo 20ml de BHI agar (Difco, Sparks, EUA), com auxílio de pinças estéreis, foram inseridas em discos de membranas (0.13mm de diametro) (Millipore), previamente autoclavadas. Posteriormente foi adicionado 40µL do inóculo ao centro da membrana. O conjunto foi inoculado por 48hr, em microaerofilia, na estufa à 37°C.

A membrana, contendo o biofilme formado foi levada a ependorf contendo 1mL dos produtos controle e experimentais como descrito na Tabela 2:

A membrana ficou em repouso por 5 min, e posteriormente foi agitada mecanicamente por 1 min (momento 0). Após isso iniciou-se diluição seriada, com a remoção de 100µL e adicionado a 900µL de solução salina e agitado por 30 segundos (momento 1). Esse processo foi repetido em 8 momentos. O tratamento e a diluição foram realizados em duplicata.

Os momentos 5, 6, 7 e 8 foram plaqueadas em triplicata, com o auxílio de alça Drigaus em placas contendo 20ml de BHI agar (Difco, Sparks, EUA), e incubado por 48h, em microaerofilia, na estufa à 37°C. Após isso foi feita a contagem total dos microorganismos por grupo.

Teste de Aderência

Adesão dos produtos lácteos aos bráquetes

Os braquetes ortodônticos (Edgewise Slim REF 10.65.203, Sorocaba, São Paulo, Brasil), previamente esterilizados, foram colocados com auxílio de pinça estéril em Ependorfs, contendo os produtos a serem testados, em duplicata. Os produtos foram divididos de acordo com o grupo (Tabela1). O ependorf contendo o conjunto (Braquetes+Produto) ficou incubado por 24h, em estufa à 37°C.

Diluição seriada e plaqueamento

Após o período de incubação, os bráquetes foram removidos dos produtos e imersos em 1000 µl de solução salina seguido de agitação mecânica por 3 min (momento 0). Após isso iniciou-se diluição seriada, com a remoção de 100µL e adicionado a 900µL de solução salina e agitado por 30 seg. (momento 1). Esse processo foi repetido em 3 momentos. O tratamento e as diluições foram feitas em duplicata.

Os momentos 1, 2 e 3 foram plaqueadas em triplicata, pela técnica de gota (Souza et al., 2013), em placas contendo 20ml de BHI agar (Difco, Sparks, EUA), após isso seguiu-se contagem total dos microorganismos.

Análise estatística

Para análise dos dados dos testes de disco de membrana e adesividade dos produtos lácteos, inicialmente foram verificados os pressupostos para utilização da análise de variância de um fator (ANOVA one-way): homocedasticidade e normalidade. A homocedasticidade foi testada pelo teste de Levene e a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. No caso em que esses pressupostos não foram atendidos, procedeu-se com o teste Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados foram tabulados e analisados no IBM SPSS Statistics para Windows (IBM SPSS. 21.0, 2012, Armonk, NY: IBM Corp.). Para análise do teste de halo de inibição não foi feito nenhum teste estatístico, pois em nenhum grupo foi formado o halo de inibição.

RESULTADOS

Para o teste de formação de halo de inibição não foi formado nenhum halo, em nenhum dos grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos testes de disco de membrana (Tabela 3) e adesividade dos produtos lácteos (Tabela 4).

Nesse estudo não foi possível observar adesividade ao bráquete pelos produtos do tipo leite bovino como é possível observar pela tabela 4. Já o GLP e GLFP (leite bovino e leite fermentado com probiótico, respectivamente) foi observado que havia microorganismo aderido aos bráquetes.

DISCUSSÃO

Já está bem descrito e documentado na literatura o aumento no acúmulo de biofilme bacteriano em pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo. A presença do biofilme favorece a desmineralização e o aparecimento das manchas brancas ao redor dos bráquetes. Prevenir a desmineralização durante o tratamento ortodôntico ainda é grande desafio (Tufekci, Dixon et al., 2011).

Uma terapêutica para prevenir ou tratar doenças da cavidade bucal, como caries dentárias e doenças periodontais é o probiótico, pois apresenta potencial de modificar a microbiota bucal devido a uma mudança na atividade do biofilme provocada pela alteração da composição microbiana e a reação resultante do hospedeiro (Allaker e Ian Douglas, 2015). Esses microrganismos estão relacionados na atualidade a benefícios à saúde bucal devido, dentre outros fatores, a produção de substâncias inibitórias do crescimento de *Streptococcus mutans* (Nikawa, Makihira et al., 2004).

Os probióticos quando associados a tratamentos convencionais podem melhorar a disbiose microbiana e promover melhora significativa no controle de doenças orais (Allaker e Stephen, 2017). Essa recente e promissora alternativa para combater as infecções orais, a partir do uso de bactérias inofensivas é denominada bacterioterapia (Caglar, Kargul et al., 2005), o efeito bacterapêutico promovido pelos probióticos pode representar uma importante alternativa para se evitar o aparecimentos de manchas brancas no esmalte após uso de aparelho ortodôntico

fixo. Partindo desse pressuposto a proposta do presente estudo foi avaliar a ação terapêutica de produtos lácteos contendo probiótico sob a presença de biofilme misto de *Streptococcus mutans* e *S. salivarius*, e sua possível adesão aos bráquetes ortodônticos.

Para avaliar se o *Lactobacillus acidophilus* (La - 5) era capaz de realizar bacterioterapia frente a biofilme de *Streptococcus mutans* e *S salivarius*, foram realizados testes de halo de inibição e disco de membrana.

No teste de halo de inibição, não se constatou ação bacterapêutica em nenhum produto avaliado o que confirma que o probiótico não apresentam ação bactericida ou bacteriostática. Esses achados corroboram com a literatura pertinente no que diz respeito de que probióticos devam ser usados como métodos auxiliares no controle e tratamento de algumas doenças odontológicas, tendo indicação profilática e não terapêutica (Caglar, Kargul et al., 2005).

No teste de membrana o objetivo foi avaliar o efeito de probiótico sobre a superfície da membrana que continha *Streptococcus mutans* e *salivarius*. As membranas são utilizadas quando se deseja avaliar a ação bactericida e ou, bacteriostática de determinados produtos, nesse caso, bacterapêutico, que é o uso terapêutico de culturas microbianas (geralmente bacilos - Baciloterapia). No presente estudo não foi possível provar essa ação de bacterioterapia isolado. Segundo Twetman (Twetman, 2012) é razoável considerar o uso da bacterioterapia como um possível complemento para a associação aos métodos existentes baseados em evidências para controlar e prevenir a cárie; já que o sinergismo que os probiótico faz com o *S. mutans*, não chega a ter uma competição e sim uma coexistência dos dois. Já no estudo de Keller et al. (Keller, Hasslof et al., 2012) o qual avaliou a longo prazo caries radiculares, os resultados indicaram que o probiótico funcionou bem quando combinado com fluoreto.

O protocolo usado para o teste de membrana foi feito seguindo o protocolo de Antonio et al. (Antonio et al., 2012), a escolha desse protocolo deu-se devido ao fato das membranas serem de uso mais fácil, não necessitarem de uma superfície como bloco dentário, por exemplo, para ser formada e apresentar menor risco de contaminação, no entanto apresentam custo mais elevado. No teste de adesividade,

observou-se que o leite com probiótico e leite fermentado com probiótico foram capazes de aderir aos bráquetes, pois houve crescimento de microorganismo pela técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento. Isso justifica investigações futuras com a finalidade de determinar a existência de alguma interação do probiótico com o biofilme, promovendo ou não a remineralização do esmalte dentário ao redor de bráquetes ortodônticos, tendo em vista que tanto os estreptococos do grupo mutans quanto os probióticos apresentam a propriedades de adesão (Kolenbrander, Andersen et al., 1998). Optou-se por testar a adesão dos produtos com probiótico ao bráquete metálico devido os mesmos serem os mais utilizados na rotina da clínica ortodôntica (Menezes, Campos et al., 2004).

Para realização do estudo, a cultura starter utilizada foi a *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* (R-704), o probiótico utilizado foi o *Lactobacillus acidophilus* (La - 5), onde a proporção final fosse de 7-8 log UFC/g de produto, quantidade essa já consagrada por muitos autores (Caglar, Kuscu et al., 2008; Gizani, Petsi et al., 2016), tornando assim os produtos lácteos viáveis. Estirpes de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei* e *Bifidobacterium* spp. apresentaram potencial para modificar a colonização de bactérias cariogênicas e com isso prevenir as cáries dentárias [26]. No entanto, Shin HS et al. (2018) afirmou que *L. lactis* pode ser um probiótico útil pois apresenta atividade antimicrobiana, visto que produz bacteriocinas (Shin, Baek et al., 2018).

A ausência de condições que mimetizem aquelas encontradas na cavidade bucal, como a presença de saliva, higiene oral, e a heteriogenicidade da microbiota bucal, também se constituem uma limitação. Por isso se justifica a realização de outros estudos, em que possa se avaliar a possível interação da microbiota oral com os probióticos.

CONCLUSÃO

Conclue-se com a realização desse estudo que:

- Os leites bovinos e fermentdo contendo probiótico não são capazes de promover bacterioterapia sob pool de cepas ATCC de SS e SM;

- Leite bovino e leite fermentado com probiótico apresentam adesividade aos bráquetes

- Leite bovino e leite fermentado sem probiótico não apresentam adesividade aos bráquetes

REFERÊNCIAS

Allaker, R. P. and C. W. Ian Douglas. 2015. Non-conventional therapeutics for oral infections. *Virulence* 6(3):196-207.

Allaker, R. P. and A. S. Stephen. 2017. Use of Probiotics and Oral Health. *Current oral health reports* 4(4):309-318.

Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko, and L. Morelli. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *The British journal of nutrition* 93(6):783-786.

Julien, K. C., P. H. Buschang, and P. M. Campbell. 2013. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *The Angle orthodontist* 83(4):641-647.

Keller, M. K., P. Hasslof, G. Dahlen, C. Stecksén-Blicks, and S. Twetman. 2012. Probiotic supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries research* 46(2):140-146.

Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, R. A. Baker, and H. F. Jenkinson. 1998. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *Journal of bacteriology* 180(2):290-295.

Lucchese, A. and E. Gherlone. 2013. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. *European journal of orthodontics* 35(5):664-668.

Menezes, L. M., L. C. Campos, C. C. Quintao, and A. M. Bolognese. 2004. Hypersensitivity to metals in orthodontics. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics* : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics 126(1):58-64.

Meurman, J. H. 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *European journal of oral sciences* 113(3):188-196.

Nikawa, H., S. Makihiro, H. Fukushima, H. Nishimura, Y. Ozaki, K. Ishida, S. Darmawan, T. Hamada, K. Hara, A. Matsumoto, T. Takemoto, and R. Aimi. 2004.

Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International journal of food microbiology* 95(2):219-223.

Robinson, C. 2009. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry* 10(3):136-140.

Sanpei, S., T. Endo, and S. Shimooka. 2010. Caries risk factors in children under treatment with sectional brackets. *The Angle orthodontist* 80(3):509-514.

Shin, H. S., D. H. Baek, and S. H. Lee. 2018. Inhibitory effect of Lactococcus lactis on the bioactivity of periodontopathogens. *The Journal of general and applied microbiology*.

Souza, T. M. P. A, I. A. Freires, D. M. B. Lima, V. C. Jovito, L. F. D. Almeida, R. Castro. 2013 In Vitro Adherence of Streptococcus mutans to the surface of metallic and polycarbonate orthodontic brackets. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 17(1):91-96.

Tufekci, E., J. S. Dixon, J. C. Gunsolley, and S. J. Lindauer. 2011. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *The Angle orthodontist* 81(2):206-210.

Twetman, S. 2012. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Brazilian oral research* 26 Suppl 1:64-70.

Wolff, M. S. and C. Larson. 2009. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Brazilian oral research* 23 Suppl 1:31-38.

TABELAS

Tabela 1. Grupos avaliados nos testes de formação do halo de inibição e no teste de aderência.

Grupos	Produtos avaliados
GL	Leite bovino
GLP	Leite bovino com probiótico
GLF	Leite fermentado
GLFP	Leite Fermentado com Probiótico

Tabela 2 . Grupos avaliados no teste de disco de membrana.

Grupos	Produtos avaliados
P1	Controle negativo (água)
P2	Controle positivo (L)
P3	Leite com probiótico
P4	Leite fermentado com probiótico

Tabela 3.. Teste de disco de membrana.

Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	*p-valor
P1	$7,80 \times 10^{-4}$	$7,50 \times 10^{-4}$	$9,76 \times 10^{-4}$	0,679
P2	$4,11 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-4}$	$8,41 \times 10^{-4}$	
P3	$3,91 \times 10^{-4}$	$3,02 \times 10^{-4}$	$63,00 \times 10^{-4}$	
P4	$2,91 \times 10^{-4}$	$0,55 \times 10^{-4}$	$55,20 \times 10^{-4}$	

P1, água (controle negativo); P2, leite bovino sem probiótico (controle positivo); P3, leite bovino com probiótico; P4, leite fermentado com probiótico* Teste Kruskal-Wallis.

Tabela . Teste de adesividade dos produtos lácteos.

Grupo	Média	Desvio padrão	*p-valor
GL	0,00	0,00	0,056
GLP	$76,20 \times 10^{-2}$	$41,86 \times 10^{-2}$	
GLF	0,00	0,00	
GLFP	$44,01 \times 10^{-2}$	$6,14 \times 10^{-2}$	

GL, leite bovino; GLP, leite bovino com probiótico; GLF, leite fermentado; GLFP, leite fermentado com probiótico. * ANOVA *one-way*.

4.2 Artigo 2 - EFFECT OF LACTEAL PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC IN THE PROGRESSION OF TOOTH DECAY AROUND ORTHODONTIC BRACKETS

Authors:

Thayse Caroline de Abreu Brandi¹
Amanda Nunes Monteiro¹
Hugo Leandro Azevedo da Silva²
Adriano Gomes da Cruz²
Lucianne Cople Maia¹
Matheus Melo Pithon¹.

¹ Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Department of Food Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence Author – Matheus Melo Pithon

Discipline of Pediatric Dentistry of the School of Dentistry - UFRJ Caixa Postal: 68066 – Cidade Universitária - CCS CEP: 21941-971 - Rio de Janeiro – RJ – Brazil E-mail: matheuspithon@gmail.com Fax/phone: +5521 39382101

Abstract

Objective: to evaluate the progression of caries around orthodontic brackets after the enamel has been exposed to dairy products containing probiotics. **Methods:** Forty-two bovine teeth, cut into blocks of 64 mm², were used. Orthodontic brackets were bonded to the enamel surfaces. The test specimens were randomly divided into six groups (n=7): **G1** – negative control; **G2** – positive control, exposed to culture environment only (without microorganisms); **G3** – exposed to the cariogenic environment and the fermented cow's milk; **G4** – exposed to the cariogenic environment and fermented cow's milk with probiotic; **G5** – exposed to the cariogenic environment and fermented cow's milk; **G6** – exposed to the cariogenic environment and fermented cow's milk with probiotic. With the exception of the negative control group, all others were placed in brain heart infusion medium, supplemented with 2% sucrose and with 1x10⁶ cells/ml of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius* (ATCC) for 24 hours. Subsequently, they were treated daily for five minutes, for a total of four days. After the treatment, they were evaluated for final surface microhardness, mineral loss index and internal microhardness. The Shapiro-Wilk, Levene, Student t, Kruskal-Wallis, and Mann-Whitney tests were used. The level of significance was 5% ($\alpha=0.05$). The data were tabulated and analyzed in SPSS. **Results:** There was no significant difference between the groups with respect to the initial values of superficial microhardness ($p>0.05$); however, final surface microhardness analysis revealed that all groups exposed to the ATCC strains showed lower final microhardness, compared to the negative control ($p<0.05$). The interventions with milk and fermented milk with or without probiotic did not differentiate in relation to the positive control, nor in relation to the groups treated with milk and milk + probiotic ($p>0.05$). **Conclusions:** Dairy products are not able to prevent the progression of caries around orthodontic brackets in an in vitro model under microbiologic assay.

Keywords: Orthodontic brackets; Dental caries; Dental biofilm; Enamel hardness testing, Probiotics.

1. Introduction

The cavity process is initiated by bacterial fermentation of carbohydrates, leading to the formation of organic acids and a drop in the pH of the biofilm.¹ When microbial deposits remain adhered to the tooth for an extended period, there are further, sharp drops in pH, leading to a loss of integrity of dental enamel.^{2, 3}

The use of orthodontic devices makes it difficult to hygienize the teeth, thus increasing the susceptibility of dental enamel to caries. In orthodontic practice, white spot lesions are observed relatively frequently around orthodontic appliances, especially when oral hygiene is poor.⁴ The prevention of demineralization during orthodontic treatment is one of the major challenges faced by clinicians, despite modern advances in caries prevention.⁵

Recently, a new class of products has been introduced as having the ability to control the initiation and progression of dental caries – probiotics.⁶ A probiotic is defined by the World Health Organization as being living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer benefits to the health of the host.⁷ The species most commonly used and researched belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*⁸. These microorganisms are commonly found in the oral cavity, including in caries lesions.⁹ They have been related to oral health benefits, such as the production of inhibitory substances in the growth of *Streptococcus sobrinus*¹⁰, *S. mutans*¹¹, as well as a reduction in the risk of caries in 3- to 4-year-old children.¹²

With the professed benefits of probiotics on dental health in mind, the following question arises: are the probiotics present in fermented cow's milk able to prevent progression of dental caries around orthodontic braces? In the search for an answer to this and related questions, this study was proposed to test the hypothesis that fermented cow's milk with probiotics prevent the initiation and progression of white patches around orthodontic brackets.

2. Materials and Methods

Evaluation of initial surface microhardness and selection of enamel blocks

Prior to the biofilm formation experiment, the surface microhardness test was performed in order to select the enamel blocks. For this analysis, a microdurometer (Buehler, Micromet 5104, 679-MIT4-00335, Yokohama, Kanagawa, Japan) was used, with a Knoop-type diamond penetrator, under a load of 25g for 10s. Five indentations were made in the center of each specimen, spaced 100 μm apart¹³, providing a value in kgf/mm^2 for each indentation.

The average of the five indentations was taken to represent the initial surface microhardness of the sample. All samples were stored in an environment moistened with Milli-Q water, until the beginning of the experimental phase.

Preparation of the inoculum

The inoculum used consisted of a pool containing 1×10^6 cells/mL of *S. mutans* and *S. salivarius*, from previously selected ATCC strains. They were placed in BHI medium (Difco, Sparks, USA), supplemented with 2% sucrose.

The strains were suspended in saline solution and placed in a vortex shaker for 15s, after which the cell density was evaluated in a spectrophotometer (Biospectro SP-220 UV-VIS spectrophotometer, Equipar Ltda., Curitiba, Brazil) at a wavelength of 625 nm. The cell density was adjusted by adding sufficient medium to obtain the equivalent transmittance of a standard solution of McFarland scale 0,5 – about 1×10^6 CFU/ml.

Bracket bonding and splitting the sample into groups

Orthodontic brackets were bonded (Transbond XT, 3M Unitek, Monrovia, USA) to the enamel surfaces of the samples. The remaining area was covered with red nail polish (Risqué, São Paulo, Brazil). The samples were randomly divided into six groups ($n=7$), according to the following treatments:

G1 – negative control, sample immersed only in BHI plus 2% sucrose; **G2** – positive control, sample immersed in BHI plus 2% sucrose, with *S. mutans* and *S. salivarius*

strains; **G3** – sample immersed in BHI plus 2% sucrose, with *S. mutans* and *S. salivarius* strains, followed by immersion, 1x per day for 5 min in cow's milk; **G4** – sample immersed in BHI plus 2% sucrose, with *S. mutans* and *S. salivarius* strains, followed by immersion, 1x per day for 5 min, cow's milk with probiotics; **G5** – sample immersed in BHI plus 2% sucrose, with *S. mutans* and *S. salivarius* strains, followed by immersion 1x per day for 5 min, in fermented milk; **G6** – sample immersed in BHI plus 2% sucrose, with *S. mutans* and *S. salivarius* strains, followed by immersion, 1x per day for 5 min, in fermented milk with probiotics. Treatments were performed over the course of 3 days.

Cycle of biofilm formation on bovine enamel blocks

The enamel blocks were randomized, and fixed on polystyrene plates. This plate/block system was sterilized in ultraviolet light prior to microbiological testing.

The strains and each test specimen were added to 1,500 μL of the culture medium (BHI + sucrose 2%). This set remained in the medium for 24 hours. Subsequently, the specimens were removed from the medium, washed in deionized water for 30 s, and placed in contact with the experimental solution for 5 min daily, for a period of 3 days.

Probiotics (*Lactobacillus casei*) were incorporated into the fermented cow's milk during processing. For both products, counts of the probiotics were carried out over time to verify their viability. After a total period of 4 days, the treated enamel was analyzed (Table 1).

Analysis of final surface microhardness and calculation of hardness loss

After the biofilm formation test was completed, the blocks were removed from the medium, cleaned with gauze moistened with Milli-Q water, removed from the brackets and subjected to the final surface microhardness analysis. The same parameters from the initial surface microhardness test were used, wherein five new indentations were made, 150 μm from the initial indentations, also spaced 100 μm apart.¹³ The average value of these five indentations was obtained, which was taken to represent the final hardness of the sample. Calculation of the percentage of

hardness loss (% PHL) was carried out, following the equation: % PHL = (final hardness - initial hardness / initial hardness) × 100.

Transverse (internal) microhardness

To evaluate the transverse microhardness, the blocks were longitudinally sectioned. Measurements were made using a microdurometer with a Knoop indentator with a load of 25g per 10s. Ten indentations were made in the center of each test specimen, spaced 100 µm apart, and five indentations spaced 200 µm apart¹³, obtaining a value in kgf/mm² for each indentation.

Statistical Analyzes

The normality of the data was evaluated using the Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variance by the Levene test. The Student t test for paired samples was used to compare the surface microhardness before and after the treatments. The differences between the groups were tested using one-way ANOVA or the Kruskal-Wallis test, and for the latter, when a significant difference was verified, the Mann-Whitney test was used for comparisons between peers. The level of significance was 5% ($\alpha=0.05$). The data was tabulated and analyzed in IBM SPSS Statistics for Windows (IBM SPSS, 21.0, 2012, IBM Corp., Armonk, NY)

3. Results

Table 2 shows the enamel analyzes from around the brackets in relation to surface microhardness. No significant difference was observed between groups in the initial values of superficial microhardness, demonstrating that all groups presented the same initial conditions; however, all groups presented mineral loss by the end of the experiment, compared to the baseline. Final surface microhardness analysis revealed that all groups exposed to the ATCC strains showed lower final microhardness, compared to the negative control (G1). The treatments with cow's milk only (G3), cow's milk with probiotics (G4), and fermented cow's milk (G5) resulted in lower final microhardness values, compared to the positive control (G2). The treatment with fermented cow's milk with probiotics (G6) did not differentiate between the positive control or the other treated groups.

Table 3 shows a comparison between the groups, with respect to percentage loss of surface microhardness with hardness. Analysis of surface microhardness loss revealed that all groups exposed to the ATCC strains showed higher mineral loss, compared to the negative control; the treatments with fermented cow's milk and fermented cow's milk plus probiotics aggravated the loss of superficial microhardness, whilst the application of fermented milk and fermented milk with probiotics could not be differentiated from the positive control or the groups treated with milk and milk plus probiotics. No significant differences were observed between the groups in terms of microhardness.

4. Discussion

Enamel demineralization often occurs in patients with fixed orthodontic appliances.¹⁴ Several studies have attempted to evaluate materials and methods developed with the aim of reducing white spot problems in orthodontic patients.¹⁵⁻¹⁷ Some studies report improvements^{17, 18}, others ineffectiveness, and still more that the situation worsens¹⁹. In face of the dichotomy of results, systematic reviews have been performed in order to determine a useful conclusion; however, to date, these studies^{20, 21} have not been able to establish the best and most effective way to prevent the development of white patches during orthodontic treatment with fixed appliances, although some evidence of moderate and low quality has been suggested with the use of fluoride varnish and frequent professional cleaning of teeth.^{20, 21}

Faced with these findings, the need for innovative approaches, such as the use of products containing probiotics, has arisen. The use of probiotics has gained strength in recent years because of their natural origin and general health benefits.²² In the literature, there are a few studies^{14, 23, 24} that have evaluated the action of probiotic-containing foods on the progression of enamel dental caries lesions in orthodontic patients. As a result, the idea of the present study was to evaluate the efficacy of the application of fermented cow's milk and yogurt, containing probiotics,

in arresting the progression of caries around orthodontic brackets, using an *in vitro* model.

Many studies have shown that probiotics have a positive effect on dental caries²⁵⁻²⁷, leading to a reduction in the concentration of *S. mutans* in saliva. The exact mechanism by which probiotics exert their influence is unknown. According to Petti et al.²⁸, probiotic-containing yogurts exhibit activity against microorganisms of the salivary microbiota, but they do not appear to possess the ability to colonize the oral cavity; however Fernandez et al.²⁹ suggested that probiotics alter the cariogenicity of *S. mutans*. It is now known that *S. mutans* is not the main causative agent of caries, but it is among the main agents, as demonstrated by the present study, wherein it was used in association with *S. salivarius* during the cariogenic challenge.

According to Comelli et al.³⁰, *Lactococcus lactis* and *S. thermophilus* are able to integrate with the supragingival biofilm, and *L. lactis* is also able to modulate the growth of *S. sobrinus*, leading to a decrease in the cariogenic potential of the dental biofilm. Based on these findings, we used *L. lactis* as a probiotic. The results showed that the addition of probiotics to the fermented cow's milk did not reduce the cariogenic potential of *S. mutans* or *S. salivarius*, as demonstrated in previous studies. This result may be due to the fact that the *in vitro* model used did not reliably simulate the oral cavity, since the previous positive results were found from *in vivo* studies¹⁴. Another justification for the present findings is that those studies where favorable results were found used other types of probiotics, such as bifidobacteria.

In 2006, Basyigit et al.³¹ analyzed the viability and degree of survival of *L. acidophilus* as a probiotic organism, and observed that the probiotic culture remained stable for up to six months. This justified the use of fermented milk in the present study, with lactea culture plus probiotic *L. acidophilus*.

When the enamel around the brackets was analyzed, all of the groups displayed the same initial conditions; however, all groups presented mineral loss by the end of the experiment. *In vitro* assays have reported an inhibitory effect of lactobacillus on different strains of *S. mutans*.³² As in this work, Fernandez et al.²⁹ also reported that they could not detect any inhibitory effect by probiotics. It is possible

that probiotics are more effective at achieving remineralization than preventing demineralization.

The limitations of the present study are inherent to all *in vitro* studies, as this method does not accurately simulate what happens in the oral cavity, due to its complexity, and therefore further studies *in vivo* should be developed to elucidate the real mechanism of probiotics in preventing dental caries.

5. Conclusion

This study showed that probiotics, administered through fermented cow's milk and fermented milk, do not prevent the initiation or progression of white spots around orthodontic brackets.

6. References

1. Gugnani N, Gugnani S. Remineralisation and arresting caries in children with topical fluorides. Evidence-based dentistry. 2017 Jun 23;18 (2):41-2.
2. Zhou J, Jiang N, Wang Z, Li L, Zhang J, Ma R, et al. Influences of pH and Iron Concentration on the Salivary Microbiome in Individual Humans with and without Caries. Applied and environmental microbiology. 2017 Feb 15;83 (4).
3. Alkhateeb AA, Mancl LA, Presland RB, Rothen ML, Chi DL. Unstimulated Saliva-Related Caries Risk Factors in Individuals with Cystic Fibrosis: A Cross-Sectional Analysis of Unstimulated Salivary Flow, pH, and Buffering Capacity. Caries research. 2017;51 (1):1-6.
4. Pithon MM, Dos Santos MJ, Andrade CS, Leao Filho JC, Braz AK, de Araujo RE, et al. Effectiveness of varnish with CPP-ACP in prevention of caries lesions around orthodontic brackets: an OCT evaluation. European journal of orthodontics. 2015 Apr;37 (2):177-82.
5. Sanpei S, Endo T, Shimooka S. Caries risk factors in children under treatment with sectional brackets. The Angle orthodontist. 2010 May;80 (3):509-14.

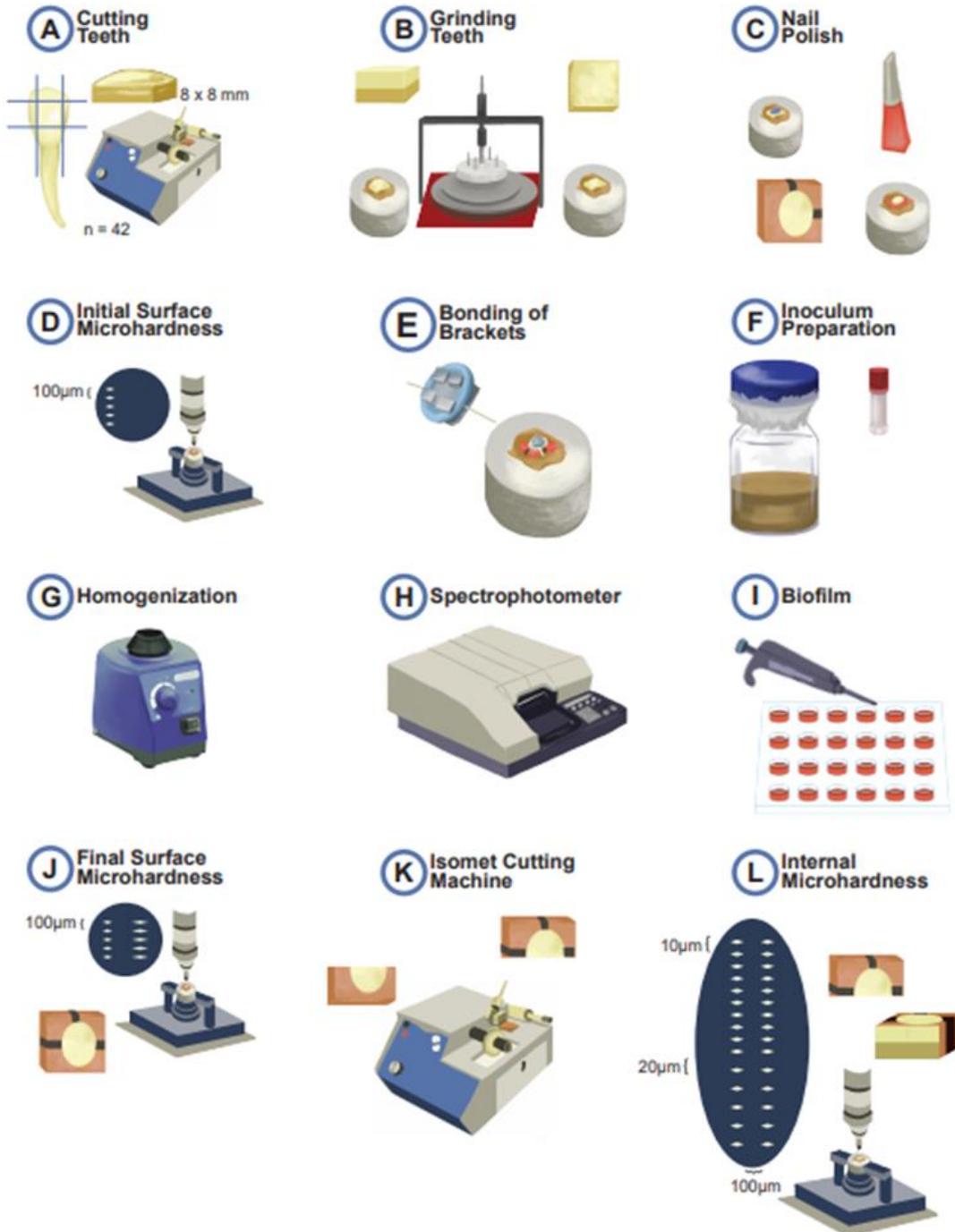
6. Jasberg H, Tervahartiala T, Sorsa T, Soderling E, Haukioja A. Probiotic intervention influences the salivary levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 and Tissue Inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in healthy adults. *Archives of oral biology*. 2018 Jan;85:58-63.
7. Yang J, Qian K, Wang C, Wu Y. Roles of Probiotic Lactobacilli Inclusion in Helping Piglets Establish Healthy Intestinal Inter-environment for Pathogen Defense. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2017 Mar 30.
8. Magro DO, de Oliveira LM, Bernasconi I, Ruela Mde S, Credidio L, Barcelos IK, et al. Effect of yogurt containing polydextrose, *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019: a randomized, double-blind, controlled study in chronic constipation. *Nutrition journal*. 2014 Jul 24;13:75.
9. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Feb;43 (2):843-9.
10. Yli-Knuutila H, Snall J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral microbiology and immunology*. 2006 Apr;21 (2):129-31.
11. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2003 Dec;46 (11-12):471-8.
12. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries research*. 2001 Nov-Dec;35 (6):412-20.
13. de Mazer Papa AM, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Arthur RA, Cury JA. Effect of milk and soy-based infant formulas on in situ demineralization of human primary enamel. *Pediatric dentistry*. 2010 Jan-Feb;32 (1):35-40.
14. Cildir SK, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, et al. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *European journal of orthodontics*. 2009 Aug;31 (4):407-11.

15. Beerens MW, Ten Cate JM, van der Veen MH. Microbial profile of dental plaque associated to white spot lesions in orthodontic patients immediately after the bracket removal. *Archives of oral biology*. 2017 Jun;78:88-93.
16. Knosel M, Bojes M, Jung K, Ziebolz D, Renger S. [Increased susceptibility for white spot lesions by surplus orthodontic etching exceeding bracket base area]. *L' Orthodontie francaise*. 2015 Sep;86 (3):233-44.
17. Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RC, Magalhaes AC, Palomari Spolidorio DM, et al. Control of white spot lesion adjacent to orthodontic bracket with use of fluoride varnish or chlorhexidine gel. *TheScientificWorldJournal*. 2015;2015:218452.
18. Benham AW, Campbell PM, Buschang PH. Effectiveness of pit and fissure sealants in reducing white spot lesions during orthodontic treatment. A pilot study. *The Angle orthodontist*. 2009 Mar;79 (2):338-45.
19. Kalha AS. Lack of reliable evidence of the effectiveness of remineralising agents for the treatment of post orthodontic white spot lesions. *Evidence-based dentistry*. 2013 Sep;14 (3):76-7.
20. Benson PE, Parkin N, Dyer F, Millett DT, Furness S, Germain P. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013 Dec 12(12):CD003809.
21. Migliorati M, Isaia L, Cassaro A, Rivetti A, Silvestrini-Biavati F, Gastaldo L, et al. Efficacy of professional hygiene and prophylaxis on preventing plaque increase in orthodontic patients with multibracket appliances: a systematic review. *European journal of orthodontics*. 2015 Jun;37 (3):297-307.
22. Maltz M, Beighton D. Multidisciplinary research agenda for novel antimicrobial agents for caries prevention and treatment. *Advances in dental research*. 2012 Sep;24 (2):133-6.
23. Gizani S, Petsi G, Twetman S, Caroni C, Makou M, Papagianoulis L. Effect of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on white spot lesion development in orthodontic patients. *European journal of orthodontics*. 2016 Feb;38 (1):85-9.
24. Pinto GS, Cenci MS, Azevedo MS, Epifanio M, Jones MH. Effect of yogurt containing *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* DN-173010 probiotic on

- dental plaque and saliva in orthodontic patients. *Caries research*. 2014;48 (1):63-8.
25. Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingstrom P, Campus G. The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients*. 2013 Jul 5;5 (7):2530-50.
26. Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. *Clinical oral investigations*. 2014 Apr;18 (3):857-62.
27. Petersson LG, Magnusson K, Hakestam U, Baigi A, Twetman S. Reversal of primary root caries lesions after daily intake of milk supplemented with fluoride and probiotic lactobacilli in older adults. *Acta odontologica Scandinavica*. 2011 Nov;69 (6):321-7.
28. Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. *Archives of oral biology*. 2001 Aug;46 (8):705-12.
29. Fernandez CE, Giacaman RA, Tenuta LM, Cury JA. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB21 on the Cariogenicity of *Streptococcus mutans* UA159 in a Dual-Species Biofilm Model. *Caries research*. 2015;49 (6):583-90.
- 30.30. Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F, Neeser JR. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *European journal of oral sciences*. 2002;110, :218-24.
- 31.31. Basyigit G, Kuleasan H, Karahan AG. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2006 Sep;33 (9):796-800.
- 32.32. Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC oral health*. 2010 Jul 2;10:18.

Legends

Figure 1. Schematic representing the laboratory stages developed.



TABLES

Table 1 . Moisture, Protein Fat, and calcium of milk, probiotic milk, fermented milk and probiotic fermented milk.

	Milk	Probiotic Milk	Fermented Milk	Probiotic Fermented Milk
Moisture	88.1 ^a ±0.04	87.9 ^a ±0.04	88.1 ^a ±0.04	82.7 ^a ±0.21
Protein	3.7 ^a ±0.08	3.8 ^a ±0.07	4.3 ^a ±0.11	4.2 ^a ±0.03
Fat	3.4 ^a ±0.16	3.3 ^a ±0.05	2.91 ^a ±0.03	2.82 ^b ±0.26
Calcium	124.4 ^a ± 0.25	123.9 ^a ± 0.15	125.1 ^a ± 0.33	125.3 ^a ±0.42

* Values are expressed ± standard deviation. Moisture, Protein and Fat are expressed in % w/w. Calcium is expressed in mg/100g. Analysis performed in triplicate. ^{ab} Different letters at the same line indicate statistical difference according the Tukey test (p<0.05).

Table 2 . Surface microhardness of enamel around orthodontic brackets before and after treatments

Treatment	Surface microhardness		p-value*
	Before	After	
Group 1 (negative control)	310,60 ± 22,55	208,87 ± 58,77 ^a	0,013
Group 2 (positive control)	302,10 ± 16,07	107,21 ± 22,45 ^b	< 0,001
Group 3 (milk)	328,70 ± 24,56	67,71 ± 24,39 ^c	< 0,001
Group 4 (milk + probiotic)	300,83 ± 10,87	35,53 ± 9,04 ^d	< 0,001
Group 5 (fermented milk)	325,47 ± 26,06	50,84 ± 23,41 ^{cd}	< 0,001
Group 6 (fermented milk + probiotic)	311,87 ± 19,81	94,94 ± 50,38 ^{bc}	< 0,001
p-value	0,066 [†]	< 0,001 [‡]	

Values are expressed as mean ± standard deviation. * Student t test for paired samples; † one-way ANOVA; ‡ Kruskal-Wallis test: abcd means followed by distinct letters vertically (column) are statistically different by the Mann-Whitney test.

Table 3 . Percentage of loss of superficial microhardness and internal microhardness, according to the treatments.

Treatment	Parameters	
	%PMS	MI - ΔZ
Group1(negative control)	35,04 ± 39,68 ^a	1669,72 ± 1225,09
Group 2(positive control)	65,33 ± 11,30 ^b	728,51 ± 892,15
Group 3 (fermented cow's milk)	79,79 ± 7,95 ^c	2027,19 ± 1190,70
Group 4(fermented cow's milk+ probiotics)	87,63 ± 5,14 ^d	1875,58 ± 1214,27
Group 5 (yogurt)	87,44 ± 14,06 ^{cd}	1703,68 ± 1522,18
Group 6(yogurt+probiotics)	66,80 ± 34,79 ^{bcd}	1651,89 ± 1521,81
p-value	< 0,001*	0,423 [†]

% PMS, percentage of loss of surface microhardness; MI, internal microhardness. Values are expressed as median ± interquartile range, except for MI - ΔZ which was expressed as mean ± standard deviation. * Kruskal-Wallis test: abcd averages followed by distinct vertical letters (column) are statistically different by the Mann-Whitney test; † ANOVA one-way.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mecanismo de ação dos probióticos na cavidade oral ainda não está estabelecido, embora esteja associado a diminuição no número dos patógenos cariogênicos, prevenindo a disbiose e mantendo dessa forma o biofilme em níveis compatíveis com a saúde. O uso de bráquetes ortodônticos dificulta a higienização e provoca um maior acúmulo bacteriano, provocando uma desmineralização da superfície do esmalte dentário. Esse estudo provou que, *in vitro*, os probióticos apesar de apresentarem adesividade ao bráquete, não apresentam atividade de remineralização ao esmalte bovino, logo não funcionam como tratamento no processo de desmineralização.

6 CONCLUSÕES

Leite bovino e leite fermentado contendo probiótico não são capazes de prevenir a desmineralização do esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodônticos.

- Os leites bovinos e fermentdo contendo probiótico não são capazes de promover bacterioterapia sob pool de cepas ATCC de SS e SM
- Leite bovino e leite fermentado com probiótico apresentam adesividade aos bráquetes, no entanto, leite bovino e leite fermentado sem probiótico não apresentam adesividade aos bráquetes
- Probióticos, não foram capazes de prevenir a perda de microdureza superficial do esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodônticos
- Todos os produtos lácteos testados, contendo ou não probiótico, não foram capazes de prevenir a perda de microdureza interna do esmalte bovino ao redor de bráquetes ortodônticos
- Os produtos não foram eficazes no tratamento da desmineralização

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHOLA, A. J. et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*, v. 47, n. 11, p. 799-804, Nov 2002.
- ALLAKER, R. P.; IAN DOUGLAS, C. W. Non-conventional therapeutics for oral infections. *Virulence*, v. 6, n. 3, p. 196-207, 2015.
- ALLAKER, R. P.; STEPHEN, A. S. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr Oral Health Rep*, v. 4, n. 4, p. 309-318, 2017.
- ALOK, A. et al. Probiotics: A New Era of Biotherapy. *Adv Biomed Res*, v. 6, p. 31, 2017.
- ANTONIO, A. G. et al. Effect of *Coffea canephora* aqueous extract on microbial counts in ex vivo oral biofilms: a case study. *Planta Med*, v. 78, n. 8, p. 755-60, May 2012.
- BERTOLINI, M. M. et al. Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater*, v. 30, n. 8, p. 793-8, Aug 2014.
- BEYTH, N. et al. Effect of sustained-release chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 123, n. 3, p. 345-8, Mar 2003.
- BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*, v. 154, n. 3, p. 87-97, Mar 15 2012.
- CAGLAR, E. et al. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand*, v. 66, n. 3, p. 154-8, Jun 2008.
- CAGLAR, E.; KARGUL, B.; TANBOGA, I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis*, v. 11, n. 3, p. 131-7, May 2005.
- CHHOUR, K. L. et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 2, p. 843-9, Feb 2005.
- COMELLI, E. M. et al. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci*, v. 110, n. 3, p. 218-24, Jun 2002.
- CORBITT, M. et al. A Systematic Review of Probiotic Interventions for Gastrointestinal Symptoms and Irritable Bowel Syndrome in Chronic Fatigue

Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis (CFS/ME). *Probiotics Antimicrob Proteins*, Feb 20 2018.

DE MORENO DE LEBLANC, A. et al. Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. *BMC Immunol*, v. 9, p. 27, Jun 13 2008.

FEATHERSTONE, J. D. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent*, v. 2 Suppl 1, p. 259-64, 2004.

FONSECA, E. P. et al. Factors associated with absences from orthodontic treatment at a dental specialty center. *Cien Saude Colet*, v. 23, n. 1, p. 287-294, Jan 2018.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. *Gut*, v. 32, n. 4, p. 439-42, Apr 1991.

GIZANI, S. et al. Effect of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on white spot lesion development in orthodontic patients. *Eur J Orthod*, v. 38, n. 1, p. 85-89, Feb 2016.

GUARNER, F. et al. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr*, v. 93, n. 6, p. 783-6, Jun 2005.

JULIEN, K. C.; BUSCHANG, P. H.; CAMPBELL, P. M. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *Angle Orthod*, v. 83, n. 4, p. 641-7, Jul 2013.

KELLER, M. K. et al. Probiotic supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries Res*, v. 46, n. 2, p. 140-6, 2012.

KLEINBERG, I. SensiStat. A new saliva-based composition for simple and effective treatment of dentinal sensitivity pain. *Dent Today*, v. 21, n. 12, p. 42-7, Dec 2002.

KNOSEL, M. et al. Increased susceptibility for white spot lesions by surplus orthodontic etching exceeding bracket base area. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 141, n. 5, p. 574-82, May 2012.

KOLENBRANDER, P. E. et al. The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J Bacteriol*, v. 180, n. 2, p. 290-5, Jan 1998.

LUCCHESI, A.; GHERLONE, E. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod*, v. 35, n. 5, p. 664-8, Oct 2013.

Manuals of food quality control. 11. Management of food control programmes. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Food Nutr Pap, v. 14, n. 11, p. 1-139, 1991.

MENEZES, L. M. et al. Hypersensitivity to metals in orthodontics. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v. 126, n. 1, p. 58-64, Jul 2004.

MEURMAN, J. H. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci, v. 113, n. 3, p. 188-96, Jun 2005.

MEURMAN, J. H.; STAMATOVA, I. Probiotics: contributions to oral health. Oral Dis, v. 13, n. 5, p. 443-51, Sep 2007.

MHASKE, S. P. et al. Clinicomicrobiological Evaluation of 2% Chitosan Mouthwashes on Dental Plaque. J Contemp Dent Pract, v. 19, n. 1, p. 94-97, Jan 1 2018.

NASSUR, C., ALEXANDRIA, A. K.; POMARICO L, DE SOUSA V. P.; CABRAL, L. M.; MAIA, L. C. Characterization of a new TiF(4) and β -cyclodextrin inclusion complex and its in vitro evaluation on inhibiting enamel demineralization. Arch Oral Biol. v. 58, n. 3, p. 239-247, Mar 2013

NASSUR, C.; POMARICO, L.; MAIA, L. C. Reliability analysis of two methods for measuring active enamel demineralization: An in vitro study. Eur J Dent, v. 7, n. 2, p. 159-64, Apr 2013.

NICHOLS, G. A. L. et al. Long-term changes in oral health-related quality of life of standard, cleft, and surgery patients after orthodontic treatment: A longitudinal study. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v. 153, n. 2, p. 224-231, Feb 2018.

NIKAWA, H. et al. Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. Int J Food Microbiol, v. 95, n. 2, p. 219-23, Sep 1 2004.

PASCOTTO, R. C. et al. In vivo effect of a resin-modified glass ionomer cement on enamel demineralization around orthodontic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v. 125, n. 1, p. 36-41, Jan 2004.

PETTI, S.; TARSITANI, G.; D'ARCA, A. S. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. Arch Oral Biol, v. 46, n. 8, p. 705-12, Aug 2001.

ROBINSON, C. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. Eur Arch Paediatr Dent, v. 10, n. 3, p. 136-40, Sep 2009.

SANPEI, S.; ENDO, T.; SHIMOOKA, S. Caries risk factors in children under treatment with sectional brackets. Angle Orthod, v. 80, n. 3, p. 509-14, May 2010.

SCHULER, I. M. et al. Dental Caries and Developmental Defects of Enamel in the Primary Dentition of Preterm Infants: Case-Control Observational Study. *Caries Res*, v. 52, n. 1-2, p. 22-31, 2018.

SEMINARIO-AMEZ, M. et al. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 22, n. 3, p. e282-e288, May 1 2017.

SHIM, S. H.; HAN, D. H.; KHANG, Y. H. Association between Dental Caries and Delayed Growth in Korean Children. *Caries Res*, v. 52, n. 1-2, p. 71-77, 2018.

SHIN, H. S.; BAEK, D. H.; LEE, S. H. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. *J Gen Appl Microbiol*, Jan 25 2018.

SOUZA, J. G. S. et al. Contextual and Individual Determinants of Root Caries in Older People. *Caries Res*, v. 52, n. 3, p. 253-261, Jan 27 2018.

SOUZA, T. M. P. A.; FREIRES, I. A.; LIMA, D. M. B.; JOVITO, V. C.; ALMEIDA, L. F. D.; CASTRO, R. In Vitro Adherence of *Streptococcus mutans* to the surface of metallic and polycarbonate orthodontic brackets. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.17, n.1, p.91-96, 2013

TUFEKCI, E. et al. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod*, v. 81, n. 2, p. 206-210, Mar 2011.

TWETMAN, S. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Braz Oral Res*, v. 26 Suppl 1, p. 64-70, 2012.

WOLFF, M. S.; LARSON, C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res*, v. 23 Suppl 1, p. 31-38, 2009.

ZHANG, J. et al. The effect of antiseptic oral sprays on dental plaque and gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg*, Feb 6 2018.