

# Avaliação qualitativa e quantitativa de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes em tratamento com aparelho fixo

Qualitative and quantitative evaluation of *Streptococcus mutans* in the saliva of patients undergoing treatment with a fixed appliance

Gabriela Palmer Pamponet de Oliveira<sup>1</sup>, Eluiza Ramos Silva Nogueira Porto<sup>2</sup>, Fabiano Santos Corrêa da Silva<sup>3</sup>, Lidiane de Castro Soares<sup>4</sup>, Oswaldo Luiz Cecilio Barbosa<sup>5</sup>, Carla Cristina Neves Barbosa<sup>6</sup>

Como citar esse artigo. de Oliveira GPP, Porto ERSN, da Silva FSC, Soares LC, Barbosa OLC, Barbosa CCN. Avaliação qualitativa e quantitativa de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes em tratamento com aparelho fixo. Rev Fluminense de Extensão Universitária. 2022;12(2):02-06.



## Resumo

Os dispositivos de aparelhos ortodônticos dificultam a higienização adequada, alterando a quantidade e a composição da microbiota bucal. Há uma relação direta entre o maior acúmulo de biofilme e a presença de bandas, bráquetes e outros aparelhos, e maior incidência de desmineralização do esmalte e lesões cáries. O objetivo desse estudo foi avaliar os níveis salivares de *Streptococcus mutans*, antes e durante o tratamento ortodôntico com aparatologia fixa, com o intuito de demonstrar a relevância da instrução de higiene bucal feita pelo cirurgião-dentista. A amostra foi constituída de 20 pacientes em tratamento ortodôntico. Para tanto, foram realizadas coletas de saliva no dia da instalação da aparatologia fixa e 28 dias após a instalação do aparelho. A saliva coletada passou por análise microbiológica, através do Ágar Mitis Salivarius, para identificação e contagem bacteriana; para confirmação da espécie foram realizadas provas bioquímicas com a fermentação de manitol, sorbitol e rafinose. De acordo com a análise microbiológica feita nesse estudo, observou-se aumento do número de UFC/ml de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo em ambos os grupos; porém, no grupo de pacientes sem instrução de higiene bucal, o aumento do número de colônias bacterianas foi maior. O presente estudo mostrou que houve um aumento na contagem do número de bactérias após 28 dias da instalação da aparatologia fixa nos 20 pacientes, revelando a importância da instrução de higiene bucal.

**Palavras-chave:** Ágar Mitis Salivarius; Adesão bacteriana; Aparelho ortodôntico fixo; Cárie dentária; Microbiota oral; *Streptococcus mutans*.

## Abstract

The orthodontic appliance devices make proper oral hygiene difficult, changing the amount and composition of the oral microbiota. There is a direct relationship between the greater accumulation of biofilm and the presence of molar bands, brackets and other orthodontic appliances, and greater incidence of enamel demineralization and carious lesions. The goal of this study was to evaluate the salivary levels of *Streptococcus mutans*, before and during the orthodontic treatment with fixed appliances, in order to demonstrate the relevance of oral hygiene instruction given by the dentist. The sample consisted of 20 patients in orthodontic treatment. For this, saliva collections were realized on the day of installation of fixed appliance and 28 days after installation of the fixed appliance. The saliva collected passed by microbiological analysis, through Ágar Mitis Salivarius, for identification and bacterial count; biochemical tests were carried out with the fermentation of mannitol, sorbitol and raffinose to confirm the species. According to the microbiological analysis made in this study, there was an increase in the number of Colony Forming Units per milliliters of saliva (CFU/ml) of *Streptococcus mutans* in saliva of patients with orthodontic fixed appliances in both groups; however, in the group of patients without oral hygiene instruction, the increase of the number of bacterial colonies was bigger. The present study showed that there was an increase in the count of the number of bacteria after 28 days of installation of fixed orthodontic appliance in the 20 patients, revealing the importance of oral hygiene instruction.

**Keywords:** Ágar Mitis Salivarius; bacterial adhesion; orthodontic fixed appliance; caries; oral microbiota; *Streptococcus mutans*.

## Introdução

Em busca da estética, há uma maior procura por tratamentos odontológicos corretivos, principalmente na área que diz respeito aos procedimentos ortodônticos. Na Odontologia moderna a busca pela estética dental vem crescendo. Esse fato é notado através da autopercepção dos pacientes quanto às irregularidades dentárias e o quanto seu impacto na

estética interfere no aspecto psicoemocional de cada um fazendo com que estes procurem, através de um cirurgião-dentista, a harmonia e o equilíbrio dental.

Os dispositivos de aparelhos ortodônticos dificultam a higienização adequada, alterando a quantidade e a composição da microbiota bucal. Há uma relação direta entre o maior acúmulo de biofilme e a presença de bandas, bráquetes e outros aparelhos, e maior incidência de desmineralização do esmalte e lesões cáries. A formação do biofilme começa

Afiliação dos autores:

<sup>1</sup>Cirurgião-dentista especialista em Ortodontia pela Universidade de Vassouras, Vassouras/RJ- Brasil.

<sup>2</sup>Cirurgião-dentista graduado pelo Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA, Volta Redonda/RJ- Brasil.

<sup>3</sup>Bióloga (Doutora) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/RJ- Brasil.

<sup>4</sup>Professor Doutorando da Disciplina Implantodontia/Saúde Coletiva do curso de Odontologia da Universidade de Vassouras / RJ- Brasil.

<sup>5</sup>Professora Doutoranda da Disciplina Ortodontia/Odontopediatria do curso de Odontologia da Universidade de Vassouras / RJ- Brasil.

\* Email de correspondência: gaby.palmer@uol.com.br

Recebido em: 15/11/2022. Aceito em: 15/12/2022.

depois da instalação dos aparelhos ortodônticos, com a fixação das bactérias colonizadoras primárias, geralmente estreptococos, e evolui culminando com o surgimento de bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos. Os estreptococos estão associados a processos patológicos, desde cáries dentárias, em pacientes com pouca higienização bucal e dieta rica em açúcares, até bacteremias, relacionada à remoção das bandas ortodônticas. A microbiota anaeróbia estrita associa-se a quadros de doença periodontal<sup>1</sup>.

Os bráquetes são as áreas onde há maior colonização de microrganismos formadores de biofilme dentário, atuam como retentores de alimentos e, como consequência, favorecem o crescimento e desenvolvimento microbiano. A presença de bráquetes ainda dificulta a higienização bucal. A mudança no meio bucal altera a natureza do biofilme levando a um aumento da população microbiana de estreptococos, principalmente *Streptococcus mutans*, e *Lactobacillus*<sup>2</sup>.

*Streptococcus mutans* é o nome dado a um grupo de sete espécies relacionadas e coletivamente referidas como estreptococos mutans. Estão presentes no processo de formação da cárie dentária, pois tem a capacidade de se aderir à superfície do esmalte dentário, produzir ácidos, construir reservas de glicogênio e sintetizar polissacarídeos extracelulares<sup>3</sup>.

O aumento de *Streptococcus mutans* é o principal causador de alterações na microbiota bucal durante o tratamento ortodôntico, pois esses microrganismos têm alto potencial de adesão às áreas retentivas dos aparelhos e capacidade de produzir e sobreviver em meio ácido. O crescimento desse microrganismo tem relação com o aparecimento de lesões de cárie, e suas concentrações na saliva são utilizadas como fator preditivo do risco à cárie no paciente<sup>4</sup>.

Sabendo que os componentes do aparelho ortodôntico fixo alteram a microbiota bucal, o presente estudo objetivou avaliar os níveis quantitativos e qualitativos de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes de ambos os gêneros portadores de aparatologia ortodôntica fixa, com intuito de justificar a maior prevalência da doença cárie e de problemas periodontais, e a necessidade de enfatizar a instrução de higiene bucal nesses pacientes.

## Métodos e materiais

### Seleção da amostra

Foram selecionados 20 pacientes, aleatoriamente, que procuraram por atendimento odontológico na área da Ortodontia na clínica odontológica da Universidade de Vassouras (RJ). Todos necessitando de tratamento ortodôntico com aparelho fixo. Os pacientes selecionados foram de ambos os gêneros, sendo 13 do gênero feminino e 7 do gênero masculino, com idades

variadas. Os pacientes que participaram do estudo não apresentavam lesões de mancha branca e nem cárie ativa previamente ao início do estudo. Os mesmos foram informados sobre os objetivos e riscos da pesquisa e os que concordaram em participar voluntariamente foram solicitados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação. Esta pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa – CEP da USS, com o parecer nº 438.030.

Os pacientes foram divididos em dois grupos (grupo A e grupo B) com 10 componentes em cada grupo. Os indivíduos do grupo A não receberam instrução de higiene bucal antes da instalação do aparelho ortodôntico fixo e os do grupo B receberam instrução de higiene bucal 15 dias antes da instalação do aparelho ortodôntico fixo.

### Coleta da saliva

Para a presente pesquisa foi utilizada saliva como amostragem dos fenômenos microbiológicos. Os dois tempos experimentais foram distribuídos da seguinte forma:

- T<sub>0</sub> = coleta inicial, no momento da instalação do aparelho ortodôntico fixo.
- T<sub>1</sub> = coleta final, 28 dias após a instalação do aparelho ortodôntico fixo.

As coletas foram realizadas a partir da expectoração de 2 ml a 4 ml de saliva pelos pacientes, estimulada através da movimentação dos lábios, língua e bochechas. As amostras foram coletadas em frascos de plástico esterilizados e, imediatamente, conservadas e transportadas em gelo, onde foram mantidas até o processamento que ocorreu em, no máximo, duas horas no laboratório de Microbiologia da Universidade de Vassouras.

Para cada amostra analisada foi realizada a homogeneização (agitação em vortex por 30 segundos) e após esse procedimento, foi retirado 1 ml da saliva e acrescida em 9 ml de NaCl 0,85% formando a diluição 10<sup>-1</sup>. A partir deste momento realizou-se uma diluição seriada até 10<sup>-5</sup>.

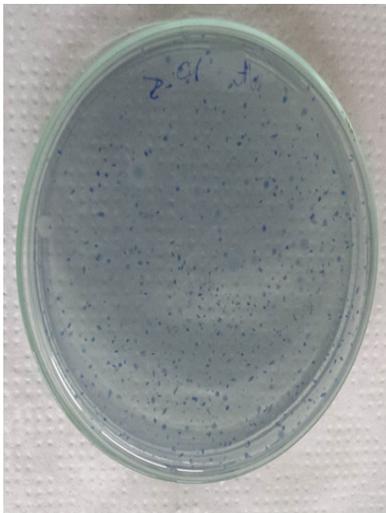
Em seguida, da diluição 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> foi retirado 1 ml e inoculado, em triplicata, em Ágar Mitis Salivarius suplementado com 15% de sacarose e 200U/L de bacitracina, meio de cultura seletivo para o crescimento de *Streptococcus mutans*, através da técnica de Pour Plate (Figura 01).

Após a incubação de 48 horas em estufa a 37°C, foi feita a contagem das colônias azuis e com morfologia arredondada, características dos *Streptococcus mutans* (Figura 02). As colônias bacterianas foram contadas em cada uma das três placas de Petri de cada paciente e após essa contagem foi feita a média entre a quantidade de colônias encontradas obtendo assim o número de Unidades Formadoras de Colônias por ml de saliva (UFC/ml).

Foram consideradas contáveis apenas as placas que apresentaram entre 30-300 colônias. A contagem



**Figura 1.** Meio de cultura seletivo para o crescimento de *Streptococcus mutans*, através da técnica de *Pour Plate*.



**Figura 2.** Colônias azuis e com morfologia arredondada, características dos *Streptococcus mutans*.

de colônias dos pacientes do grupo A foi realizada na diluição  $10^{-5}$  enquanto que para as amostras dos pacientes do grupo B foi realizado em  $10^{-4}$ , pois o número de colônias encontradas na diluição  $10^{-4}$  do grupo A foi superior ao padrão de contagem.

Foi realizada uma separação de três colônias isoladas com morfologia característica de *Streptococcus mutans*, para execução de testes de identificação adicionais como catalase e coloração pelo método de gram, e fermentação de manitol, sorbitol e rafinose.

## Resultados

De acordo com a análise microbiológica feita nesse estudo, pode-se observar que houve aumento do número de UFC/ml de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes portadores de aparelho ortodôntico fixo

**Tabela 01.** Quantidade média de UFC/ml de *Streptococcus mutans* presentes da saliva dos pacientes do grupo A.

Pacientes	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>
P.1	$1,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
P.2	$1,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
P.3	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
P.4	$1,8 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
P.5	$1,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
P.6	$2,0 \times 10^7$	$2,52 \times 10^7$
P.7	$2,0 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
P.8	$2,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
P.9	$2,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
P.10	$2,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$

**Tabela 02.** Quantidade média de UFC/ml de *Streptococcus mutans* presentes da saliva dos pacientes do grupo B.

Pacientes	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>
P.1	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
P.2	$0,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
P.3	$0,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
P.4	$1,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
P.5	$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
P.6	$1,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
P.7	$1,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
P.8	$2,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
P.9	$1,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
P.10	$1,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$

em ambos os grupos. As tabelas 01 e 02 mostram as médias dos resultados obtidos dos pacientes do grupo A (sem instrução de higiene bucal) e B (com instrução de higiene bucal) nos tempos T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>. Comparando as tabelas dos pacientes do grupo A e B, é possível notar que houve aumento na contagem bacteriana no grupo que não teve instrução de higiene bucal.

Em relação ao grupo A, pacientes que não receberam instrução bucal, foi possível observar uma correlação de Pearson de  $r = 0,87$  e  $p = 0,0008$  entre T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>. Em aproximadamente 87% dos pacientes ocorreu aumento no número de bactérias na saliva após a colocação do aparelho. A contagem bacteriana só pôde ser realizada com aumento da diluição.

Em relação ao grupo B, pacientes com instrução bucal, entre T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> existe uma correlação linear de Pearson de  $r = 0,98$  e  $p = 0,0001$ . Houve redução na contagem bacteriana na saliva em aproximadamente

98% dos pacientes, após a colocação do aparelho.

Ao comparar  $T_0$  do grupo A com  $T_0$  do grupo B foi possível observar uma correlação linear de Pearson de  $r = 0,73$  e  $p = 0,0158$ . De igual modo, ao comparar  $T_1$  do grupo A com  $T_1$  do grupo B foi possível observar uma correlação linear de Pearson de  $r = 0,5315$  e  $p = 0,1138$ , demonstrando redução na contagem bacteriana no grupo que recebeu instrução de higiene bucal.

## Discussão

A colocação do aparelho ortodôntico fixo aumenta o número de microrganismos no meio bucal devido aos seus componentes e demais acessórios, como bandas, bráquetes, ligaduras elásticas, fios, entre outros, que por terem um design complexo favorecem a adesão de bactérias, principalmente *Streptococcus mutans*<sup>5-7</sup>, dificultando também a higienização feita pelo paciente<sup>5-8</sup>. Porém, há discordância<sup>9</sup> no que diz respeito ao fato do design interferir na colonização bacteriana nos aparelhos ortodônticos, afirmando que essa colonização bacteriana está diretamente ligada ao fato do paciente ter sido ou não instruído pelo dentista quanto à correta higienização bucal que deverá ser exercida pelo mesmo, reduzindo o número de bactérias patogênicas. O presente estudo mostrou que o design dos componentes e demais acessórios do aparelho ortodôntico fixo é que influencia no aumento de colônias bacterianas, por tornar a escovação mais difícil e por aumentar as áreas de retenção de placa, pois todos os pacientes que participaram do presente estudo tiveram instrução de higiene bucal no momento da instalação do aparelho e mesmo assim houve aumento na contagem das colônias bacterianas.

Alguns efeitos indesejáveis têm sido imputados à utilização do aparelho ortodôntico fixo por sua grande quantidade de áreas retentivas que favorecem o acúmulo de restos alimentares, servindo de substrato para bactérias cariogênicas<sup>2,10</sup>, que irão se fixar à superfície dos bráquetes influenciadas por vários fatores que interagem entre si, dentre eles estão os componentes salivares da película, as propriedades dos diferentes microrganismos e os padrões de aderência das bactérias nos diferentes tipos de bráquetes ortodônticos<sup>9,11</sup>. Pacientes com aparelho ortodôntico possuem a estrutura da placa bacteriana diferenciada daqueles que não possuem aparatos ortodônticos, pois a tendência do acúmulo bacteriano é maior e conseqüentemente torna a colonização predisponente à patogenicidade<sup>12</sup>.

A aderência bacteriana se dá por meio de adesinas que se ligam aos receptores do hospedeiro, estas são fornecedoras de sítios específicos dando suporte ao seguimento bacteriano em superfícies duras que se dá pelo fato das bactérias também possuírem receptores formando assim a co-agregação, pois elas fazem ligação células-células<sup>13</sup>. Alguns componentes da saliva, como

a amilase, contribuem também para a colonização bacteriana, maturando o biofilme através da adesão e acúmulo de várias espécies de bactérias<sup>13</sup>. Porém, a presença de histaminas e lipozimas na saliva contribuem para um decréscimo da adesão de *Streptococcus mutans* nos bráquetes por possuírem atividade antibacteriana<sup>11,13</sup>. A maturação do biofilme depende do design e material do bráquete, proximidade do bráquete ao sulco gengival, área de superfície do esmalte labial relativa ao bráquete, posição do dente no arco, material de ligação e, principalmente, hábitos individuais de higiene bucal<sup>14</sup>.

Para melhor entendimento da adesão entre bráquetes e microrganismos é preciso compreender os princípios da física que regem as interações entre diferentes materiais. Para se equilibrar, um átomo e uma molécula se unem através de forças de atração mútua. Essa união é feita graças às forças emanadas em todas as direções de um átomo. Em áreas de superfície onde átomos e moléculas não se encontram equilibrados é gerada uma tensão denominada área livre de tensão, que irá contribuir substancialmente para a adesão bacteriana, pois quanto mais alta a energia de tensão do bráquete mais forte será seu poder de adesão<sup>11,13</sup>.

Aparelhos ortodônticos fixos podem induzir mudanças no meio bucal como redução dos níveis de pH, aumento da quantidade de placa e crescimento da colonização de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*<sup>5,7,11-12,15-17</sup>, sendo que o primeiro está relacionado ao início da lesão cariiosa e o segundo possui menor capacidade de adesão à superfície lisa do dente, estando associado a fase avançada da lesão<sup>5</sup>. Tais bactérias, a partir da metabolização de açúcares presentes na dieta, produzem ácidos e sobrevivem neste meio. A produção destes ácidos pode ocasionar desmineralização da estrutura dental e surgimento de lesões de mancha branca podendo progredir para uma cavitação<sup>4,6,10,16</sup>.

A saliva interfere no equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização do esmalte, atuando como um fator importante na adesão de *Streptococcus mutans* aos bráquetes ortodônticos, sendo que mudanças específicas, como o aumento do pH, capacidade tampão e taxa de fluxo contribuem para o declínio da atividade cariogênica<sup>11,18</sup>. Achados de um estudo<sup>11</sup> indicam que a presença de saliva e a formação prematura da película salivar diminuem a adesão de bactéria nos bráquetes se comparados àqueles não cobertos por saliva.

Pacientes em tratamento ortodôntico são mais vulneráveis a apresentarem desmineralização de esmalte e lesões cariosas, devido ao aumento no número de *Streptococcus mutans*, principal espécie associada ao desenvolvimento de tais lesões<sup>5-6,12-13</sup>. A descalcificação tende a ter uma maior prevalência em pacientes em tratamento ortodôntico com aparelho fixo porque os bráquetes, bandas, fios e outros acessórios possuem superfícies irregulares criando áreas de estagnação de placa

o que torna a escovação mais difícil e limita mecanismos naturais de limpeza, como o movimento da musculatura bucal e saliva<sup>19</sup>, podendo, também, causar gengivite<sup>5,7,9</sup>.

Estudos comparativos<sup>5,8,13,17,20</sup> mostram que a presença de componentes do aparelho ortodôntico fixo aumentam significativamente o número de *Streptococcus mutans* na cavidade bucal. Os resultados encontrados nessa pesquisa concordam com tais estudos supracitados.

Apesar de no presente estudo terem sido encontradas contagens maiores de bactérias após 28 dias da instalação do aparelho ortodôntico fixo, autores<sup>10</sup> afirmam que, à longo prazo, a microbiota não se mantém acidúrica e acidogênica.

Comparando com um estudo<sup>4</sup> em que o autor analisou o aumento de *Streptococcus mutans* na saliva de 19 pacientes, 14 deles apresentaram aumento da contagem bacteriana e 5 deles apresentaram redução, ao contrário do presente estudo, no qual todos os 20 pacientes analisados apresentaram aumentos variados do nível de *Streptococcus mutans*. A diferença entre ambos os estudos é que na atual pesquisa os pacientes analisados usavam aparelho ortodôntico fixo e no estudo referenciado os pacientes usavam aparelho ortodôntico móvel.

## Conclusão

O presente estudo mostrou, por meio de resultados microbiológicos, que houve uma diferença relevante no número de bactérias entre os pacientes que receberam instrução de higiene bucal se comparado com aqueles que não foram instruídos, demonstrando que uma correta e prévia instrução de higiene bucal, reforçada a cada consulta, pode prevenir que o aumento dessas bactérias se torne nocivo a saúde bucal dos pacientes

## Referências

1. Pithon MM, Santos RL, Alviano WS, Ruellas ACO, Araújo MTS. Avaliação quantitativa de *S. mutans* e *C. albicans* em portadores de aparelhos disjuntores tipo Haas e Hyrax. Dental Press J Orthod 2012; 17(3):33.e1-6.
2. Souza TMPA, Freires IA, Lima DNB, Jovito VC, Almeida LFD, Castro RD. Aderência in vitro de *Streptococcus mutans* à superfície de braquetes ortodônticos metálicos e de policarbonato. R bras ci Saúde 2013; 17(1):91-96.
3. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. Nutrients 2010; 2(3):290-298.
4. Pereira SMR, Freitas LMA, Pithon MM, Souza RA, Menezes APO. Avaliação qualitativa e quantitativa de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes em tratamento ortodôntico com aparelhos removíveis. OrtodontiaSPO 2013; 46(1):469-73.
5. Rezende CLRD, Soares MF, Pereira CV, Oliveira Jr. G. Influência da aparatologia ortodôntica na colonização microbiana das superfícies dentárias. R. Dental Press Ortodon Ortop Facial 2001; 6(2):71-78.
6. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. American Journal of Orthodontics and Dentofacial orthopedics 2008; 133(6):882-888.
7. Calabrich CFC, Barbosa MC, Simionato MRL, Ferreira RFA. Avaliação da atividade antimicrobiana de adesivo ortodôntico associado a verniz de clorexidina e timol na

colagem de braquetes. Dental Press J Orthod 2010; 15(4):62-8.

8. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida NM, Sánchez-Pérez L, Alanís-Tavira J. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and Lactobacillus. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010; 15(6):e924-9.
9. Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. European Journal of Orthodontics 2010; 32(1):94-99.
10. Ribeiro LGM, Hashizume LN, Maltz M. Níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva de pacientes portadores de aparelhos ortodôntico fixo. Ortodontia Gaúcha 2004; 8:28-32.
11. Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. Angle Orthodontist 2007; 77(6):1090-1095.
12. Silva LJG, Mattos FS, Silva MG, Araújo AM, Werneck EC. Determinação dos microrganismos encontrados nos braquetes de Alexander e autoligáveis. OrtodontiaSPO 2010; 43(2):343-6.
13. Carneiro RC, Mazzeiro ET, Alvarez-Leite ME. Adesão bacteriana em pacientes sob tratamento ortodôntico - uma revisão crítica da literatura. Orthodontic Sci. Pract. 2011; 4(2):899-904.
14. Jurela A, Repic D, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I, Bosnjak A. The effect of two different bracket types on the salivary levels of *S mutans* and *S sobrinus* in the early phase of orthodontic treatment. Angle Orthodontist 2013; 83(1):140-145.
15. Nascimento LEAG, Pithon MM, Santos RL, Freitas AOA, Alviano DV, Nojima LI, Nojima MCG, Ruellas ACO. Colonization of Streptococcus mutans on esthetic brackets: self-ligating vs conventional. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics 2013; 143(4 Suppl):S72-S77.
16. Bhagchandani J, Singh AK, Mehrotra P, Kumar S, Varshney SR, Varshney KR. Microbial colonization around orthodontic ligature ties: an in-vivo study. APOS Trends in Orthodontics 2013; 3(3):72-77.
17. Maret D, Marchal-Sixou C, Vergnes JN, Hamel O, Georgelin-Gurgel M, Van Der Sluis L, Sixou M. Effect of fixed orthodontic appliances on salivary microbial parameters at 6 months: a controlled observational study. J Appl Oral Sci. 2014; 22(1):38-43.
18. Bonetti GA, Parenti SI, Garulli G, Gatto MR, Checchi L. Effect of fixed orthodontic appliances on salivary properties. Progress in Orthodontics 2013;14:13.
19. Karadas M, Cantekin K, Celikoglu M. Effects of orthodontic treatment with fixed appliance on the caries experience of patients with high and low risk of caries. Journal of Dental Sciences 2011; 6(4):195-199.
20. Sari E, Birinci I, Arun T. Comparison of Streptococcus mutans and Lactobacilli concentrations in wearing removable appliances and banded orthodontic patients. Balkan Military Medical Review 2006; 9:136-138.