

FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO*

BIOFILM FORMATION IN DIFFERENT OXIGEN CONCENTRATIONS

Trein, Marcos Porto**
Togni, Lênio**
Almeida, Vinícius Gomes**
Rösing, Cassiano Kuchenbecker***
Oppermann, Rui Vicente***

RESUMO

Introdução: A placa dental é um biofilme verdadeiro, onde diferentes espécies bacterianas se aderem, formando uma comunidade microbiana complexa. A evolução desse biofilme propicia um maior desenvolvimento de bactérias periodontopatogênicas, de acordo com o substrato disponível e concentrações de oxigênio. **Objetivo:** Avaliar o desenvolvimento do biofilme bacteriano *in situ*, em diferentes tensões de oxigênio. **Materiais e métodos:** Participaram do presente estudo 10 estudantes de odontologia. Foram confeccionados, em resina acrílica, 10 dispositivos intra-orais contendo 4 fragmentos de esmalte bovino. 2 fragmentos foram colocados em contato com o palato e 2 voltados ao meio ambiente bucal livre. Os dispositivos foram analisados em 24, 48, 96 e 168 horas visualmente em termos de formação de biofilme. Em 192 horas, realizou-se teste microbiológico BANA. **Resultados:** Os resultados quantitativos mostraram um desenvolvimento mais rápido do biofilme que estava em contato com o palato, bem como um maior recobrimento da superfície de esmalte ao final do período de análise. Nove dos 20 sítios em contato com o palato foram reagentes ao teste enzimático, na análise microbiológica. Contrariamente, nenhum sítio em contato com o meio ambiente bucal livre reagiu ao teste. **Conclusões:** a) O modelo proposto permite a formação de biofilme em diferentes tensões de oxigênio; b) A formação de biofilme foi mais rápida quando houve menor concentração de oxigênio; c) Bactérias BANA-positivas foram encontradas somente onde houve menor tensão de oxigênio.

UNITERMOS: biofilme; *in situ*; esmalte; oxigênio.

SUMMARY

Introduction: Dental plaque is a true biofilm where different bacterial species adhere, forming a complex microbial community. The evolution of this biofilm propiciates the development of periodontopathogenic bacteria, depending on the available substratum and oxygen concentration. **Objective:** To evaluate the development of bacterial biofilm *in situ* in different oxygen concentrations. **Materials and methods:** 10 dental students participated in the present study. 10 intra-oral devices were created, using acrylic resin, where 4 fragments of bovine enamel were disposed facing opposite directions. 2 fragments were placed touching the palate while the other 2 faced the free oral environment. The devices were analyzed after 24, 48, 96 and 168 hours of use for the visual analysis. At 192 hours, samples were taken for microbial testing by means of the BANA test. **Results:** The results of the quantitative analysis demonstrate a faster development of the biofilm in contact with the palate as well

* Apoio: PIBIC/CNPq, PROPESQ/UFRGS.

** Graduando em Odontologia – Bolsistas de iniciação científica.

*** Professor de Periodontia – UFRGS.

as a larger covering of the enamel surface at the end of the test period. 9 out of 20 fragments reacted positively to the enzymatic test, in the microbial analysis. None of the fragments in exposed to the free oral environment reacted to this test. **Conclusions:** a) The proposed model allows the formation of biofilms in different oxigen concentrations; b) Biofilm fomation was faster where less oxigen was available; c) BANA-positive bacteria were found only in sites with small oxigen concentration.

UNITERMS: biofilm; in situ; enamel; oxigen.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a placa dental evoluiu significativamente desde a sua primeira observação, por van Leewenhoek, em 1684, quando descrita apenas como animáculos raspados da língua e da superfície dos dentes. Modernamente, a placa dental é reconhecida como um biofilme verdadeiro, ou seja, uma comunidade microbiana associada a qualquer material duro não-descamativo²⁵. Em se tratando da cavidade bucal, o biofilme é composto por bactérias em polímeros extracelulares de origem bacteriana e produtos do exsudato gengival e/ou saliva¹⁴. O nível de organização desse biofilme, inclusive com um sistema incipiente de circulação de nutrientes, permite que ele seja comparado a uma “sociedade bacteriana”³. Para ocorrer a formação desse biofilme, é necessário que o dente esteja recoberto por polímeros de origem salivar, que é formado sobre o dente logo após o seu contato com a saliva.

Os colonizadores iniciais dessa superfície precisam resistir a altas concentrações de oxigênio e, ao mesmo, tempo, aos fatores naturais de remoção, como a mastigação, a deglutição e o próprio fluxo salivar¹⁷. Esses microrganismos pioneiros permitem que outros que não possuem adesão direta ao dente possam colonizar a superfície, através de interações específicas²¹, que permitem que bactérias com características opostas, como aeróbicas e anaeróbicas, possam sobreviver juntas, com um micro-ambiente anaeróbico criado pela bactéria que utiliza oxigênio¹².

O início dessa colonização microbiana é feito primariamente por cocos gram-positivos. Bastonetes gram-positivos, antes em pequeno número, aumentam e eventualmente superam a quantidade de cocos. Receptores presentes na membrana desses cocos e bastonetes permitem a adesão subsequente de microrganismos gram-negativos, que possuem pouca ou nenhuma capacidade de aderir diretamente ao dente. Com a multiplicação dessas bactérias e conseqüente espessamento do biofilme, ocorre a formação de um gradiente de

oxigênio nas camadas mais internas do biofilme, que propicia a multiplicação de microrganismos anaeróbicos estritos⁸.

O local onde essa adsorção ocorre classifica o biofilme em supra ou subgengival, ao mesmo tempo em que determina a disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Biofilmes supragengivais se formam acima da margem gengival, e são constituídos principalmente por bactérias Gram-positivas, aeróbicas e sacarolíticas. Em contraste, o biofilme subgengival se deposita abaixo da margem gengival, e é formado por bactérias gram-negativas, anaeróbicas e proteolíticas. O biofilme supragengival está associado à gengivite e o subgengival à periodontite⁵.

As diferenças na composição microbiológica dos biofilmes supra e subgengival atualmente estão bem estabelecidas. Utilizando-se a divisão em complexos microbiológicos proposta por Socransky et al.²² (1998), Ximenez-Fyvie et al.²⁶ (2000) demonstraram diferenças entre os biofilmes supra e subgengival, tanto em estado de saúde quanto em doença. Observam-se maiores proporções dos complexos “vermelho” e “laranja” nos biofilmes subgengivais e supragengivais em estado de doença do que em saúde periodontal. Também se encontram maiores quantidades desses complexos em biofilmes subgengivais do que em biofilmes supragengivais tanto em estado de doença quanto em estado de saúde.

Segundo a definição de Zero²⁷ (1995), os modelos *in situ* têm por objetivo controlar a variação no modelo com o mínimo impacto possível na relevância clínica. Diversos tipos de modelos *in situ* foram elaborados a partir do modelo pioneiro de Koulourides et al.⁶ (1964), para o estudo do biofilme supragengival. Contudo, o conhecimento sobre o desenvolvimento do biofilme subgengival sofre restrições metodológicas por falta de um modelo de estudo adequado.

Tendo em vista as diferenças que ocorrem na formação do biofilme de acordo com o substrato disponível, o presente estudo tem por objetivo comparar, sob aspectos clínico e microbiológico, a

formação de biofilme dental em fragmentos de esmalte bovino posicionados em dispositivos intra-orais, quando submetidos a diferentes tensões de oxigênio.

METODOLOGIA

Descrição dos sujeitos

Dez acadêmicos de Odontologia participaram deste estudo. Para ser incluído no estudo, os voluntários necessitavam apresentar bom estado de saúde geral, não estar utilizando nenhum antibiótico/antiinflamatório há pelo menos 3 meses, não ser respirador bucal, não apresentar periodontite, não fumar. Os voluntários da pesquisa assinaram o consentimento livre e esclarecido. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Confecção dos dispositivos

Os dispositivos intrabucais foram confeccionados sobre modelos de gesso da arcada superior. Para a confecção dos corpos de prova foram obtidos 80 dentes incisivos bovinos. Após remoção de restos orgânicos, utilizou-se lupa para analisar as faces vestibulares. Dentes com trincas ou sulcos foram descartados. Os fragmentos de esmalte foram cortados nas medidas de 5 mm × 5 mm × 1,5 mm. Dois fragmentos foram colocados na área palatina (P) do dispositivo acrílico para permitir condições de menor acesso ao oxigênio, e dois fragmentos foram colocados em contato com o meio ambiente bucal livre (L). A Figura 1 demonstra o modelo de dispositivo.



Figura 1 – Modelo intrabucal utilizado. Porto Alegre, 2005.

Procedimentos de uso dos dispositivos

Os dispositivos foram utilizados durante 192 horas (8 dias). Os voluntários foram instruídos a utilizar, desde dois dias antes do início da pesquisa, o dentifrício fornecido pelos pesquisadores, que não continha flúor ou outro composto ativo. Aos voluntários foi pedido que não removesses os dispositivos, exceto durante a escovação, quando deveriam ser acondicionados em soro fisiológico, e que lá permanecessem durante o menor período possível.

Coleta e análise de dados

Os dispositivos foram analisados clinicamente em quatro períodos: 24, 48, 96 e 168 horas. Para a análise, os dispositivos foram removidos da cavidade bucal, os fragmentos lavados com soro fisiológico e corados com o corante Replak (Dentsply) e analisados em lupa estereoscópica num aumento de 40×. Em seguida, lavados novamente com soro fisiológico e devolvidos ao ambiente oral.

Foi desenvolvido, em estudo piloto, um índice para quantificar o biofilme presente, tendo em vista a ausência de um índice na literatura específico para os fins desse estudo. Esse índice foi baseado no índice de placa de Quigley et al.¹⁵ (1962) e está exposto no Quadro 1.

Após um período de treinamento, repetiram-se duas vezes não-consecutivas o exame, com um intervalo de 48 horas por examinador cego. A reprodutibilidade revelou um *Kappa* de 0,81, considerado excelente segundo Landis et al.⁷ (1997).

QUADRO 1 – Critérios do índice de placa para os fragmentos de esmalte. Porto Alegre, 2005.

Índice	Critério
0	Ausência de colonização
1	Pontos esparsos de colonização, no máximo se transformando em linha
2	Faixa de colonização avançando na periferia do fragmento de esmalte
3	Área de colonização avançando de área periférica para o centro
4	Recobrimento quase total do fragmento de esmalte
5	Recobrimento total do fragmento de esmalte

A análise microbiológica foi realizada com o teste enzimático BANA Perioscan™ (Oral-B). Ao término do período de uso do dispositivo, foi realizada a coleta de material formado sobre os blocos de esmalte com auxílio de curetas estéreis; a amostra de biofilme era então posicionada no car-

tão reagente previamente umedecido, e esse posteriormente dobrado e colocado na incubadora durante o período de 15 minutos a 55°C. Cores azuladas formando cordões ou manchas indicavam resultado BANA-positivo; do contrário, a ausência dessas características indicava resultado BANA-negativo. O examinador desconhecia a localização dos fragmentos e apresentou um coeficiente kappa de 0,91 após dupla análise com intervalo de 7 dias.

A Figura 2 abaixo apresentadas ilustram o índice, desenvolvido em projeto piloto.

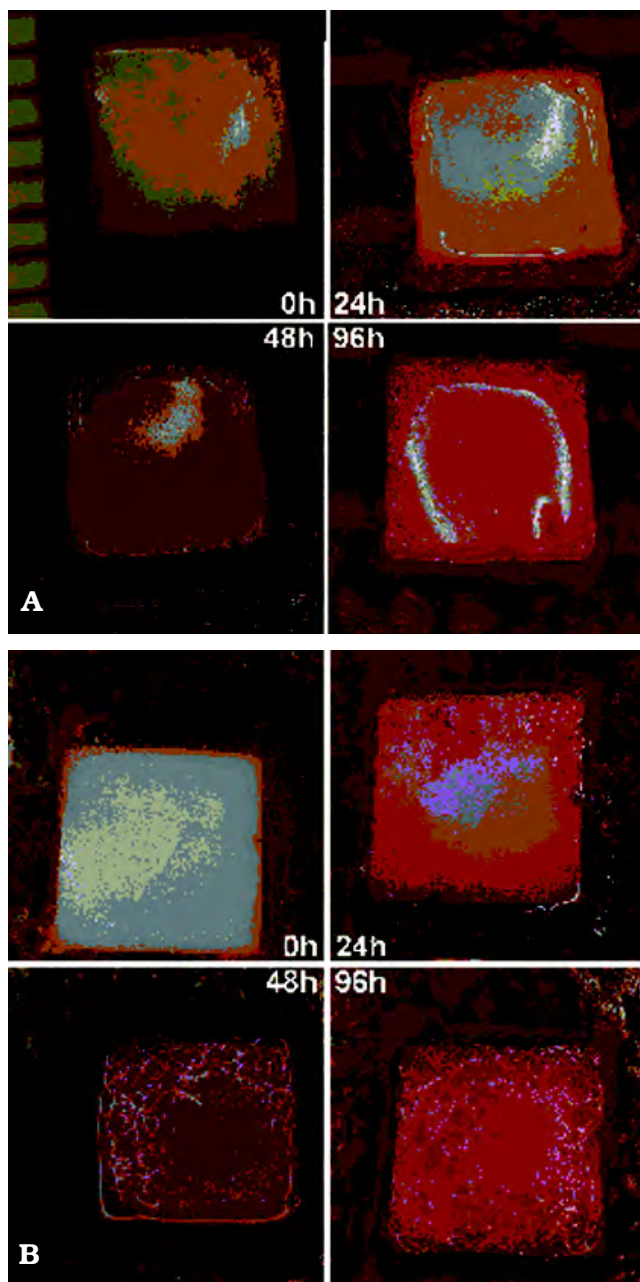


Figura 2 – Em A, desenvolvimento do biofilme L em estudo piloto. Em B, desenvolvimento do biofilme P em estudo piloto. Porto Alegre, 2003.

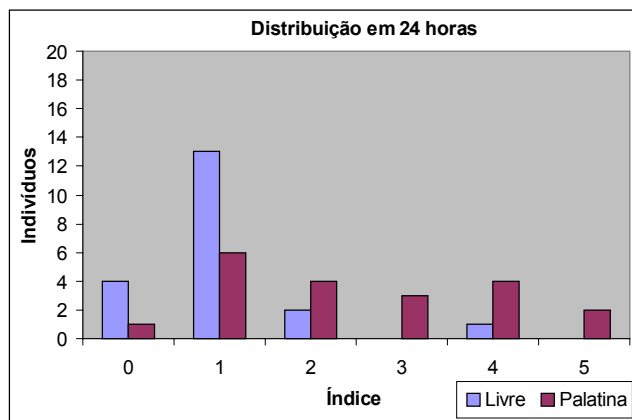
Análise estatística

Distribuição de frequência de escores do índice clínico foi obtida e analisada no decorrer do tempo pela prova de Wilcoxon. Para a análise microbiológica, frequência absoluta e relativa foi obtida entre as áreas P e L. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

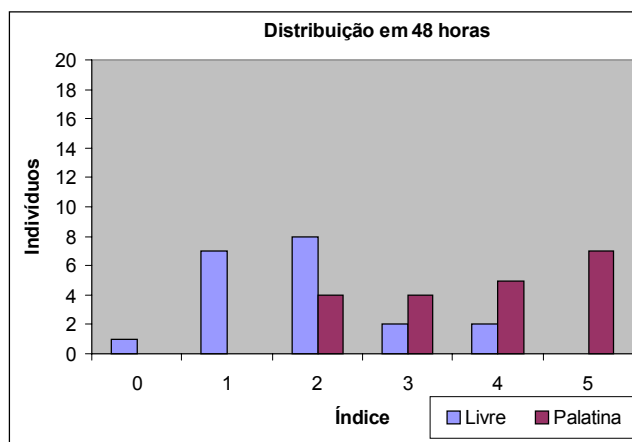
Análise clínica

Os resultados da análise clínica estão demonstrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6, segundo o período experimental. Observou-se uma clara diferença na formação de biofilme entre (P) e (L). Os dados foram comparados utilizando-se a prova de Wilcoxon, com valores de $p < 0.005$, 0.001 , 0.000 e 0.000 em 24, 48, 96 e 168 horas respectivamente, o que mostra que os resultados foram estatisticamente significantes.



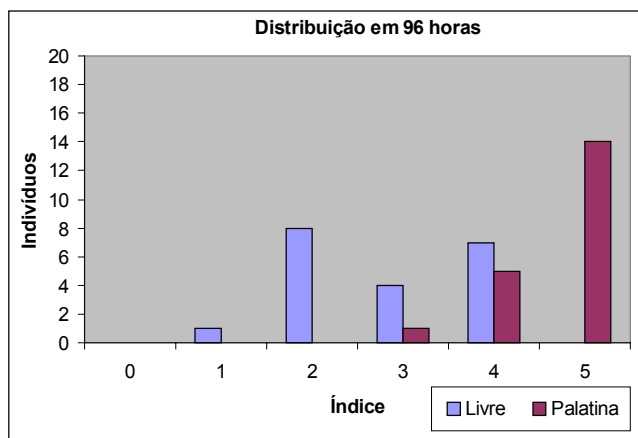
Prova de Wilcoxon – $p = 0.005$.

Figura 3 – Formação do biofilme em 24 h (1ª Análise). Porto Alegre, 2005.



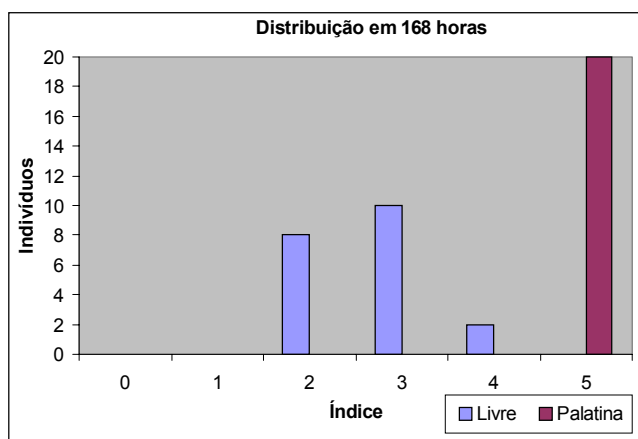
Prova de Wilcoxon – $p = 0.001$.

Figura 4 – Formação do biofilme em 48 h (2ª Análise). Porto Alegre, 2005.



Prova de Wilcoxon - p = 0,000.

Figura 5 – Formação do biofilme em 96 h (3ª Análise). Porto Alegre, 2005.



Prova de Wilcoxon - p = 0,000.

Figura 6 – Formação do biofilme em 168 h (4ª Análise). Porto Alegre, 2005.

Pode-se observar que o desenvolvimento do biofilme dental ocorreu de forma mais rápida em (P) em relação a (L). Pode-se também observar um maior desenvolvimento final em (P), com 100% dos indivíduos apresentando escore 5. Em (L), a partir de 96 horas o biofilme atinge um patamar máximo, não ocorrendo modificações significativas no aspecto clínico.

Análise microbiológica

Os resultados obtidos com a análise microbiológica dos biofilmes formados, através do teste enzimático BANA Perioscan™ estão dispostos no Quadro 2. Observa-se resposta positiva ao teste BANA somente entre os biofilmes formados na porção palatina (P). Dentre os 20 biofilmes analisados em (P), houve ocorrência positiva em 9, o que representa 45% da amostra em áreas em contato com o palato. Entretanto, não houve ocorrência positiva em nenhuma das amostras encontra-

das na porção em contato com o meio ambiente livre (L).

QUADRO 2 – Resultados do teste BANA Perioscan™, positivo (+) ou negativo (-), dos 10 participantes em cada um dos biofilmes: palatino esquerdo (PE), palatino direito (PD), livre direito (LD) e livre esquerdo (LE). Porto Alegre, 2005.

Indivíduos	Teste BANA			
	PE	PD	LE	LD
1	+	+	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	+	-	-
5	-	-	-	-
6	-	+	-	-
7	+	+	-	-
8	-	-	-	-
9	+	+	-	-
10	-	+	-	-
Subtotal (+)	3	6	0	0
Total (+)	9		0	
Percentual (+)	45%		0%	

DISCUSSÃO

A necessidade de melhor compreensão da etiopatogenia da doença periodontal tem guiado os interesses das pesquisas em periodontia, com o objetivo de aplicar a terapêutica mais adequada. Grandes limitações da periodontia são devido a metodologias que se contrapõem à ética e devido a todo o ambiente complexo que compõe o biofilme subgengival. O fato de existirem dispositivos intra-orais para acúmulo de placa supragengival²³ tem possibilitado melhor compreensão do processo cariogênico, entretanto não se tem conhecimento de dispositivos que possibilitariam o estudo da etiopatogenia da doença periodontal de forma semelhante como tem ocorrido em cariologia.

É com esse intuito que a partir de um projeto piloto construiu-se um dispositivo que pudesse adquirir características semelhantes às encontradas no ambiente subgengival, como menor disponibilidade de nutrientes e baixa tensão de oxigênio. Resultados positivos foram obtidos durante a realização do projeto piloto, com diferenças quantitativas, qualitativas e microbiológicas em os biofilmes (L) e (P). Houve maior acúmulo significativo de biofilme em (P), denotando um padrão de crescimento diferenciado. O presente estudo

representa uma remodelagem do projeto piloto, como maior amostra, maior tempo de uso dos dispositivos e técnica microbiológica mais adequada, objetivando maiores achados sobre os biofilmes formados em (P) e (L).

Os achados clínicos deste estudo mostram um maior desenvolvimento bacteriano em P em relação a L, com um período mais curto de evolução e resultado quantitativo significativamente maior. Esses achados estão de acordo com os achados clínicos de Quirynen et al.¹⁸ (1989), que analisaram a formação de biofilme *in vivo* durante 4 dias, com um crescimento lento durante as primeiras 24 horas e crescimento exponencial nos dias subsequentes. O biofilme formado em P demonstrou evolução similar à encontrada nesse estudo. O biofilme iniciou seu desenvolvimento como pontos esparsos de colonização, evoluindo para linhas contínuas ao redor do bloco de esmalte e eventualmente ocupando a porção central do fragmento. Locais com pequenas trincas foram preenchidos de forma mais rápida, também de acordo com o estudo anteriormente citado. Contudo, como a análise foi de apenas 4 dias esses dados não são completamente transponíveis para o presente estudo. O biofilme formado em L não atingiu, durante o período de análise, o índice máximo (5). Acredita-se que a presença de alimentos como fator de remoção mecânica pode ter influenciado na obtenção desses resultados.

Weidlich et al.²⁴ (2001) analisaram a formação de biofilme em 6 voluntários e encontraram, em 24 horas de desenvolvimento de biofilme, uma fina camada de aspecto globular seguindo a margem gengival, similar ao que ocorreu na periferia dos fragmentos, na porção em contato ou muito próxima à margem de acrílico. Em 48 horas, o biofilme já se apresentava como uma camada contínua acompanhando a margem gengival. Em 96 horas, o biofilme se apresentava próximo à margem incisal e formava uma camada homogênea, com recobrimento quase total da face dentária. De 0 a 72 horas, os pesquisadores puderam observar uma zona livre de placa na periferia, sugerida como um local de interações entre agressão/resposta do hospedeiro. Essa zona desapareceria em 96 horas, possivelmente devido a uma inflamação e conseqüente edema da margem gengival, recobrendo essa área. O recobrimento dessa zona livre de placa pelo aumento de volume da margem gengival e conseqüente recobrimento de parte do biofilme propicia o desenvolvimento do biofilme subgengival. Em função de ser esse um estudo *in situ*, não há resposta local do hospedeiro, permitindo

um desenvolvimento pleno do biofilme. Assim, essa limitação deve ser mantida em perspectiva. O período de análise do estudo de Weidlich et al.²⁴ (2001) foi menor em relação ao presente. No entanto, os achados clínicos assemelham-se ao encontrado no biofilme em P.

A ausência de resposta inflamatória por parte do indivíduo, principalmente no biofilme em L, pode resultar em diferenças na velocidade de desenvolvimento e composição microbiana do biofilme. Estudos como os de Ramberg et al.^{19,20} (1994, 1995) e Quirynen et al.¹⁶ (1991) mostram uma progressão na velocidade de formação do biofilme na presença de inflamação gengival.

A escolha por esmalte bovino como material para os corpos de prova foi devido a diversos fatores: o esmalte bovino é mais fácil de obter em relação ao esmalte humano, possui a face vestibular mais plana, propiciando uma maior padronização dos corpos e possui uma composição mais homogênea¹³. Com relação aos achados microbiológicos, o fato de apenas os biofilmes (P) apresentarem reação de coloração ao teste BANA, representa uma resposta positiva aos objetivos do dispositivo, muito embora apenas 45% desses tenham apresentado esta resposta, isso pode ser devido principalmente ao tempo de utilização do dispositivo, pois os demais biofilmes (P) poderiam eventualmente apresentar a mesma resposta. Os achados do presente estudo estão de acordo com a literatura onde muitos estudos apresentam resultados BANA-positivos para biofilmes subgengivais em sítios com características clínicas de doença^{4,9,10}. Isso se deve à característica de três bactérias específicas (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus*) em apresentar uma tripsina capaz de hidrolisar uma proteína sintética, o N- α -benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA)¹⁰. Não foi encontrada nenhuma reação de coloração nos biofilmes (L), assim como nos biofilmes supragengivais², provavelmente devido às condições aeróbicas propiciadas pelo presente estudo. Segundo Loesche et al.¹⁰ (1990) seis espécies *Bacteroides* e *Capnocytophaga* apresentaram resultados fraco-positivos ao teste BANA, porém somente quando estavam em concentrações maiores de 10⁷ UFC. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rothia dentocariosa* podem hidrolisar o BANA, contudo essas espécies são raramente isoladas de biofilmes subgengivais.

O protocolo de incubação do BANA Perioscan™ é de 15 minutos a 55°C. Este protocolo foi desenvolvido em laboratório para detectar por volta de

10^6 UFC, *in vitro*, as bactérias *T. denticola* e/ou *P. Gingivalis*¹⁰. Entretanto, nas amostras utilizadas *in vivo*, seguindo esse protocolo, detecta-se em torno de 10^4 UFC, o que sugere que *in vivo* esses organismos produzam mais tripsina, representando um maior número de falso-positivos comparado a parâmetros clínicos¹. O teste BANA, sob este protocolo, apresenta especificidade de 43%, sensibilidade de 90% e acurácia de 71%¹. Entretanto, o teste BANA apresenta habilidade semelhante a alguns tipos de análise por DNA em detectar *T. denticola*, *B. forsythus* e *P. gingivalis* em sítios com doença, com sensibilidade de 90% e precisão de 83%¹¹. Em uma comparação de vários testes como DNA bacteriano, imunológicos e BANA para detecção das bactérias do grupo vermelho, todos esses testes indicariam presença em aproximadamente 90% das placas subgengivais de sítios com infecção¹¹.

O fato do teste BANA Perioscan™ ser prático, apresentando resultados em 15 minutos, e o difícil acesso e alto custo da análise de DNA bacteriano conduziu a nossa escolha. Tem-se conhecimento de que o método utilizado tem baixa capacidade de prever os sítios que não apresentam doença (verdadeiro-negativo), superestimando doença. Porém, analisando a alta sensibilidade (verdadeiro-positivo) e a precisão do teste, pode-se sugerir que o dispositivo apresenta a possibilidade de formar placa com periodontopatógenos do grupo vermelho nos sítios (P) em quantidade equivalente à encontrada em uma placa subgengival em local com doença. As evidências clínicas do desenvolvimento do biofilme comparando-se os sítios (L) e (P) sugerem que a placa formada (P) difere daquela formada em (L).

Ainda que os resultados do presente estudo sejam iniciais e relatem o desenvolvimento de uma metodologia para o estudo do biofilme dental, os achados levam a crer que o mesmo é adequado e tem aplicabilidade, em função de permitir o desenvolvimento do biofilme, assim como sua composição diferenciados, em condições diversas de anaerobiose.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo, levando-se em considerações suas características metodológicas e suas limitações, permite concluir que:

- a) os dispositivos criados permitem tensões diferenciadas de oxigênio, sendo interessantes para o estudo dos biofilmes dentários;

- b) a formação do biofilme dental na presença de menos oxigênio é mais rápida;
- c) bactérias BANA-positivas foram encontradas somente nas áreas (P), onde menores teores de oxigênio estão disponíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amalfitano J, De Filippo AB, Bretz WA, Loesche WJ. The effects of incubation length and temperature on the specificity and sensitivity of the BANA (N-benzoyl-DL-arginine-naphthylamide) test. *J Periodontol.* 1993;64(9):848-52.
2. Bretz WA, Loesche WJ. Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples. *J Dent Res* 1987;66(11):1668-72.
3. Costerton JW, Stewart OS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
4. Grisi MF, Novaes AB, Ito IY, Salvador SL. Relationship between clinical probing depth and reactivity to the BANA test of samples of subgingival microbiota from patients with periodontitis. *Braz Dent J* 1998;9(2):77-84.
5. Haake SK. Microbiologia Periodontal. In: Carranza AF, Newman MG. *Periodontia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 87-107.
6. Koulourides T, Volker JF. Changes in enamel microhardness in the human mouth. *AL J Med Sci.* 1964;1:435-7.
7. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* Alexandria. 1997;33(1):156-74.
8. Lang NP, Mombelli A, Attstrom R. Placa e cálculo dentais. In: Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 66-91.
9. Loesche WJ, Syed SA, Stoll J. Trypsin-like activity in subgingival plaque. A diagnostic marker for spirochetes and periodontal disease? *J Periodontol.* 1987;58(4):266-73.
10. Loesche WJ et al. Multi-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J Periodontol.* 1990(a);61(3):189-96.
11. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(2):427-33.
12. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38:204-11.
13. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic activity *in situ*. *J Dent Res.* 1992; 71(spec iss):913-9.
14. Park AW, Yaacob HB. A synopsis of the origins and function of dental plaque and pellicle. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1994;36(3):157-74.
15. Quigley GA, Hein JW. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc.* 1962;25:26-9.

16. Quirynen M, Dekeyser C, van Steenberghe D. The influence of gingival inflammation, tooth type, and timing on the rate of plaque formation. *J Periodontol.* 1991;62(3):219-22.
17. Quirynen M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D. The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 2001;28 499-507.
18. Quirynen M, van Steenberghe D. Is early plaque growth constant with time? *J Clin Periodontol.* 1989;16:278-83.
19. Ramberg P, Lindhe J, Dahlén G, Volpe AR. The influence of gingival inflammation on the novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 1994;21:51-6.
20. Ramberg P, Axelsson P, Lindhe J. Plaque formation at healthy and inflamed gingival sites in young individuals. *J Clin Periodontol.* 1995;22:85-8.
21. Sbordone L, Bortolaia C. Oral Microbial Biofilms and Plaque-Related Diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Invest.* 2003;7:181-8.
22. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
23. Wang CW, Corpron RE, Lamb WJ, Strachan DS, Kowalski CJ. *In situ* remineralization of enamel lesions using continuous versus intermittent fluoride application. *Caries Res.* 1993;27(6):455-60.
24. Weidlich P, Souza MAL, Oppermann RV. Evaluation of the dentogingival area during early plaque formation. *J Periodontol.* 2001;72(7):901-10.
25. Wilderer PA, Characklis WG. Structure and function of biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA. *Structure and function of biofilms.* Chichester, UK: John Wiley; 1989. p. 5-17.
26. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(10):722-32.
27. Zero DT. *In situ* caries models. *Adv Dent Res.* 1995;9(3):214-30.

Recebido para publicação em: 27/12/2005; aceito em: 03/05/2006.

Endereço para correspondência:

RUI VICENTE OPPERMAN
Faculdade de Odontologia UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2492
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil