



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

AMANDA DE OLIVEIRA PINTO RIBEIRO

**EFEITO DE APLICAÇÕES DE VIDRO E PRATA NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS, DE SUPERFÍCIE,
FORMAÇÃO DE BIOFILME E VIABILIDADE CELULAR
SOBRE ZIRCÔNIA MONOLÍTICA**

AMANDA DE OLIVEIRA PINTO RIBEIRO

**EFEITO DE APLICAÇÕES DE VIDRO E PRATA NAS
PROPRIEDADES MECÂNICAS, DE SUPERFÍCIE,
FORMAÇÃO DE BIOFILME E VIABILIDADE CELULAR
SOBRE ZIRCÔNIA MONOLÍTICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Desempenho de materiais reabilitadores protéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Marques de Melo Marinho

Coorientador: Dr. Tiago Moreira Bastos Campos

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Ribeiro, Amanda de Oliveira Pinto

Efeito de aplicações de vidro e prata nas propriedades mecânicas, de superfície, formação de biofilme e viabilidade celular sobre zircônia monolítica / Amanda de Oliveira Pinto Ribeiro. - São José dos Campos : [s.n.], 2021. 83 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Renata Marques de Melo Marinho

Coorientador: Tiago Moreira Bastos Campos

1. Atividade antimicrobiana. 2. Biofilme. 3. Prata. 4. Zircônia. 5. Citotoxicidade. I. Marinho, Renata Marques de Melo, orient. II. Campos, Tiago Moreira Bastos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Marques de Melo Marinho (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Prof. Dr. Elson Braga de Mello

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Faculdade de Odontologia

Rio de Janeiro

São José dos Campos, 15 de junho de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus** por ser o pilar de todas as obras da minha vida.

Dedico à **Josiane de Oliveira Pinto**, minha mãe, por ser minha maior inspiração de mulher forte, decidida e amorosa.

Dedico a **Sergio Augusto Ribeiro**, meu pai, por sempre acreditar em mim e apoiar as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Ciências e Tecnologia – Campus de São José dos Campos, bem como ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, através do Processo nº 88882.434246/2019-01 durante todo o período de 01/02/2019 a 31/05/2021 .

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Renata Marques de Melo Marinho, por todo comprometimento e profissionalismo com a minha orientação, pelo entusiasmo com a pesquisa que nos inspira diariamente e por cada ensinamento. E ao meu coorientador Dr. Tiago Moreira Bastos por sua acessibilidade em auxiliar no trabalho, por suas ideias inovadoras e conselhos compartilhados.

A todos os professores da UNESP-SJC que cruzaram meu caminho durante esse enriquecedor período. Em especial Prof. Alexandre Borges por todo aprendizado na clínica de extensão em prótese ocular, Prof. Lafayette Nogueira pelo auxílio nas clínicas de prótese sobre implante, Prof. Marco Antonio Bottino por ser o maior exemplo de liderança que conheci na vida acadêmica, Prof. Eduardo Uemura e Prof. João Maurício pela oportunidade de aprender no estágio docente na prótese removível, Prof^ª. Juliana Campos e Prof^ª. Luciane Oliveira por disponibilizarem seus respectivos laboratórios para a condução dessa dissertação. Agradeço também ao Marcio Marques, Thaís Paradella, Marco Alfredo, Fernando Fontes e todos os funcionários do ICT-UNESP pelo suporte.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de pós graduação pela troca de experiências, convívio e momentos de descontração, em especial à Laura Nadal, Laura Calvache, Larissa Mendes, Larissa Araújo, Ana Carolina e Joyce Rodrigues, amigas que levarei além da vida acadêmica. Agradeço também ao Eduardo Chelin, Murilo Rodrigues, Isabela Tanaka, Michelle de Sá, Elisa

Kukulka, Elisa Aboucauch, Natália Rossi, Mateus Favero, Jhenifer Rodrigues, Guilherme Andrade, Guilherme Scalzer, Jefferson Matos, Leonardo Gomes, Larissa Alves, Manassés Grangeiro, Clarissa Sabino, Jonas Rodrigues, Nathalia Ramos, Ana Beatriz Gomes, Rossana Pignataro, Pedro Diamantino, Pedro Prado, Patrícia Claudio e Amir Dimashkieh bem como todos os alunos do Programa de Pós graduação. Agradeço ao Felipe Ribeiro por todo o apoio nos experimentos realizados na microbiologia. Obrigada por todo o ensinamento, conselhos e agradável convivência.

Agradeço também a todos os amigos e professores da FO-UFRJ, minha primeira casa, que me inspiraram a seguir a carreira acadêmica. Minha eterna gratidão!

Gostaria de agradecer à Josiane de Oliveira Pinto, minha mãe, que nunca mediu esforços para que eu concluísse os meus sonhos, que abdicou das próprias vontades em prol da minha felicidade durante toda sua vida e que sempre foi um pilar forte ao qual eu recorri e recorro nos momentos difíceis. Você foi fundamental no alcance desse título; ele também é seu.

Ao meu pai, Sergio Augusto Ribeiro, que vibrou por cada pequena conquista durante esse período, desde o primeiro trabalho apresentado até a conclusão da dissertação. Obrigada por não questionar as minhas escolhas, por valorizar meus estudos e estar sempre ao meu lado.

Gostaria de agradecer também aos meus irmãos, Rodolfo, que sempre me inspirou a estudar, Fernanda, por saber exatamente o que estou sentindo mesmo sendo tão mais nova que eu, e ao pequeno Joaquim que me alegrou durante essa jornada com seu jeito único e amoroso. Também gostaria de agradecer ao meu padrasto, João Antônio de Souza por sempre estar presente, por me ouvir e por não ter medido esforços para que eu me sentisse perto de vocês, mesmo de longe. À minha madrasta, Cenira Ribeiro por ter me acolhido em sua casa e por todas as conversas que amenizaram a saudade. Agradeço à minha avó, Maria Tereza de

Oliveira, que me criou e ajudou a construir meus valores. Agradeço ao meu noivo, Pedro Henrique Duarte, que vibra e apoia todas as minhas escolhas sabendo que toda conquista será em prol da nossa futura família.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Zircônia	17
2.2 Adesão microbiana na superfície dos materiais restauradores	20
3 PROPOSIÇÃO	23
3.1 Objetivos gerais	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Confeção dos corpos-de-prova	24
4.2 Fabricação de vidro	32
4.3 Caracterização da superfície dos materiais	33
4.3.1 Análise da rugosidade e perfilometria	33
4.3.2 Análise da energia livre de superfície (ELS)	34
4.4 Atividade antimicrobiana	36
4.4.1 Esterilização e formação dos biofilmes microbianos	36
4.4.2 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)	39
4.5 Teste de biocompatibilidade	40
4.5.1 Esterilização dos espécimes e cultivo celular	40
4.5.2 Cultivo celular	40
4.6 Ensaio de resistência à flexão biaxial	42
4.7 Microscopia eletrônica de varredura	44
4.8 Forma de análise dos resultados	44

5 RESULTADO.....	46
5.1 Análise da rugosidade	46
5.2 Análise da energia livre de superfície (ELS).....	48
5.3 Atividade antimicrobiana	50
5.4 Teste de citotoxicidade	54
5.5 Ensaio de resistência à flexão biaxial.....	56
5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
6 DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIA.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag+	Prata
Ag4	Prata 4%
Ag5	Prata 5%
C	Cúbica
CFU	Colony-forming units count
CTE	Coefficiente de expansão térmica
DBT	Degradação em baixa temperatura
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidade óptica
Dp	Desvio padrão
E	Módulo de elasticidade
ELS	Energia Livre de Superfície
G	Glaze
INF	Vidro de Infiltração
INF-Ag4	Vidro de Infiltração com Prata 4%
INF-Ag5	Vidro de Infiltração com Prata 5%
m	Monoclínica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MGF	Material gradado funcional
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il-] -2,5-difenil tetrazólio
P	Polida
Ra	Rugosidade média absoluta das alturas
RZ	Profundidade da rugosidade média
SEM	Scanning electron microscopy
SFB	Soro fetal bovino
t	Tetragonal

T-M	Tetragonal para monoclínica
UFC	Unidade formadoras de colônias
Y-TZP	Zircônia
YZ	Zircônia

Ribeiro AOP. Efeito de aplicações de vidro e prata nas propriedades mecânicas, de superfície, formação de biofilme e viabilidade celular sobre zircônia monolítica [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito de aplicações de vidro na zircônia, com e sem prata, na rugosidade, formação de biofilme, viabilidade celular e resistência flexural com objetivo de produzir um material cerâmico com prata efetivo contra microrganismos e eficiente mecanicamente. Foram confeccionadas amostras de zircônia T (VITA Zahnfabrik, Alemanha) divididas em: YZ polida (P); YZ com glaze (G); YZ com vidro de infiltração (INF); YZ com vidro de prata 5% (Ag5); YZ com vidro de prata 4% (Ag4); YZ com vidro de infiltração + vidro de prata 5% (INF-Ag5); YZ com vidro de infiltração + vidro de prata 4% (INF-Ag4). Os espécimes foram submetidos a testes de rugosidade média (Ra) (n=15); energia livre de superfície (n=5); contagem de unidades formadoras de colônia (log UFC/mL) (n=8); microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=2) e citotoxicidade (ensaio de MTT) (n=8). Além disso, foi avaliada a resistência à flexão de todos os grupos (n=30). O grupo Ag5 obteve maior rugosidade e menor aderência de biofilme comparado aos demais grupos. Através da ELS, observou-se que todos os grupos apresentaram comportamento parcialmente hidrofílico. Na UFC, os grupos contendo prata inibiram o crescimento de *Candida albicans*, o grupo Ag5 inibiu *Streptococcus mutans* e nenhum grupo foi efetivo contra o *Streptococcus sanguinis*. Na avaliação qualitativa feita através do MEV, houve menor crescimento de colônias no grupo Ag5 quando comparado aos grupos controles (Polido; Glaze; Vidro de Infiltração), tanto para *C. albicans* quanto para *S. mutans*. No MTT, os grupos Ag4 e INF-Ag4 obtiveram 49% e 35,4% de viabilidade celular, sendo semelhante significativamente ao glaze comercial que apresentou 47,13%; Ag5 apresentou 16,2% e INF-Ag5 21,39% (p<0,05). A aplicação do vidro de prata conduziu à menor resistência flexural quando comparada aos grupos sem prata, o que foi compensado pela infiltração de vidro na amostra pré-sinterizada que elevou a resistência do material pela formação de uma interfase zircônia-vidro. Concluiu-se que o grupo Ag5 obteve maior efeito antimicrobiano contra *C. albicans* e *S. mutans*, os grupos Ag4 e INF-Ag4 foram os menos citotóxicos e o grupo INF foi o mais resistente à fratura.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Biofilme. Prata. Zircônia. Citotoxicidade. Resistência flexural.

Ribeiro AOP. *Effect of glass and silver applications on mechanical, surface properties, biofilm formation and cell viability on monolithic zirconia [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.*

ABSTRACT

*The present study evaluated the effect of glass applications on zirconia, with and without silver, on roughness, biofilm formation, cell viability and flexural strength aiming to produce a ceramic material with silver effective against microorganisms and mechanically efficient. Samples of T zirconia (VITA Zahnfabrik, Germany) were made, divided into: polished YZ (P); YZ with glaze (G); YZ with infiltration glass (INF); YZ with 5% silver glass (Ag5); YZ with 4% silver glass (Ag4); YZ with infiltration glass + 5% silver glass (INF-Ag5); YZ with infiltration glass + 4% silver glass (INF-Ag4). The specimens were submitted to medium roughness tests (Ra) (n = 15); free surface energy (n = 5); colony-forming units count (log CFU / mL) (n = 8); scanning electron microscopy (SEM) (n = 2) and cytotoxicity (MTT assay) (n = 8). In addition, the flexural strength of all groups was assessed (n = 30). The Ag5 group had greater roughness and less biofilm adherence compared to other groups. Through ELS, he observed that all groups showed partially hydrophilic behavior. In the CFU, groups containing silver inhibited the growth of *Candida albicans*, the Ag5 group inhibited *Streptococcus mutans* and no group was effective against *Streptococcus sanguinis*. In the qualitative evaluation made through SEM, there was less growth of colonies in the Ag5 group when compared to the control groups (Polished; Glaze; Infiltration glass) for both *C. albicans* and *S. mutans*. In the MTT, the Ag4 and INF-Ag4 groups obtained 49% and 35.4% cell viability, being significantly similar to the commercial Glaze, which presented 47.13%. Ag5 presented 16.2% and INF-Ag5 21.39% (p < 0.05). The application of silver glass led to lower flexural strength when compared to groups without silver, which was compensated by the infiltration of glass in the pre-sintered sample which increased the material's resistance by the formation of a zirconia-glass interphase. It was concluded that the Ag5 group had the greatest antimicrobial effect against *C. albicans* and *S. mutans*, the Ag4 and INF-Ag4 groups were the least cytotoxic and the INF group was the most resistant to fracture.*

Keywords: Antimicrobial activit. Biofilm. Silver. Zirconia. Citotoxicity. Flexural strength.

1 INTRODUÇÃO

A evolução dos materiais cerâmicos na Odontologia vem permitindo a confecção de próteses dentárias em que o grande desafio é definir materiais que permitam equilibrar requisitos primordiais, tais como estética e resistência mecânica. O uso da cerâmica tem aumentado devido à sua biocompatibilidade (Wang et al., 2007), capacidade estética, estabilidade de cor, resistência ao desgaste e baixa condutibilidade térmica (Stuart et al., 2007). Dentre esses, a zircônia se destaca devido ao seu alto valor de tenacidade à fratura (Kelly, Denry, 2008).

Bem antes da introdução da zircônia translúcida monolítica, a infiltração de vidro nesse material o tornou mais resistente, além de pavimentar um caminho para uma zircônia sem a necessidade de estratificação (Zhang et al., 2012; Zhang, Kim, 2009). O conceito de um material com gradação funcional (MGF) na Odontologia restauradora alavancou a evolução dos materiais cerâmicos. Os MGFs possuem variações das suas fases estruturais dentro do próprio material, gerando diferenças graduais em suas propriedades (Bohidar et al., 2014). Essa transição progressiva entre uma camada de vidro externa e a zircônia subjacente infiltrada com vidro forneceu uma estrutura de vidro-zircônia-vidro, com o *bulk* do material inteiramente de grãos de zircônia (Campos et al., 2016). Essa transição gradativa dos módulos elásticos em direção ao *bulk* resultou em uma cerâmica de alta resistência às forças de flexão que levam a supressão dos danos de contato tanto na superfície oclusal quanto na de cimentação (Zhang, Kim, 2009).

Outra vantagem da camada externa de vidro na zircônia infiltrada é a rede tridimensional de grãos de zircônia revestidos de vidro que, quando exposta, cria uma morfologia de superfície ideal para silanização e subsequente penetração do cimento adesivo (Campos et al., 2021; Ramos et al., 2019; Zhang, Kim, 2009); esse vidro residual encontrado na superfície também promove a vantagem de

impedir a absorção de água e prevenir a degradação em baixa temperatura (DBT) da Y-TZP (Campos et al., 2016; Ramos et al., 2019).

A zircônia é uma opção de tratamento previsível para dentes posteriores, onde altas cargas de mastigação são aplicadas (Triwatana et al., 2012). O sucesso clínico foi observado no estudo feito por Örtorp et al. (2009), em que se observaram taxa de sobrevivência de 92,7% após 3 anos em coroas totais unitárias posteriores. Portanto, do ponto de vista mecânico, as situações clínicas alteráveis poderiam ser facilmente resolvidas com a zircônia após a infiltração do vidro.

Um outro desafio em materiais cerâmicos é a adesão do biofilme levando em consideração que a cárie secundária é uma das principais complicações biológicas encontradas em restaurações indiretas (Vagropoulou et al., 2018). O crescimento de biofilme em materiais restauradores varia dependendo da rugosidade de superfície (RA), energia livre de superfície (ELS), molhabilidade e composição química dos materiais (Teughels et al., 2006). As próteses dentárias monolíticas de zircônia, assim como os pilares dos implantes, estão em contato direto com os tecidos periodontais ou peri-implantar, influenciando os tecidos saudáveis (Ammar et al., 2016). Assim, a busca de aprimoramento das propriedades antimicrobianas das cerâmicas baseia-se no fato de que os materiais odontológicos se encontram, clinicamente, em um ambiente bucal favorável à proliferação microbiana que leva à perda das restaurações (Souza et al., 2016).

O reforço de um material cerâmico com partículas metálicas tem sido recomendado nos últimos anos para melhorar a tenacidade à fratura e prevenir propagação de trinca (Bapat et al., 2018). Além de suas propriedades mecânicas, a prata é conhecida por exibir forte toxicidade para uma ampla gama de microrganismos (Liau et al., 1997) e por ter atividade antimicrobiana (Abdallah et al., 2015) pela liberação de seus íons (Guldiren, Aydın, 2017). Estudos mostraram efeitos antimicrobianos contra alguns microrganismos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida*

albicans e *Streptococcus mutans* (Katakam et al., 2003; Shi et al., 2005). Também apresentaram resultados favoráveis para amostras de vidro tratadas em meio iônico contendo prata para três microrganismos selecionados (*E. Coli*, *S. aureus* e *C. albicans*) (Guldiren, Aydın, 2017).

O uso generalizado da prata na área da medicina estendeu-se à odontologia, na prevenção da adesão bacteriana, proliferação e formação de biofilme em materiais odontológicos (García-Contreras et al., 2011). Para uso em peças cerâmicas com propriedades bactericidas em ambientes residenciais, hospitalares e laboratoriais, os vidros com atividade antimicrobiana chamam atenção por sua dureza, alta durabilidade química e atividade antimicrobiana de longa duração (Fiori et al., 2009). No entanto, um estudo realizado por Mohsen et al. (2015) concluíram que apesar de aumentar a resistência à fratura, a cor da cerâmica dentária é afetada, o que não é compatível com os parâmetros estéticos dentários exigidos atualmente. Além disso, apesar da atividade antimicrobiana da prata, suas implicações podem estar relacionadas a um amplo espectro de efeitos citotóxicos, ou seja, a prata pode ter efeitos adversos nas células humanas, levando à morte celular ou possíveis mutações (Asharani et al., 2009), sendo de extrema importância a avaliação da biocompatibilidade.

Tendo em vista que a composição do vidro é passível de modificação estrutural, foi sintetizado no grupo de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em que este estudo se insere, um novo material em que a prata foi adicionada à sua estrutura com o objetivo de conferir propriedades antimicrobianas a partir da liberação dos íons de Ag^+ , sem afetar significativamente a estética, estrutura e toxicidade do material, o que é desejável em situações clínicas como em coroas ou braquetes cerâmicos além de *abutments* e fixações de implantes em zircônia.

Em face disso, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades de superfície do material, a formação de biofilme e a atividade antimicrobiana da zircônia Y-TZP com diferentes aplicações de vidro com testes de rugosidade de

superfície; análise da energia livre de superfície (ELS); análise da formação de biofilme por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e, também, conferir sua biocompatibilidade através dos testes de citotoxicidade (teste de MTT). Além disso, avaliar a resistência à flexão do material contendo prata como forma de verificar as alterações mecânicas decorrentes da infiltração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Zircônia

A zircônia é um material polimórfico que ocorre em três formas dependentes de temperatura. Pode ser encontrada sob três formas cristalográficas: monoclinica (m), tetragonal (t) e cúbica (c). Na temperatura ambiente à 1170°C se encontra na fase monoclinica; de 1170°C-2370°C, na forma tetragonal, e a cúbica encontra-se de 2370°C até o ponto de fusão (Kelly, Denry, 2008). Portanto, esse policristalino só consegue estabilidade e alta resistência em temperatura ambiente após a adição de uma óxido dopante (Mochales et al., 2011). Esta fase é obtida pelo ítrio, cério, cálcio, magnésio ou titânio (Çehreli et al., 2009). A zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio (Y-TZP) tem sido a mais utilizada principalmente para coroas, próteses dentárias fixas e componentes de implantes (Schriwer et al., 2017). Esta contém 3 mol.% de ítria (Y_2O_3) como um estabilizador, e uma de suas maiores vantagens é a alta resistência à fratura, possuindo resistência à flexão de 900-1000 MPa e tenacidade à fratura 5.5-7.4 MPa \times m^{1/2} (Triwatana et al., 2012).

Entretanto, mesmo com a adição dos estabilizadores, a microestrutura não é totalmente estável e um estímulo mecânico fornece energia suficiente para transformar os cristais da fase tetragonal para fase monoclinica (transformação T-M) (Piconi, Maccauro, 1999). Essa transformação de fase tetragonal para fase monoclinica é responsável pelo notável desempenho da zircônia, característica já explorada em diferentes aplicações médicas e de engenharia (Ramos, 2018). A transformação T-M leva a uma expansão volumétrica de 4% (al-amleh et al., 2010), o que resulta no desenvolvimento de campos locais de compressão que, quando localizada próximo a defeitos de superfície, ou na ponta de uma eventual trinca, irá atuar como um mecanismo para impedir sua propagação (Hannink et

al., 2000), reduzindo a incidência de falhas mecânicas na zircônia (Mochales et al., 2011). Para que essa trinca se propague, ela deve superar as tensões compressivas que foram formadas ao seu redor (Ramos, 2018). Dessa forma, as estruturas de Y-TZP atingem um comportamento “benigno” que é vantajoso para a longevidade e confiabilidade das próteses fixas confeccionadas com esse material (Mochales et al., 2011). Esse mecanismo explica a alta resistência à fratura da zircônia quando comparada com a de outras cerâmicas (Guazzato et al., 2004).

Outra característica importante da zircônia é apresentar a tenacidade à fratura entre $8 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ à $10 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$. Tenacidade à fratura é uma medida da capacidade de um material de resistir à propagação/crescimento de trincas, ou seja, a quantidade de energia necessária para causar esse crescimento. Portanto, restaurações em zircônia são ideais clinicamente por suportarem adequadamente a fadiga cíclica (Shenoy, Shenoy, 2010). Possui também, como características, resistência à compressão por volta de 2000 MPa, dureza 1200 HV, resistência à flexão entre 900 - 1200 MPa, módulo de Yong 210 MPa, coeficiente de expansão térmica $11 \times 10^{-6} \text{ 1/K}$ e densidade $6,05 \text{ g/cm}^3$ (Piconi, Maccauro, 1999).

A zircônia tem sido utilizada como implante ortopédico por muitos anos e iniciou a aplicação na Odontologia por meio de bráquetes ortodônticos, infraestruturas, restaurações totalmente cerâmicas, pilares e, mais recentemente, como material para implantes. Próteses parciais fixas à base de zircônia podem ser usadas em regiões de alto impacto mastigatório, como em dentes posteriores, devido às suas propriedades mecânicas, além de serem utilizados como *abutment*, permitindo uma reabilitação mais estética por minimizar a coloração cinza transmitida através do tecido peri-implantar, quando utilizados componentes metálicos (Brodbeck, 2003). Contudo, apesar das inúmeras vantagens da zircônia mostradas anteriormente, existem desvantagens, dentre as quais estão a alta incidência de fratura das cerâmicas de cobertura (lascamento) e o processo de degradação da zircônia que pode ser acelerado na presença de água (Al-amleh et

al., 2010). Além disso, a zircônia apresenta a dificuldade de promover adesão com outro material quando comparada às cerâmicas vítreas (Thompson et al., 2011).

Comumente, a zircônia é utilizada como infraestrutura sobre a qual é realizado revestimento com cerâmicas vítreas com finalidade estética (Ramos, 2018). O problema crítico de lascamento do material de revestimento ocorre porque a maioria das cerâmicas de revestimento possui baixos valores de tenacidade à fratura ($0,7 - 0,9 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$), isto é, oito vezes menor do que a zircônia utilizada para confecção da infraestrutura (Wang et al., 2007).

As diferenças químicas e microestruturais significantes entre as cerâmicas de cobertura e a zircônia utilizada na infraestrutura, especificamente a diferença de módulo de elasticidade (E), coeficiente de expansão térmica (CTE), baixa condutividade térmica da zircônia e dificuldades de interdifusão das cerâmicas são fatores que prejudicam a interface devido à falta de compatibilidade entre os dois tipos cerâmicos (Benetti et al., 2010). Além disso, os materiais à base de vidro são fabricados a partir de técnicas convencionais de condensação e sinterização, o que também pode contribuir para baixa resistência à fratura dos materiais de revestimento, devido à porosidade (Triwatana et al., 2012).

Uma maneira de evitar o lascamento das cerâmicas de revestimento descrito nos estudos clínicos é a utilização de restaurações monolíticas (Triwatana et al., 2012). Elas irão permitir a redução da espessura da cerâmica por eliminar a cerâmica de cobertura (Prado et al., 2017), além de possibilitar preparos dentários mais conservadores (Denry, Kelly, 2014).

Outra desvantagem é o processo de envelhecimento da zircônia que é conhecido como degradação em baixa temperatura (DBT) (Kelly, Denry, 2008). Em ambiente úmido, a transformação lenta e espontânea dos grãos da zircônia de uma fase tetragonal para fase monoclinica em temperatura relativamente baixa irá ocorrer ($150-400^\circ\text{C}$) (Kobayashi et al., 1981). Este processo de envelhecimento se inicia nos grãos superficiais e progride internamente, aumentando o risco de

fratura catastrófica (Al-amleh et al., 2010).

Segundo Chevalier et al. (2009), essa transformação martensítica em que o material tetragonal policristalino lentamente se transforma em zircônia monoclinica ocorre por um processo de nucleação e crescimento, que normalmente se inicia na superfície da cerâmica. Sugere-se que essa transformação ocorra pela indução de umidade, facilmente encontrada no ambiente bucal. Por sua vez, a transformação para fase monoclinica tem efeitos negativos no mecanismo de estabilidade das próteses fixas ao longo do tempo. Dentro de um determinado volume, o material perde toda ou parte de sua capacidade de retardar a trinca, o que pode torná-lo frágil (Mochales et al., 2011). Assim, além de deteriorar as propriedades mecânicas (Cottom, Mayo, 1996), a degradação em baixa temperatura (DBT) resultará em uma zircônia com superfície mais rugosa, com menor dureza, tenacidade à fratura e densidade (Chevalier et al., 2007).

A infiltração da zircônia com sílica demonstra algumas vantagens tais como criar uma camada sensível ao condicionamento ácido e silanização (Campos et al., 2016) e evitar a exposição da camada superficial da zircônia ao meio bucal impedindo a degradação em baixa temperatura (159-400°C) responsável por aumentar a porosidade e a rugosidade do material (Chevalier et al., 2009). A zircônia Y-TZP infiltrada por sílica por método sol-gel apresenta uma graduação de módulos elásticos em direção ao interior da zircônia, o que aumenta a capacidade de receber cargas altas e protege contra a degradação em baixa temperatura (Campos et al., 2016).

2.2 Adesão microbiana na superfície dos materiais restauradores

Biofilmes orais são comunidades bem organizadas de microrganismos envolvidos por uma matriz de polissacarídeos contendo ácidos, proteínas e água que

podem se aderir à estrutura dentária, materiais restauradores ou tecidos moles orais (Teughels et al., 2006).

A formação do biofilme na cavidade oral ocorre em um processo gradativo de 4 estágios distintos: (1) Formação de película adquirida; (2) Colonização primária (precoce); (3) Colonização secundária (coagregação); (4) Estabelecimento do biofilme maduro (Teughels et al., 2006). A primeira fase ocorre a partir dos nutrientes fornecidos pela saliva humana permitindo a aderência dos primeiros microrganismos nas superfícies. Esse mecanismo é responsável pela formação de uma fina película (5-10 μm) denominada película adquirida. Todas as superfícies expostas ao ambiente oral são constantemente cobertas por essa película. Após esta primeira fase, a colonização precoce se inicia através da ligação das primeiras bactérias (*S. sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *S. mutans*) à película adquirida. Com o passar do tempo, as bactérias se agregam, proliferam e crescem formando um biofilme maduro que se adere às superfícies (Kolenbrander et al., 2002; Wang et al., 2014). As células bacterianas constituintes do biofilme não sobrevivem isoladamente e sim como um organismo coordenado (Teughels et al., 2006).

Materiais restauradores colocados na cavidade oral são inevitavelmente submetidos à ação microbiana. Os componentes dos materiais podem ser biodegradados pela placa dentária, o que pode comprometer a integridade marginal da restauração e levar à progressão de cárie secundária e peri-implantite (Wang et al., 2014). Além disso, a aderência de biofilme na superfície do material vai depender do oxigênio, nutrientes, pH (Teughels et al., 2006), *design* da prótese, condições de superfícies e microbiota oral (Souza et al., 2016). Teughels et al. (2006) enfatizaram que a rugosidade de superfície, energia livre de superfície, molhabilidade e composição química são fatores dominantes que influenciam na formação do biofilme nos materiais restauradores. Essa formação

do biofilme também vai depender do tipo de material que vai ser utilizado e da microbiota oral.

Restaurações cerâmicas estão sendo amplamente utilizadas nos últimos anos, principalmente devido à alta demanda estética. Entretanto, as falhas clínicas, na maioria das vezes, estão relacionadas com desadaptação marginal, irregularidades de superfícies e excesso de cimento, fatores esses que favorecem o acúmulo de microrganismos comprometendo a longevidade clínica da restauração (Hao et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que materiais com superfícies não polidas podem acumular mais biofilme do que os materiais polidos, incluindo compósitos, cerâmicas, implantes, *abutments* e bases de dentaduras (Teughels et al., 2006). Isso ocorre devido ao aumento da área de contato causado pelas profundas e largas depressões nas superfícies que vão favorecer a colonização bacteriana e a formação de biofilme (Hao et al., 2018). A rugosidade, portanto, é a principal causa do acúmulo de biofilme (Kim et al., 2017), além de dificultar sua eliminação (Hao et al., 2018).

A zircônia tem sido utilizada como material para confecção de *abutments* e implantes pois, além de melhores resultados estéticos, também reduz o acúmulo de biofilme em áreas peri-implantares (Belibasakis et al., 2015). Estudo realizado por Souza et al. (2016) mostraram que as superfícies cerâmicas induzem menos formação de biofilme, associado a menor número de unidades formadoras de colônias, podendo esses resultados estarem relacionados com a baixa intensidade de energia livre de superfície encontradas. Neste contexto, a energia livre de superfície também influencia na aderência microbiana inicial (Souza et al., 2016). Um estudo feito por Scarano et al. (2005) correlacionou uma menor taxa de crescimento bacteriano em zircônia com sua baixa energia livre de superfície.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi produzir materiais com gradação funcional à base de zircônia e vidro, usando o método sol-gel, tendo o metassilicato de sódio como precursor do vidro. Com o mesmo vidro, foi produzido outro material com adição de prata metálica, que também foi aplicado nas superfícies de zircônia.

3.2 Objetivos específicos

O objetivo específico foi testar a hipótese de que o material infiltrado com vidro apresenta propriedades mecânicas superiores às da zircônia sem infiltração. Também demonstrar a maior atividade antimicrobiana do material infiltrado e contendo prata, sem que o mesmo apresente dano celular através dos testes:

- a) Análise das propriedades mecânicas através da resistência à flexão biaxial;
- b) Análise da rugosidade de superfície, energia livre de superfície (ELS) e Microscopia Eletrônica de varredura (MEV);
- c) Análise de formação de biofilme através da contagem de microrganismos para *S. sanguinis* (ATCC 7073), *S. mutans* (UA 159) e *C. albicans* (ATCC 18804);
- d) Análise da viabilidade celular de queratinócitos HaCat por meio dos testes de MTT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Confeção dos corpos-de-prova

Os espécimes de zircônia foram obtidos a partir de blocos de zircônia Vita T (VITA Zahnfabrik, Alemanha) para todos os testes (Figura 1). Os espécimes foram cortados em blocos menores com disco diamantado em máquina de corte (Isomet® 1000, Precision Sectioning Saw, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) sob refrigeração constante (Figura 2). Foram obtidos os espécimes do material e divididos nos seguintes grupos (Figura 3), que foram lixados para padronização das dimensões (Figura 4).

Figura 1 – Bloco de zircônia Vita T (VITA Zahnfabrik, Alemanha)



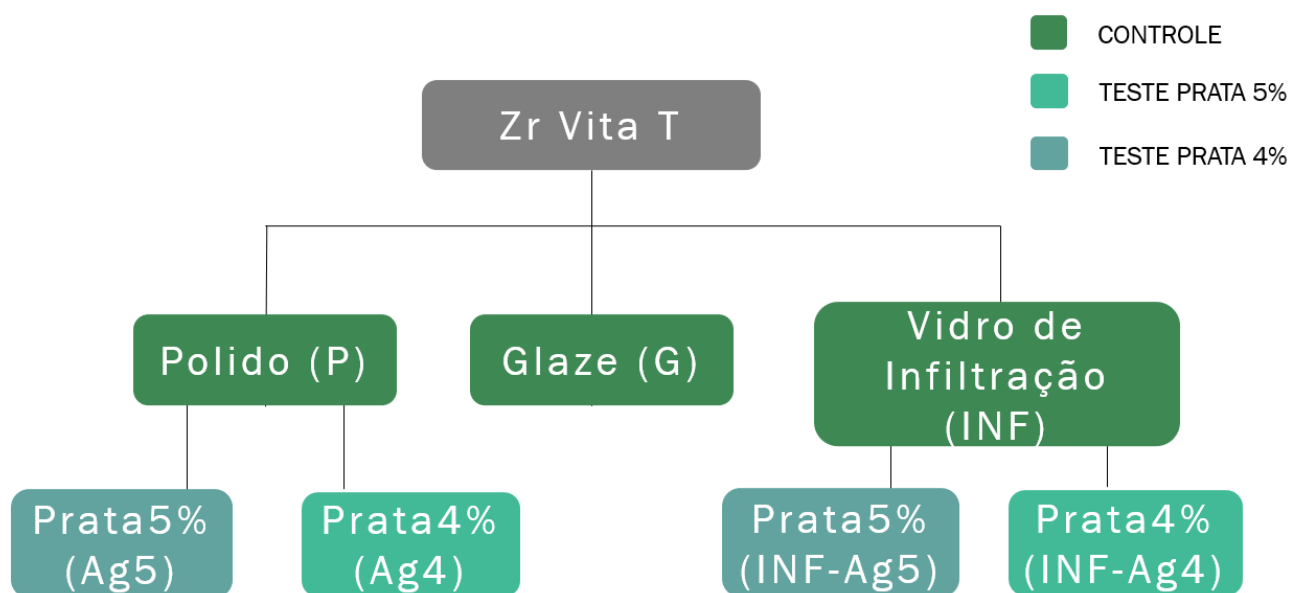
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 2 – Isomet® 1000, Precision Sectioning Saw, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA



Legenda: Corte do bloco em quadrados menores com disco diamantado sob refrigeração.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 – Esquema ilustrativo distribuição dos grupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4 – Amostras pré-sinterizadas lixadas e padronizadas nas dimensões



Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido à contração de 20% da cerâmica T, as dimensões iniciais foram de 5,0 x 5,0 x 2,0 mm (Figura 5). Todos os blocos tiveram suas superfícies polidas manualmente em politriz automática (EcoMet™/AutoMet™250, Buehler, Illinois, EUA) com lixas d'água de granulação decrescente #600 até #1200 (10 s por lixa), sob refrigeração com água. Por fim, as dimensões finais do material foram de 4,0 x 4,0 x 1,6 mm (Figura 6). A superfície de não trabalho da amostra foi determinada através de uma marcação realizada com uma broca diamantada esférica modelo 1014 (KG Sorensen, Medical Burs, São Paulo, Brasil). Após limpeza em banho ultrassônico com álcool isopropílico durante 5 min, os blocos foram colocados em estufa à 37°C por 24 horas.

Figura 5 – Dimensões iniciais de 5,0 x 5,0 x 2,0 mm³



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6- Dimensões finais de 4,0 x 4,0 x 1,6 mm³



Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os grupos infiltrados por vidro (INF; INF-Ag5; INF-Ag4) tiveram sua aplicação realizada na superfície de trabalho da amostra pré-sinterizada através de uma aplicação única com pincel fino em uma proporção de 0,1g de pó para 8 gotas de propilenoglicol P.A.-A.C.S. (LABSynth Produtos para Laboratórios Ltda.) mensurados através de conta-gotas (Figura 7). Em seguida, foram sinterizados em forno Vita Zyrcomat (VITA Zahnfabrik) em 1550 °C

(Figura 8) seguindo o seguinte protocolo (Quadro 1).

Figura 7 – Aplicação do vidro de infiltração sobre a superfície da zircônia



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Forno Vita Zyrcomat (VITA Zahnfabrik)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 1 – Protocolo de sinterização da zircônia

Temperatura inicial (°C)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura de queima (°C)	Tempo de queima (min)
25	17	1550	120

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espécimes dos grupos não infiltrados por vidro (P; G; Ag5; Ag4) também foram sinterizados em forno Vita Zyrcomat (VITA Zahnfabrik) em 1550°C sem a aplicação do vidro.

O grupo YZ polido foi submetido apenas ao protocolo de lixamento descrito anteriormente.

As amostras do grupo com *glaze* (G) receberam, após a sinterização, uma camada de *glaze* Vita Akzent Pó/Líquido (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) sobre a face de trabalho através de uma aplicação única com um pincel fino, conforme recomendação do fabricante, e passaram por uma queima de *glaze* em forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 9) seguindo o seguinte protocolo (Quadro 2)

Figura 9 - Forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 2 – Protocolo de queima de *glaze*

temperatura inicial (°C)	Tempo na Temperatura inicial (min)	Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura de queima (°C)	Tempo de queima (min)
500	5	80	950	5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a fabricação do vidro com prata (seção 4.2), este foi aplicado sobre a superfície de trabalho dos espécimes já sinterizados dos grupos Ag-5 e INF-Ag5 com pincel e propilenooglicol P.A.-A.C.S. (LABSynth Produtos para Laboratóriod Ltda.) em uma proporção de 0,1g de pó de vidro com prata, checados em balança de precisão (Adventurer- AR Analytical; Ohaus, Barueri, São Paulo, Brazil) para 8 gotas de líquido (propilenoglicol) mensurados através de conta-

gotas (Figura 10). A incorporação do pó com o líquido foi feita com auxílio de um almofariz de ágata com pistilo (Figura 11). As amostras passaram, então, por uma queima de *glaze* em forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 9) seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente (Quadro 2).

Figura 10 – Preparação vidro



Legenda: Proporção do líquido com conta-gotas e do pó previamente mensurado em balança de precisão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Incorporação Pó/Vidro



Legenda: Incorporação do pó de vidro com o líquido propilenooglicol P.A.-A.C.S. (LABSynth Produtos para Laboratóriod Ltda.) através de movimentos circulares e contínuos com o pistilo contra o almofariz de agatar.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os grupos Ag4 e INF-Ag4 o protocolo de aplicação foi o mesmo descrito anteriormente, entretanto, foi confeccionada uma mistura de 80% de pó de vidro com prata e 20% de *glaze* comercial (ex: 0,08g de pó de vidro com prata + 0,02g de pó de *glaze*; diluídos em 8 gotas do líquido). As amostras foram pesadas antes e após a aplicação do vidro (Adventurer-AR Analytical; Ohaus, Barueri, São Paulo, Brazil), totalizando 0,1g de vidro em cada amostra e passaram por uma queima de *glaze* em forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha). Assim, a concentração inicial do vidro com prata que era de 5%, passou a ser 4% após a dissolução.

4.2 Fabricação de vidro

A fabricação do vidro foi dada pela seguinte maneira: o ácido silícico foi obtido pela passagem de metassilicato de sódio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em solução aquosa (10% m/m) através de uma resina de troca iônica (IR120 – Rohm and Haas). A seguir, foram adicionados sais de alumínio (Al_2O_3 -11,7%), cálcio (CaO 3,0 %), sódio (Na_2O -7,3%) e potássio (K_2O -10,0 %) para a formação do vidro. Essa composição foi obtida através da mistura dos nitratos correspondentes aos cátions e a solução de ácido silícico correspondente à quantidade de sílica.

O vidro contendo prata consistiu de SiO_2 - 65%, Al_2O_3 -1,1%, K_2O -0,59%, Na_2O -14,54%, CaO- 8,93 %, MgO- 3,41% e Ag-5%. A fonte de prata utilizada foi o nitrato de prata, que oxidou durante o processo de calcinação. Dessa forma, os dois tipos de vidros foram colocados em estufa a 100°C por 24 h e, em seguida, calcinados a 600°C por 5 horas. Após tal processo, ambos foram moídos em almofariz de alumina e peneirados (# 200 mesh).

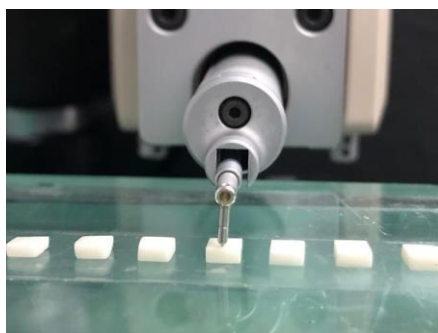
4.3 Caracterização da superfície dos materiais

4.3.1 Análise da rugosidade e perfilometria

Na superfície de trabalho de cada amostra foi analisada a rugosidade de superfície ($n=15$), nos parâmetros Ra (rugosidade média absoluta das alturas das irregularidades ao longo do perfil; parâmetro de altura), RSm (espaçamento ou largura média do perfil das irregularidades dentro de um comprimento de amostragem; parâmetro híbrido) e RZ (profundidade da rugosidade média) (Wennerberg, Albrektsson, 2000) dos espécimes. Os espécimes foram individualmente identificados e na superfície de cada amostra (4,0 x 4,0 mm) realizadas leituras (3 mm) da rugosidade tridimensional através de um rugosímetro (Surftest SJ 400, Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Figura 12).

Foram realizadas três leituras paralelas equidistantes com velocidade de varredura de 0,2 mm/s, seguindo a norma ISO 4287-1997, com filtro Gaussian e o valor *cut-off* de 0,8 mm, e foram feitas mais três leituras paralelas com amostra movimentada em 90° nos mesmos parâmetros descritos acima. Em seguida, 2 amostras de cada grupo foram utilizadas na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (seção 4.5), para análise da topografia de superfície.

Figura 12 – Leitura realizada com rugosímetro



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Análise da energia livre de superfície (ELS)

Foram obtidas cinco amostras para cada grupo ($15 \times 15 \times 1,5$ mm) (Figura 13 e 14), de forma semelhante ao descrito anteriormente, que foram utilizadas para análise da ELS por goniometria. As amostras com tamanho maior foram necessárias para possibilitar 5 medições em áreas distintas de uma mesma amostra. O tensiômetro óptico TL 1000 – Theta Lite (Attension, Lichfield, Staffordshire, Reino Unido) foi utilizado para a medição do ângulo de contato médio em 5 áreas distintas por amostra com a técnica de gota séssil com dois líquidos de diferentes tensões de superfícies: água destilada e diiodometano em temperatura ambiente.

Figura 13 - Amostras de $15 \times 15 \times 1,5$ mm



Legenda: Da esquerda para direita: P; G; INF.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Amostras de $15 \times 15 \times 1,5$ mm



Legenda: Sup. Esq.: Ag5; Sup. Dir.: INF-Ag5; Inf. Esq.: Ag4; Inf. Dir.: INF-Ag4.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Previamente à análise, cada amostra foi limpa em banho ultrassônico (álcool isopropílico) durante 5 min e manuseada com cuidado (luvas) evitando contaminação. Uma seringa graduada (Gastight Syringes #1001 – 1ml, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) com agulha hidrofóbica depositou a gota e, após o tempo de espera de 5s, o ângulo de contato médio foi calculado (OneAttension, Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, Reino Unido) a partir da aquisição de 60 imagens por segundo durante 10s. A energia livre de superfície, em mJ/m², foi calculada de acordo com o método proposto por Owens e Wendt (1969).

O ângulo de contato consiste em um equilíbrio entre as energias presentes na interface entre sólido e líquido (Craig, 1993). Através da fórmula da média harmônica, são geradas duas equações para obtenção da energia livre de superfície através de dois líquidos (Combe et al., 2004).

$$(1) W_{12A} = \gamma_1(1 + \cos\theta_A) = \frac{4\gamma_{1A}^d\gamma_2}{\gamma_{1A}^d\gamma_2^d} + \frac{4\gamma_{1A}^p\gamma_2^p}{\gamma_{1A}^p\gamma_2^p}$$

$$(2) W_{12B} = \gamma_1B(1 + \cos\theta_B) = \frac{4\gamma_{1B}^d\gamma_2^d}{\gamma_{1B}^d\gamma_2^d} + \frac{4\gamma_{1B}^p\gamma_2^p}{\gamma_{1B}^p\gamma_2^p}$$

Na primeira fórmula, foram utilizadas as informações referentes ao líquido 1 (diiodometano): cosseno do ângulo de contato obtido e suas variáveis dispersiva e polar já conhecidas (Quadro 3) (Combe et al., 2004). Desta forma, foi obtida a variável dispersiva do sólido. A partir do valor encontrado para a variável dispersiva do sólido, do cosseno do ângulo de contato obtido do líquido 2 (água) e suas variáveis dispersiva e polar, foi obtida a variável polar do sólido através da segunda fórmula. A energia livre de superfície do sólido corresponde ao somatório de suas variáveis dispersiva e polar.

Quadro 3 - Componentes dispersivo (γ_d) e polar (γ_p) e energia de superfície (γ_T) dos líquidos utilizados para medidas de ângulo de contato, em mN/m

Líquido	γ_d (mN/m)	γ_p (mN/m)	γ_T (mN/m)
Água deionizada	21,8	51,0	72,8
Diiodometano	50,8	0,0	50,8

Fonte: Combe et al. (2004).

Com as 5 médias dos ângulos de contato da água e do diiodometano nas 5 amostras de cada material, foi obtida uma média geral para cada líquido para cada grupo.

4.4 Atividade antimicrobiana

4.4.1 Esterilização e formação dos biofilmes microbianos

Cinquenta e seis espécimes de 4,0 x 4,0 x 1,6 mm (n=8) por microrganismo testado foram esterilizados em câmara de fluxo laminar. Os espécimes foram posicionados dentro do fluxo laminar, onde permaneceram sob a luz ultravioleta por 15 min de cada lado de 4,0 x 4,0 mm e foram manipulados com instrumental também estéril. Para confirmar a ausência de alterações de superfícies resultantes deste procedimento, foram analisadas a rugosidade de superfície de cada amostra antes e após a esterilização. Os espécimes esterilizados por radiação ultravioleta foram colocados em caldo BHI (infusão de cérebro

coração) por 24h e 48h em estufa a 37°C. A ausência de turvação garantiu a eficácia deste processo de esterilização.

Assim, os espécimes foram identificados e dispostos na câmara de fluxo laminar para o processo de esterilização por radiação ultravioleta conforme descrito anteriormente. A metodologia proposta por Pereira et al., 2011 foi utilizada com algumas modificações para avaliação da formação dos biofilmes sobre a superfície dos materiais restauradores. Os biofilmes testados foram compostos por cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804), de *S. sanguinis* (ATCC 7073) e *S. mutans* (UA 159).

Suspensões-padrão de cada cepa foram preparadas com densidade óptica relativa a 10^6 células/mL. Para isto, a cepa de *C. albicans* foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada por 24h em estufa 37°C. Os estreptococos foram semeados em ágar BHI – Brain Heart Infusion (Difco, Detroit, EUA) e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após incubação, as colônias de microrganismos foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl a 0,9%) e a quantidade de células suspensas verificada em um espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo). Para isto, os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda de 0,284 e 530 nm para *C. albicans*, de 0,620 e 398 nm para *S. mutans* e 0,560 e 398 nm para *S. sanguinis*. Estes parâmetros foram pré-estabelecidos por meio de uma curva padrão com as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) versus absorvância. No experimento com *C. albicans*, foi feita a incubação 200 μ l do microrganismo com 200 μ l de meio de cultura YNB já padronizado na placa de 96 poços junto com as amostras por 1:30h, para favorecer a formação de biofilme (período de pré-adesão). Nos experimentos com estreptococos não foi necessário esse período de pré adesão. Foram contaminadas 8 amostras de cada grupo para obtenção do biofilme homotípico com cada microrganismo (Figura 15). Em seguida, duas amostras de cada grupo foram utilizadas para análise em MEV (Seção 4.7). Para

avaliar a formação de biofilme, as placas foram seladas e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ durante 24h (Figura 16).

Figura 15 – Placa de 96 poços



Legenda: Amostras posicionadas dentro do poço da placa de 96 poços.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Estufa de CO₂ a 37 °C



Legenda: As amostras ficaram por 24 horas na incubadora.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL)

As amostras (n=8) foram lavadas substituindo-se 200µL do caldo de cada poço por solução fisiológica estéril e as placas foram agitadas por 5min (agitador orbital, Solab, Piracicaba) para se remover células bacterianas não aderidas. Então, os espécimes foram individualmente transferidos para novos poços com 180µL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%) e sonicados (Sonoplus HD 2200, 25 W, Bandelin Eletronic, Berlin, Germany) por 25s para remoção dos biofilmes das superfícies.

Uma série de diluições decimais e alíquotas de 5µL das diluições de 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 foram realizadas e semeadas para *C. albicans*, 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 *S. sanguinis* e 10^2 , 10^4 e 10^6 para *S.mutans*, em duplicatas, em placas de Petri com meios seletivos para o crescimento das unidades formadoras de colônias de cada microrganismo: ágar Sabouraud dextrose com 50 mg/l de cloranfenicol (União Química, São Paulo) para *C. albicans* (Figura 17), ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) para *S. sanguinis*, ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) com 0,2 UI/mL de bacitracina (União Química, São Paulo) e sacarose (MSBS) para *S. mutans*. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h e, em seguida, foram contadas (à mão) e o número de UFC/mL, determinado.

Figura 17 – Colônias de microrganismos formadas no meio de cultura



Legenda: *C. albicans* em ágar Sabouraud e coranfenicol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Teste de biocompatibilidade

4.5.1 Esterilização dos espécimes e cultivo celular

Espécimes quadrangulares (4,0 x 4,0 x 1,6 mm) foram dispostos em placas de petri descartáveis estéreis (90x15mm), sendo esterilizados com radiação UV em fluxo laminar, expondo ambos os lados dos espécimes por 20 min à radiação. Após processo de esterilização, as amostras foram depositadas em placas de 96 poços estéreis para a realização do teste de toxicidade celular.

4.5.2 Cultivo celular

A linhagem de Queratinócitos Humanos HaCat, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂.

Após obter o estado de subconfluência da garrafa celular, caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as células foram desagregadas do assoalho da garrafa de forma química, utilizando tripsina. As células suspendidas foram transferidas para um tubo de centrifugação (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) e submetidas a centrifugação por 5 min a 3000 rpm, promovendo assim a remoção do meio de cultivo consumido, seguido pela substituição por meio de cultivo fresco.

As células foram submetidas ao teste de azul de Trypan, para verificação da integridade celular e contagem. A contagem celular foi realizada com alíquotas

de 50 μ L da suspensão de células misturadas a 50 μ L do corante azul de Trypan, obtendo a diluição 1/2. Em seguida a diluição foi transferida para a câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem de células viáveis. Após contagem dos 4 quadrantes laterais da câmara, foi realizada uma média dos resultados obtidos, sendo a média multiplicada pelo valor da diluição empregada na contagem, assim, foi obtido o valor de células por mL de solução utilizando o valor de correção do volume da câmara (10^4).

4.5.3 Avaliação da citotoxicidade

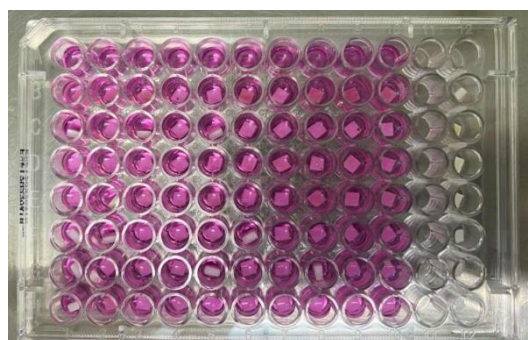
Após contagem celular, os queratinócitos humanos (HaCat) foram transferidos para microplacas de 96 poços (TPP) na concentração de 4×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 μ L de meio DMEM + 10% SFB. Após, as placas foram incubadas (37 °C, com 5 % de CO₂) por 24 h para a aderência celular.

A viabilidade celular foi determinada através da atividade metabólica da mesma, verificando se a célula possuía a capacidade de produzir enzimas (redutases) capazes de reduzir o MTT (brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il-] - 2,5-difenil tetrazólio) em cristal de formazam. Para isso, a solução de MTT preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma, Missouri, EUA) em 1 mL de DMEM + 10% SFB, foi transferida para as microplacas de 96 poços no volume de 100 μ L/poço, seguido pela incubação ao abrigo da luz (37 °C, com 5% de CO₂) por 1 h. Posteriormente a solução foi descartada e 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) foram adicionados à placa para expor os cristais de formazina produzidos por células viáveis. Após incubação de 10 minutos e agitação em shaker, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas (EL808IU, Biotek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram

convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

Figura 18 – Placa de 96 poços com a solução de MTT em contato com as células HaCaT e as amostras



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Ensaio de resistência à flexão biaxial

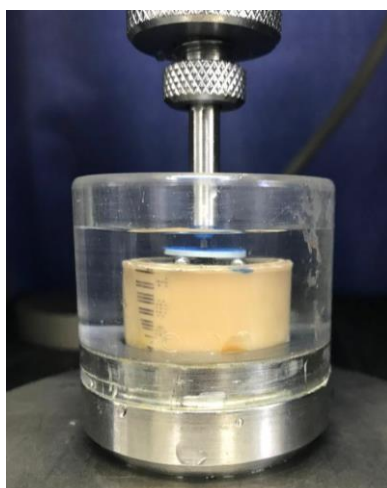
Para determinar resistência à flexão da amostra, 210 amostras (n=30) foram posicionadas em uma base circular metálica com três esferas de 3,2 mm de diâmetro, equidistantes uma das outras, formando um plano (ISO 6872). Uma ponta romba de 1,6 mm de diâmetro foi fixada a uma máquina de ensaio (Emic DL-1000, Emic, São José dos Pinhais, PR, Brasil), e a carga foi aplicada. Durante o teste de flexão biaxial a amostra foi recoberta com uma fita do lado de compressão para que o contato com a ponta aplicadora da carga não produzisse defeitos e que se mantivesse os fragmentos em posição. Em seguida, preencheu-

se o suporte de vidro com água para aproximar o teste a uma condição clínica e se posicionou o espécime na base circular iniciando a aplicação de carga (Figura 19). O carregamento axial de compressão foi aplicado utilizando célula de carga de 1000 kgf e velocidade de 1 mm/min até a fratura do espécime. Os valores obtidos no teste foram em Newton (N). O cálculo de resistência à flexão biaxial (σ) (MPa) dos discos foi obtido de acordo com a descrição da norma ISO 6872:

$$\sigma = -0,2387P \frac{(X - Y)}{b^2}$$

Onde P é a carga em N, X e Y são parâmetros relacionados às propriedades elásticas do material (Razão de Poisson em Módulo Elástico) e b é a espessura do espécime na origem da fratura em mm.

Figura 19 – Ensaio de flexão biaxial



Legenda: Dispositivo para flexão biaxial com uma amostra em posição imersa em água.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV, Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) foi realizada para analisar morfológicamente a superfície dos materiais para observação do vidro contendo prata e a microestrutura da zircônia (n=2), e para analisar morfológicamente a superfície dos materiais contaminados com biofilme homotípico (n=2).

Os espécimes contaminados com microrganismos foram fixados utilizando o protocolo de imersão em solução de glutaraldeído 2,5 % por 1h em temperatura ambiente, e desidratadas subsequentemente por uma série de passagens em concentrações crescentes de álcool etílico (10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 80 % e 90 % por 20 min cada e 100 % durante 1 hora).

Todos os espécimes foram fixados em porta-amostras com fita adesiva dupla-face de carbono (SPI, West Chester, PA, EUA) e, então, foram metalizados com liga de ouro-paládio (Polaron SC 7620 Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130s, corrente de 10-15 mA, vácuo de 130 mTorr, taxa de metalização: 3,5 nm/min e camada de Pd-Au de aproximadamente 80 Å. O MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) foi operado entre 15 e 30 kV e spot de 3 a 6.

4.8 Forma de análise dos resultados

Os dados quantitativos obtidos com análise da rugosidade (Ra), contagem de unidades formadoras de colônia (Log UFC), energia livre de superfície (mJ/m²) e resistência à flexão biaxial (MPa) foram submetidos à análise exploratória e, posteriormente, analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) 1 fator e teste de Tukey para detecção das diferenças

($p < 0,05$).

Os dados qualitativos foram analisados por meio de imagens (MEV) de forma descritiva.

5 RESULTADO

5.1 Análise da rugosidade

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores de média, desvio-padrão e coeficiente de variância a 95 % dos dados de rugosidade para os parâmetros avaliados (Ra). Foi realizada um teste Tukey, 1 fator.

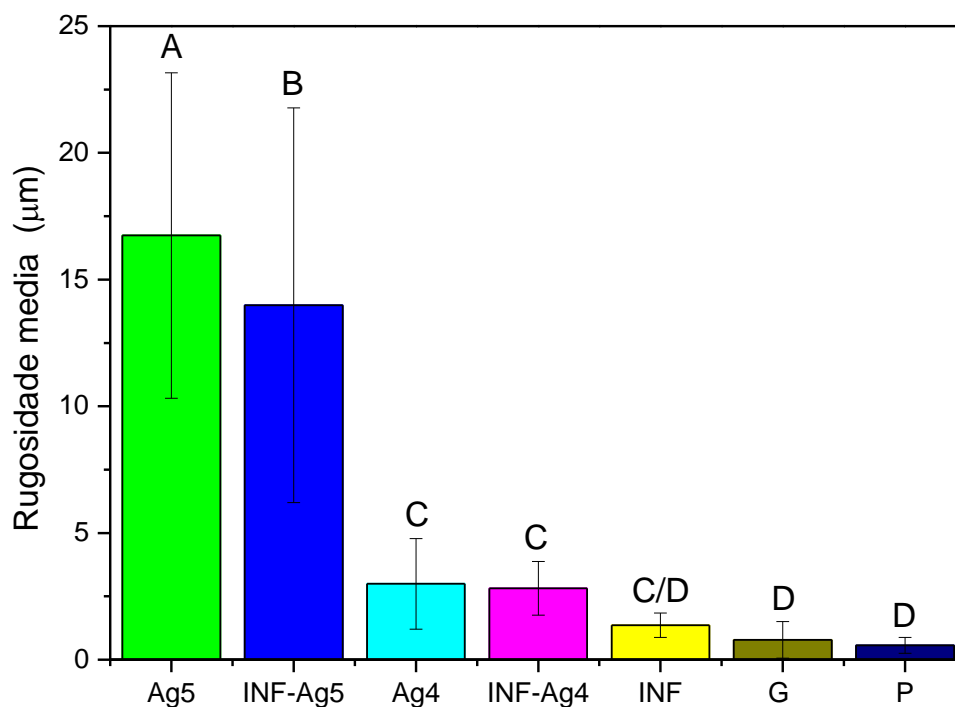
Tabela 1- Valores de média \pm desvio padrão (dp), em μm , dos valores de rugosidade para o parâmetro Ra ($p < 0,05$)

	Ra
Grupos	Média \pm dp
Polido (P)	0,56 \pm 0,31D
Glaze (G)	0,78 \pm 0,72D
Vidro Infiltração (INF)	1,52 \pm 0,53CD
Ag5	16,73 \pm 1,78A
Ag4	2,99 \pm 1,78C
INF-Ag5	13,98 \pm 7,78B
INF-Ag4	2,81 \pm 1,055C

Legenda: Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa na comparação do parâmetro Ra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20- Gráfico de barras da mediana e faixa interquartil dos dados de rugosidade de acordo com as aplicações dos diferentes vidros



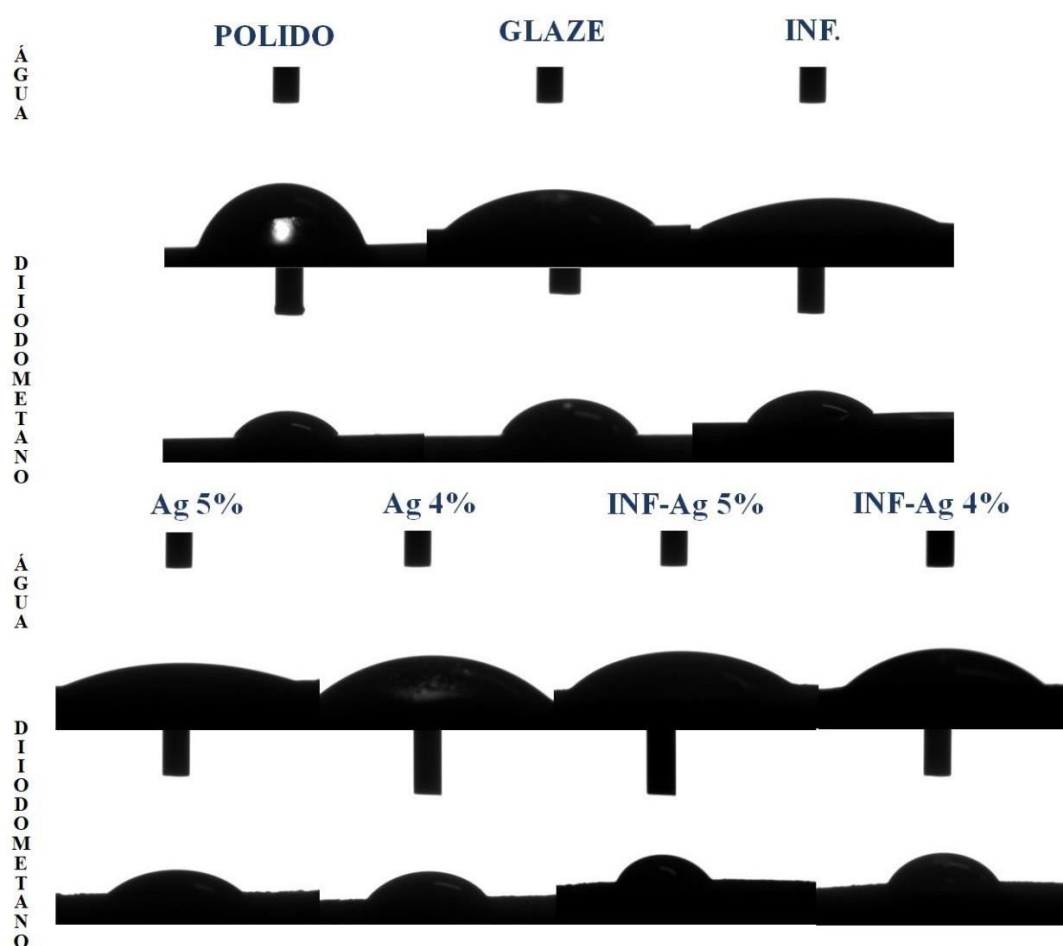
Fonte: Elaborado pelo autor.

Como visto na Tabela 1 e Figura 20, foi detectado a partir do parâmetro Ra que o grupo a apresentar maior ranhura ($p < 0,05$), em média, mais altas (Ra), foi o Ag5, seguido do INF-Ag5 (diferentes estatisticamente entre si). Os grupos Ag4, INF-Ag4 e INF possuem Ra significativamente menor quando comparados aos grupos Ag5 e INF-Ag5, e são semelhantes entre si. Os grupos INF, G e P são significativamente semelhantes entre si e menos rugosos quando comparados aos demais grupos.

5.2 Análise da energia livre de superfície (ELS)

Cinco amostras de cada grupo foram analisadas por goniometria. Na Figura 21 estão apresentadas imagens representativas de cada grupo para ELS através da mensuração do ângulo de contato com água e diiodometano.

Figura 21 – Fotos das interações das gotas de água e diiodometano com as superfícies das amostras



Fonte: Elaborada pelo autor.

Através da mensuração dos ângulos de contato dos diferentes líquidos (água e diiodometano) com as superfícies das amostras, foi calculada a energia livre de

superfície de cada grupo (Tabela 2). A análise de ANOVA + tukey ($\alpha=0,05$) apontou que o grupo Ag5 apresentou maior valor de ELS, semelhante estatisticamente ao G, seguido do INF, INF-Ag4, INF-Ag5, Ag4 e, por último, o grupo P que apresentou menor valor de ELS.

Tabela 2 – Análise da energia livre de superfície das amostras por goniometria

GRUPO	ENERGIA POLAR	ENERGIA DISPERSIVA	ELS	MÉDIA
P	H: 23.96 ± 1.66	H: 34.70 ± 0.99	H: 58.66 ± 1.75	58,66 D
	G: 20.54 ± 1.93	G: 33.47 ± 1.14	G: 54.02 ± 1.93	
G	H: 37.17 ± 1.15	H: 36.54 ± 0.50	H: 73.72 ± 1.16	73,72 AB
	G: 35.36 ± 1.27	G: 35.57 ± 0.57	G: 70.93 ± 1.24	
INF	H: 37.11 ± 1.08	H: 33.58 ± 1.79	H: 70.70 ± 1.13	70,70 BC
	G: 36.11 ± 1.54	G: 32.18 ± 2.01	G: 68.29 ± 0.96	
AG5	H: 36.49 ± 0.84	H: 40.57 ± 1.78	H: 77.06 ± 1.25	77,06 A
	G: 33.53 ± 1.31	G: 40.06 ± 1.96	G: 73.59 ± 0.97	
AG4	H: 26.86 ± 2.58	H: 40.03 ± 1.29	H: 66.89 ± 1.78	66,89 C
	G: 22.78 ± 1.84	G: 39.47 ± 1.42	G: 62.25 ± 1.85	
INF-AG5	H: 33.52 ± 2.46	H: 34.46 ± 2.49	H: 67.97 ± 2.59	67,97 C
	G: 31.77 ± 3.01	G: 33.19 ± 2.72	G: 64.96 ± 2.64	
INF-AG4	H: 34.58 ± 1.07	H: 34.68 ± 0.62	H: 69.26 ± 1.07	69,26 BC
	G: 32.94 ± 1.22	G: 33.44 ± 0.69	G: 66.38 ± 1.19	

Legenda: “H” representa os dados em Harmônico e “G” representa os dados em Geométrico. Unidade de medida: (mN/m). : Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa na média da ELS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os grupos apresentados na Tabela 3 apresentaram comportamento parcialmente hidrofílico por apresentarem valores do ângulo de contato médio maior que 0 e menor que 180 ($0 < \theta < 180$). Essa característica dificulta o contato direto entre o material e o microrganismo devido à presença de uma película de água entre os dois.

Tabela 3 – Ângulo de contato médio (θ)

ÁGUA	DIODOMETANO
ÂNGULO DE CONTATO MÉDIO (θ)	
H: 50.85 \pm 3.02	H: 51.43 \pm 2.03
G: 50.85 \pm 3.02	G: 51.43 \pm 2.03
H: 21.31 \pm 3.25	H: 47.66 \pm 1.04
G: 21.31 \pm 3.25	G: 47.66 \pm 1.04
H: 24.96 \pm 1.60	H: 53.71 \pm 3.56
G: 24.96 \pm 1.60	G: 53.71 \pm 3.56
H: 18.58 \pm 1.78	H: 39.10 \pm 3.97
G: 18.58 \pm 1.78	G: 39.10 \pm 3.97
H: 42.08 \pm 3.07	H: 40.28 \pm 2.82
G: 42.08 \pm 3.07	G: 40.28 \pm 2.82
H: 32.34 \pm 4.61	H: 51.93 \pm 4.89
G: 32.34 \pm 4.61	G: 51.93 \pm 4.89
H: 29.80 \pm 2.29	H: 51.48 \pm 1.23
G: 29.80 \pm 2.29	G: 51.48 \pm 1.23

Legenda: “H” representa os dados em Harmônico e “G” representa os dados em Geométrico. Unidade de medida: (mN/m).

Fonte: Elaborada pelo autor.

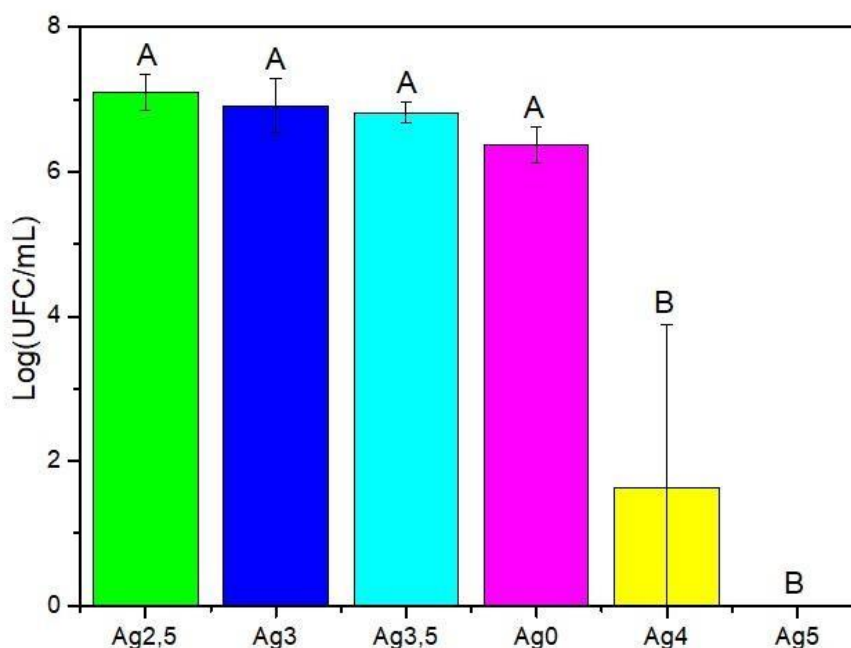
5.3 Atividade antimicrobiana

5.3.1 Contagem de unidades formadora de colônia (UFC/mL)

Para definir a menor concentração de prata possível capaz de inibir o crescimento da *C. albicans* foi realizado o teste piloto de UFC/mL com diferentes concentrações de prata aplicadas na zircônia T (VITA Zahnfabrik, Alemanha). Foram escolhidas 5% (Ag5); 4% (Ag4); 3,5% (Ag3,5); 3% (Ag3); 2,5% (Ag2,5) de prata para serem testadas. O gráfico da Figura 22 apresenta a distribuição dos dados de UFC/mL transformados em logaritmos de base 10 do biofilme de *C. albicans* comparando as concentrações diferentes de prata. Foi realizado teste ANOVA 1 fator + Tukey ($\alpha=0,05$). Observou-se que não houve aderência de *C.*

albicans após 24h sobre as cerâmicas do grupo 5% (Ag5), que se apresentou significativamente semelhante ao grupo 4% (Ag4) ($p < 0,05$). Os demais grupos 3,5% (Ag3,5); 3% (Ag3); 2,5% (Ag2,5) e controle (Ag0) foram estatisticamente diferentes dos grupos 5% (Ag5) e 4% (Ag4), apresentando maior aderência de superfície em UFC/mL de *C. albicans*, e foram semelhantes entre si. Os grupos 4% (Ag4) e 5% (Ag5) foram escolhidos, portanto, para a realização dos posteriores testes de UFC/mL com biofilme homotípico.

Figura 22 – Gráfico de distribuição dos dados de Log (UFC/mL) pela *C. albicans* de acordo com a diferentes concentrações de prata

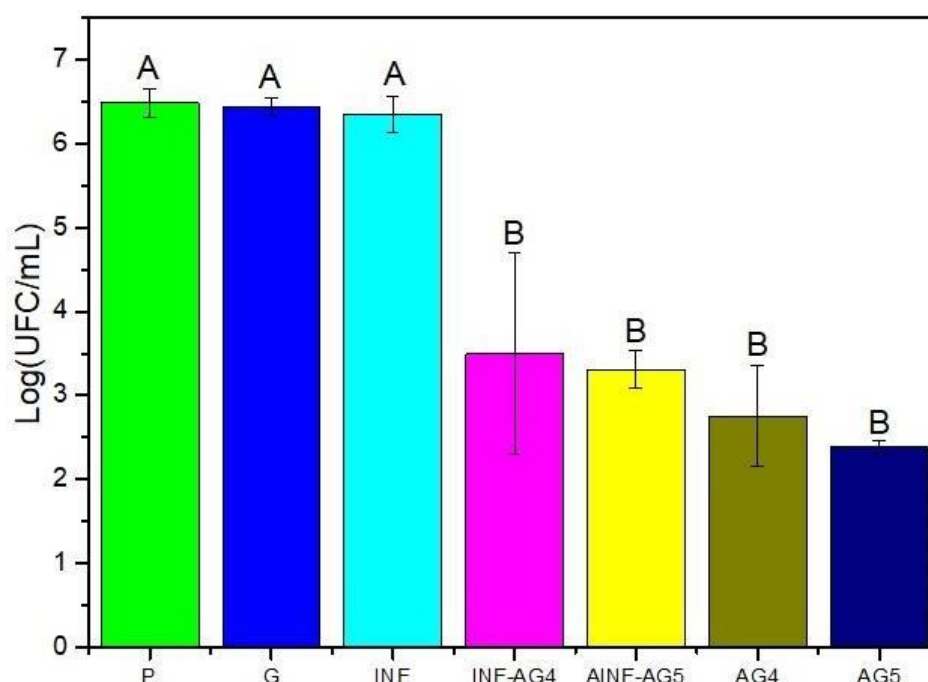


Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente, foi realizado o teste de UFC/mL com *C. albicans* com os grupos pré-definidos: Polido (P); Glaze (G); Vidro de Infiltração (INF); Ag5% (Ag5); Ag4% (Ag4); INF-Ag5% (INF-Ag5); INF-Ag4% (INF-Ag4). Foi

realizado teste ANOVA 1 fator + Tukey ($\alpha=0,05$). Os grupos P; G; INF apresentaram maior aderência de *C. albicans*, sendo significativamente semelhantes entre si e diferentes dos grupos INF-Ag4; INF-Ag5; Ag4; Ag5 que apresentaram nenhuma ou menor aderência significativa de *C. albicans* ($p<0,05$), sendo significativamente semelhantes entre si. Mesmo tendo apresentado a maior ranhura ($p<0,05$), em média, mais altas (Ra), o grupo Ag5 foi o que menor teve aderência do biofilme, mostrando que a prata contida no vidro foi capaz de inibir essa aderência por meio do seu mecanismo de liberação iônica (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico de distribuição dos dados de Log (UFC/mL) pela *C. albicans* de acordo com as diferentes aplicações de vidros

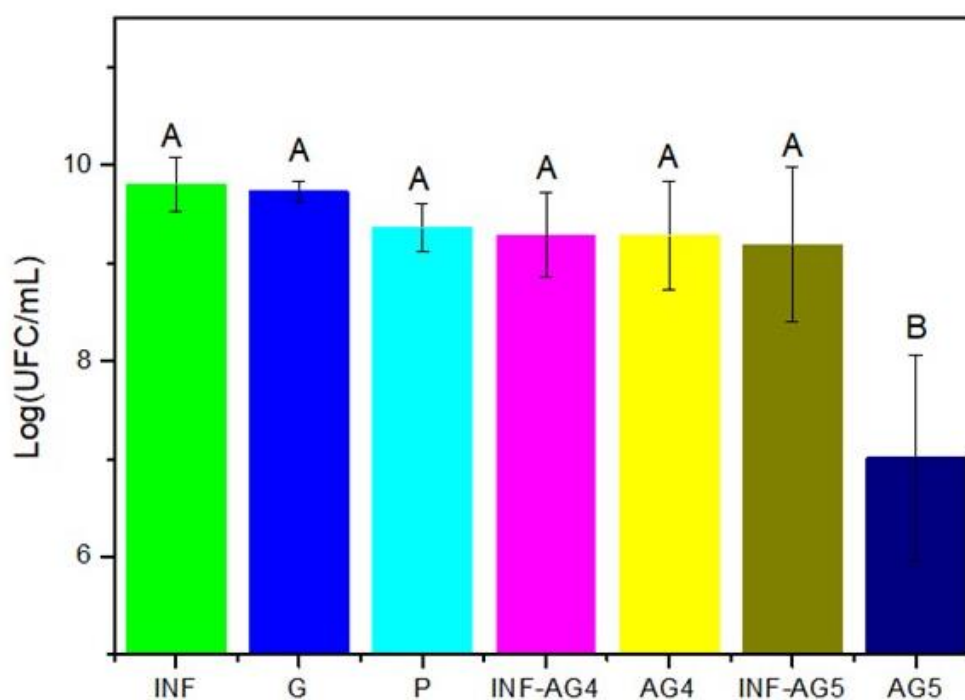


Fonte: Elaborada pelo autor.

O teste de UFC/mL com *S. mutans* também foi realizado com os grupos: P; G; INF; Ag 5; Ag4; INF-Ag5 e INF-Ag4. A partir da análise por teste ANOVA 1 fator + Tukey ($\alpha=0,05$) e foi observado que apenas o grupo Ag5 obteve diferença estatística ($p<0,05$) na contagem de colônias em comparação com os grupos INF;

G; P; INF-Ag4 e INF-Ag5 que foram estatisticamente semelhantes entre si (Figura 24).

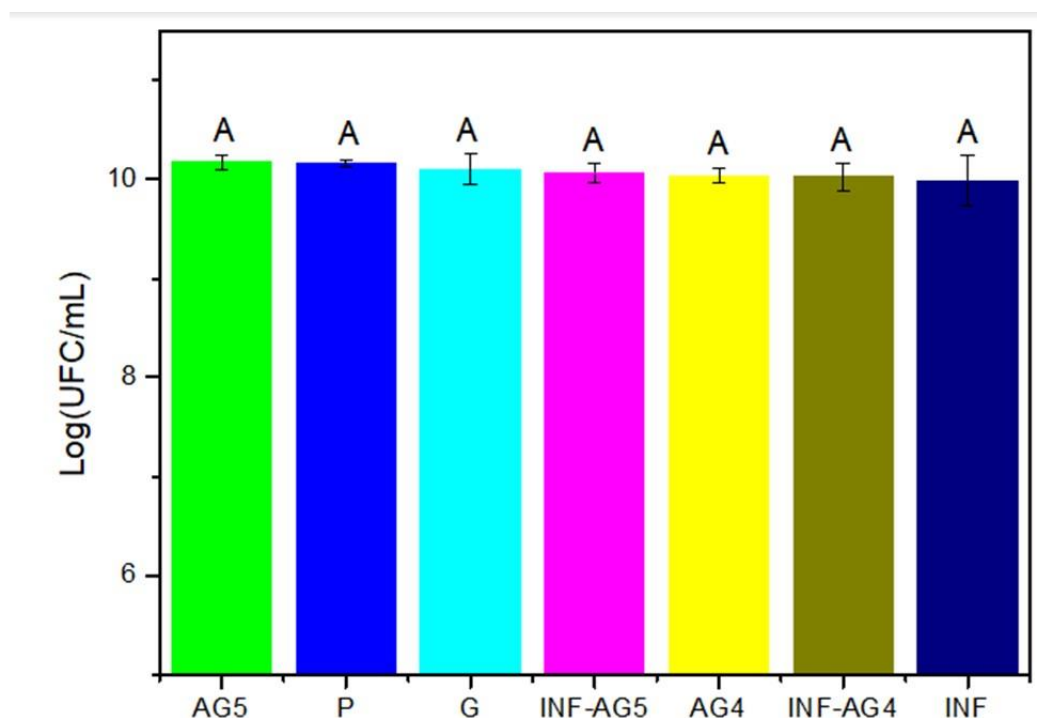
Figura 24 – Gráfico de distribuição dos dados de Log (UFC/mL) pela *S. mutans* de acordo com as diferentes aplicações de vidros



Fonte: Elaborada pelo autor.

Já o teste de UFC/mL com *S. sanguinis* não resultou em diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos testados (ANOVA – 1 fator + Tukey) ($\alpha = 0,05$), o que pode ser explicado pela maior capacidade de aderência do estreptococo (Figura 25).

Figura 25 – Gráfico de distribuição dos dados de Log (UFC/mL) pela *S. sanguinis* de acordo com as diferentes aplicações de vidros



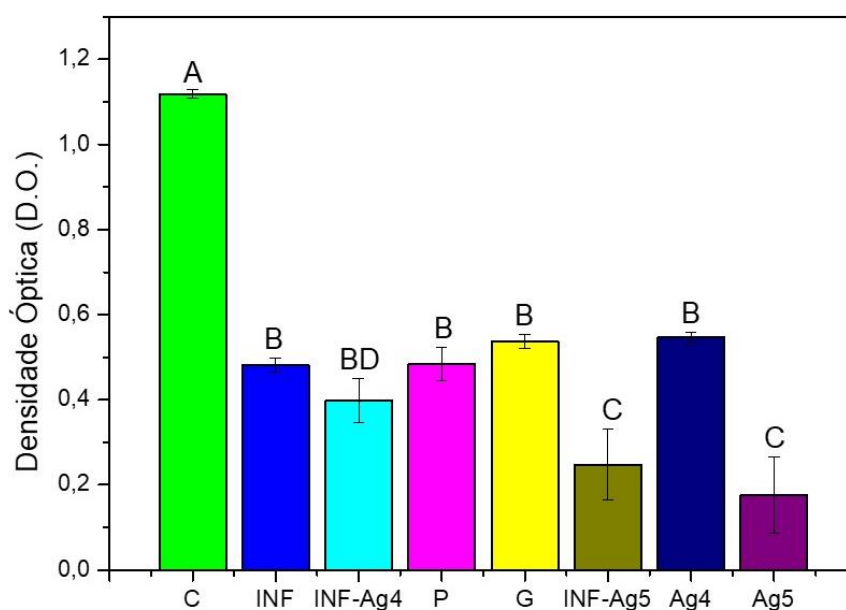
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Teste de citotoxicidade

Foi realizado o teste ANOVA + Tukey 1 fator ($\alpha=0,05$) como visto na Figura 26. Os resultados do ensaio MTT indicaram que as células HaCaT em contato precoce (24 horas) como o grupo P, G e INF promoveu viabilidade celular de 42,3; 47,1 e 41,45%, respectivamente. Os grupos com 5% de vidro de prata, Ag5 e INF-Ag5, após o tempo de aplicação de 24 h obtiveram os percentuais de viabilidade de 16,2 e 21,39%. Já as concentrações de 4% de vidro de prata representadas pelos grupos Ag4 e INF-Ag4, após mesma exposição de tempo, apresentaram valores de 49 e e 35,4% de viabilidade celular. Como representado

na Tabela 4, todos os grupos apresentaram diferença estatística do grupo controle sem amostra (100% de viabilidade celular) validando os resultados. Os grupos INF, INF-Ag4, P, G e Ag4 foram estatisticamente semelhantes entre si e apresentaram maior viabilidade celular estatística quando comparados aos grupos INF-Ag5 e Ag5. O grupo INF-Ag4 se mostrou estatisticamente semelhante aos grupos INF, P, G e Ag4 e diferente estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$).

Figura 26 – Gráfico da densidade óptica para viabilidade celular



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Valor Percentual (%) para Viabilidade Celular de acordo com as concentrações de prata

HACAT – 24H			
GRUPOS CONTROLE	Viabilidade Celular (%)	% prata	VIABILIDADE CELULAR (%)
CONTROLE (SEM AMOSTRA)	100% A	Ag5 (5%)	16,29% C
P	42,30% B	INF-Ag5 (5%)	21,39% C
G	47,13% B	Ag4 (4%)	49,03% B
INF	41,45% B	INF-AG4 (4%)	35,40% BD

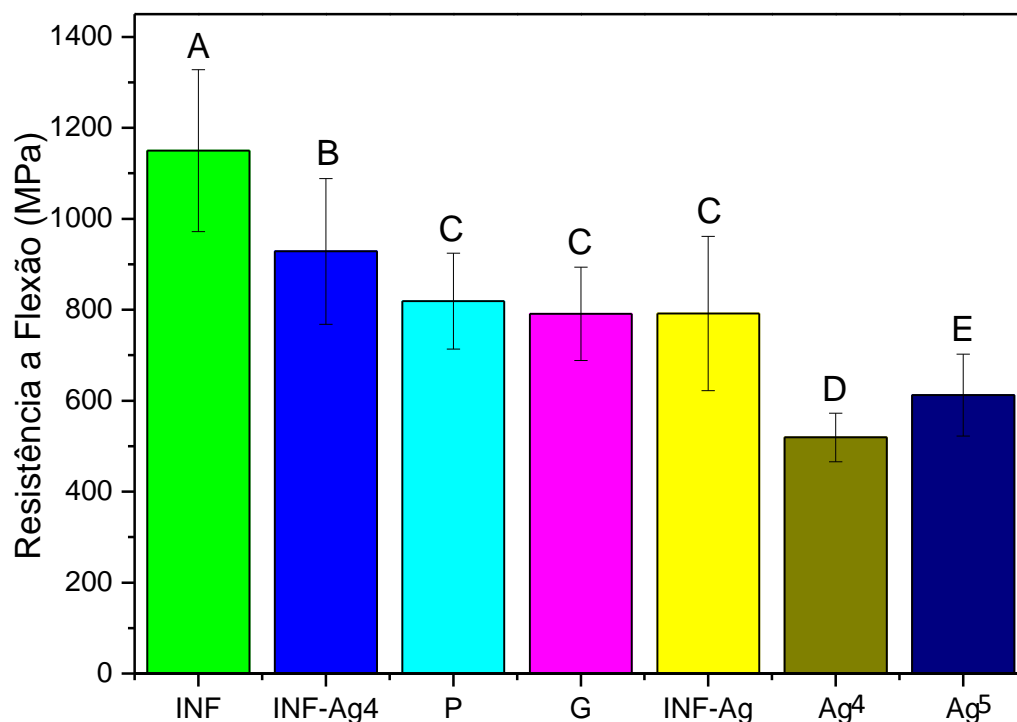
Legenda: Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significante na comparação do parâmetro Viabilidade Celular (%).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Ensaio de resistência à flexão biaxial

Foi realizado ANOVA 1-fator e Teste de Tukey (95%) para comparação dos valores de resistência a flexão. O Teste ANOVA teve $p < 0,005$, demonstrando que foram encontradas diferenças estatisticamente significantes. O grupo que apresentou maior valor em resistência foi o INF, seguido então do grupo INF-Ag4 que se apresentou significativamente menor. Os grupos P; G; INF-Ag5 são estatisticamente semelhantes entre si e possuem valor significativamente menor de resistência que os grupos INF; INF-Ag4;. Seguido, então, do grupo Ag5, significativamente maior que o Ag4, que possui o menor valor significativo de resistência como visto na Figura 27.

Figura 27 – Resistência à Flexão Biaxial em MPa



Fonte: Elaborada pelo autor.

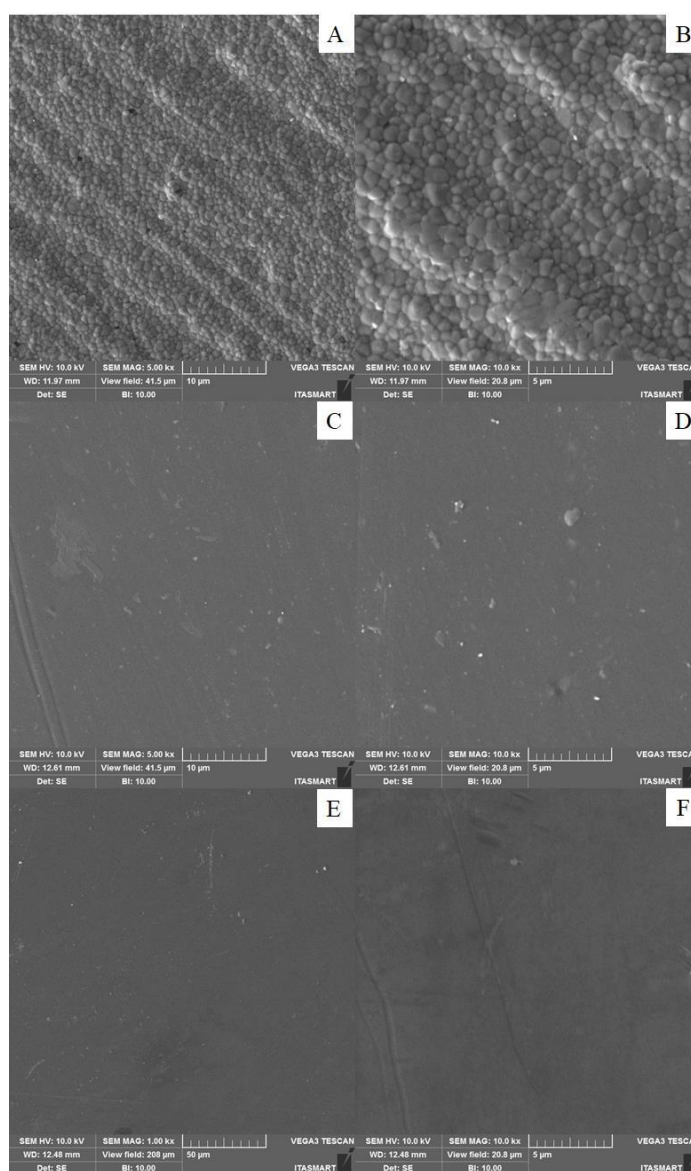
5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Espécimes representativos de cada grupo foram analisados em MEV para visualização das características de superfície das zircônias polida (P); com *glaze* (G); infiltrada com vidro (INF); com prata 5% (Ag5); com prata 4% (Ag4); infiltrada + prata 5% (INF-5); infiltrada + prata 4% (INF-4) como demonstrado na Figura 28.

A figura A e B mostra os grãos de zircônia convencional polida (P) em duas ampliações, apresentando tamanho dos grãos cerca de 700nm e alguns grãos maiores e menores. Na figura C e D estão dispostas as micrografias da zircônia com *glaze* (G), aonde pode ser observado uma superfície lisa e uniforme. Em E e

F, pode-se observar o grupo INF, possuindo características de superfícies semelhantes ao *glaze* devido à infiltração de vidro, lisa e uniforme.

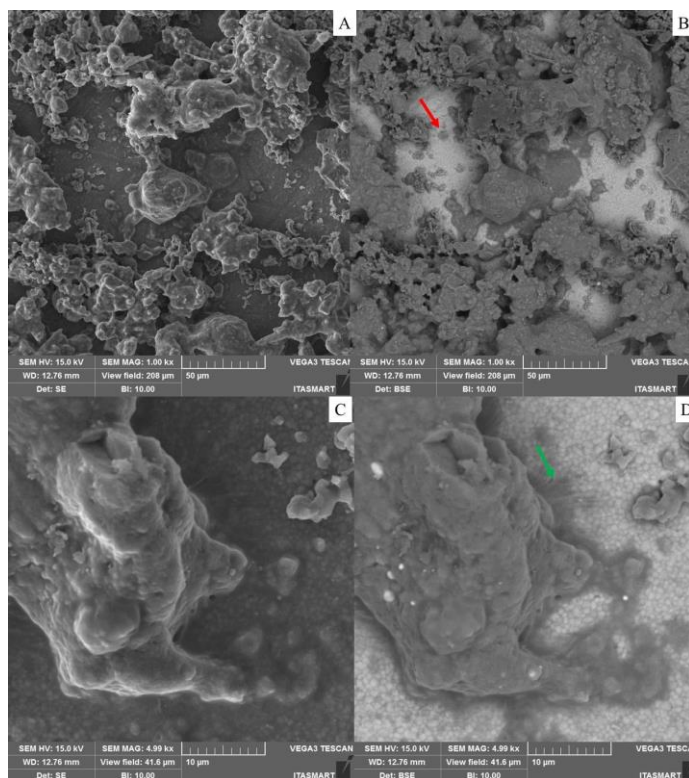
Figura 28 – Micrografias das superfícies da zircônia polida (P), zircônia *glazeada* (G) e zircônia infiltrada por vidro (INF)



Legenda: Magnificações de 50000x (A; C; E) e 10000 (B; D; F).
Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo Ag5 (Figura 29) mostra que o vidro de prata formou uma estrutura mais irregular e porosa, o que favorece a liberação dos íons de prata permitindo sua ação microbiológica por meio da difusão. Observa-se que apesar de irregular, o vidro de prata está ancorado no sistema zircônia-vidro (seta verde). O vidro de prata é aplicado e passa por uma queima a 950°C, como mostrado na seção 4.1, entretanto, a fusão do cristal de combeíta (silicato com maior bioatividade), ocorre acima de 1000 °C; portanto, é possível observar a sua presença no sistema (seta vermelha). Por ser mais porosa, esse grupo (Ag5), apresentou também valores maiores de rugosidade, porém esta característica permitiu a maior exposição e liberação de íons de prata, o que foi demonstrado nos resultados da Seção 5.1, com nenhuma aderência de biofilme de *C. albicans* na superfície e menor aderência de biofilme de *S. mutans*.

Figura 29 – Micrografias das superfícies da zircônia com vidro de prata (Ag5)

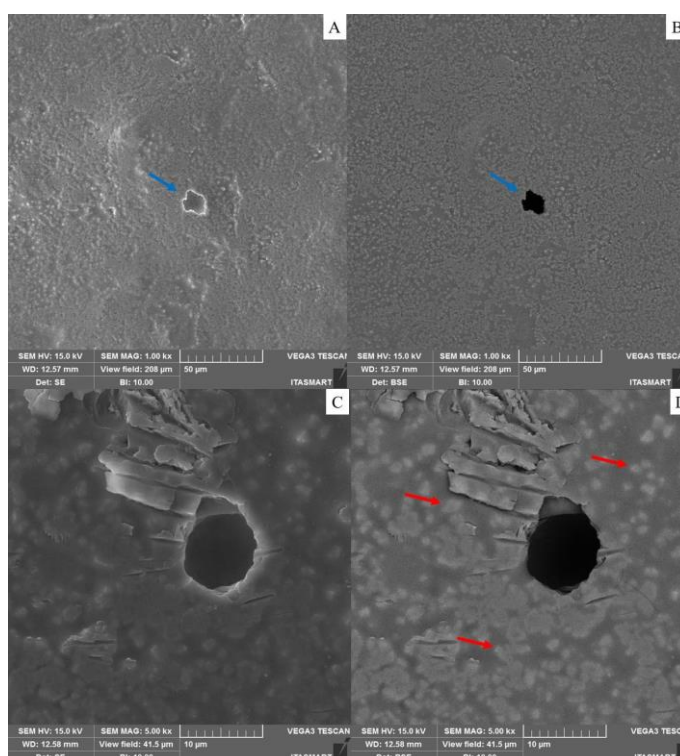


Legenda: Magnificações de 10000x (A; B) e 50000x (C; D). Seta verde indica área de ancoragem do vidro de prata com a zircônia. Imagens A e C foram obtidas usando elétrons secundários e imagens B e D usando elétrons retroespalhados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesta micrografia do grupo Ag4 (Figura 30), é possível observar o defeito crítico (seta azul), o que justifica a menor resistência desse grupo. A combeíta está representada pelos pontos mais claros (seta vermelha).

Figura 30 – Micrografias das superfícies da zircônia com vidro de prata 4% (Ag4)

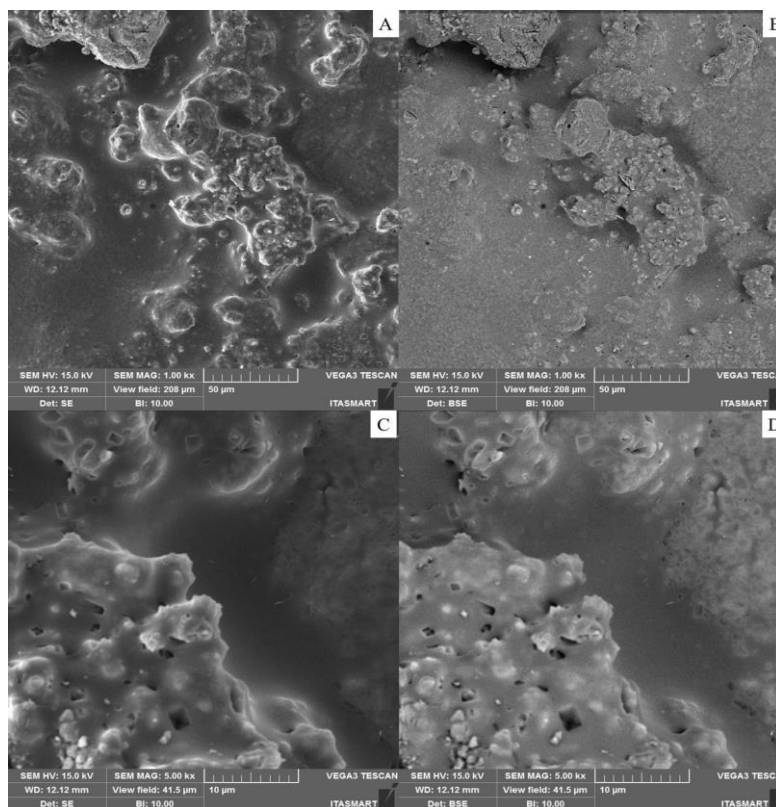


Legenda: Magnificações de 10000x (A; B) e 50000x (C; D). Seta azul indica defeito crítico e setas vermelhas indicam cristais de combeíta. Imagens A e C foram obtidas usando elétrons secundários e imagens B e D usando elétrons retroespalhados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo INF-Ag5 (Figura 31), o vidro de prata está melhor ancorado porque ele se difunde no vidro de infiltração, sendo então menos rugoso.

Figura 31 – Micrografias das superfícies da zircônia infiltrada com vidro + aplicação de vidro de prata 5% (INF-Ag5)

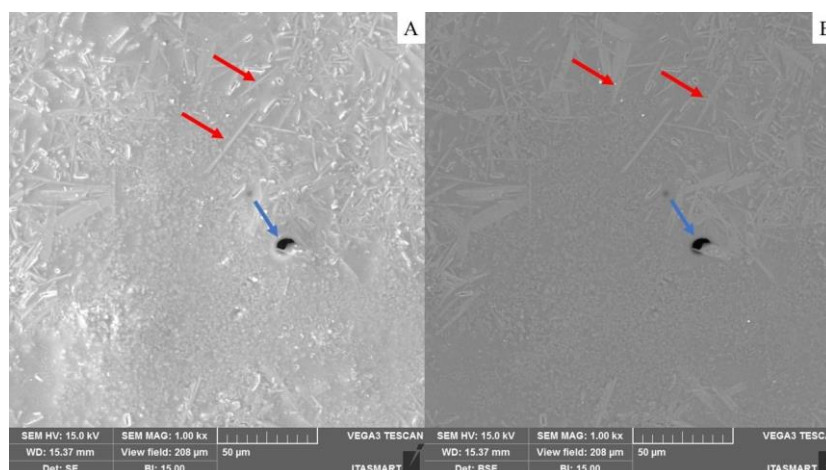


Legenda: Magnificações de 10000x (A; B) e 50000x (C; D). Imagens A e C foram obtidas usando elétrons secundários e imagens B e D usando elétrons retroespalhados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No grupo INF-Ag 4 (Figura 32), também se observa o defeito crítico (seta azul), entretanto ele não está em uma região de máxima tensão de tração, justificando sua maior resistência. Há maior formação de combeíta (setas vermelhas).

Figura 32 – Micrografias das superfícies da zircônia infiltrada com vidro + aplicação de vidro de prata 4% (INF-Ag4)

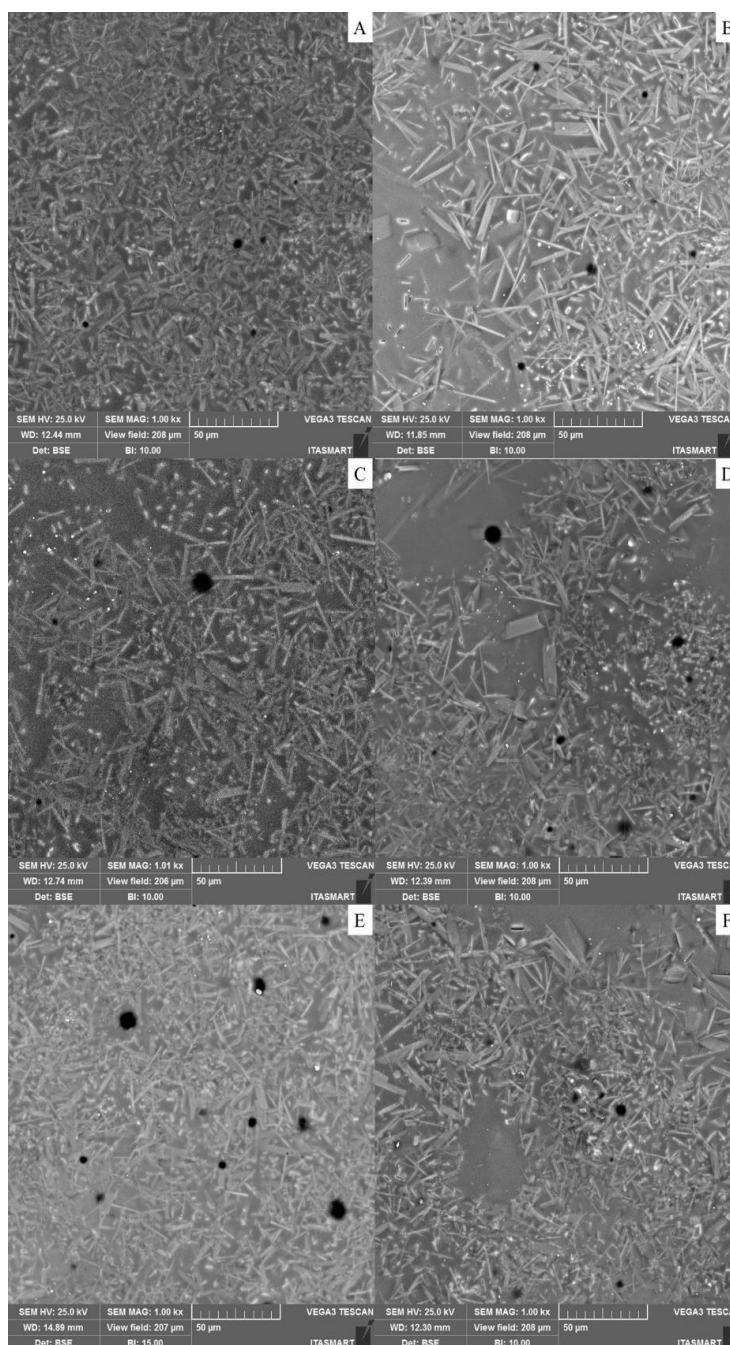


Legenda: Magnificações de 10000x (A; B). Setas azuis indicam defeito crítico e setas vermelhas os cristais de combeíta. Imagens A foi obtida usando elétrons secundários e imagem B usando elétrons retroespalhados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram feitas micrografias das amostras utilizadas no primeiro experimento da seção 5.3.2 (UFC/mL), sendo elas os grupos Ag2,5; INF- Ag2,5; Ag3; INF-Ag3; Ag3,5; INF-Ag 3,5, para caracterizar a estrutura de superfície e avaliar o motivo estrutural para a não liberação de íons de prata. A partir das micrografias (Figura 33) pode-se observar uma maior quantidade dispersa de vidro de *glaze*, entretanto, há menor quantidade de vidro de prata ancorado no sistema; isso se explica devido à menor proporção prata/*glaze* aplicada sobre esses espécimes, não tendo a ação antimicrobiana por meio da difusão dos íons como os grupos Ag5; INF-Ag5; Ag4; INF-Ag4.

Figura 33 – Micrografias das superfícies dos grupos Ag2,5; INF-Ag2,5; Ag3; INF-Ag3; Ag3,5; INF-Ag3,5

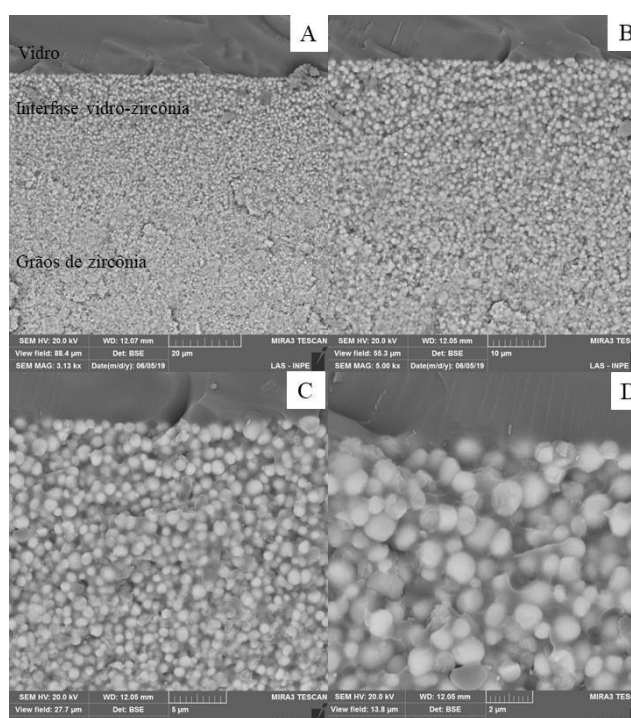


Legenda: Magnificações de 10000x (A; B; C; D; E. F). Todas as imagens foram obtidas usando elétrons retroespalhados. Imagem A: Ag2,5; Imagem B: INF-Ag2,5; Imagem C: Ag3; Imagem D: INF-Ag3; Imagem E: Ag3,5; Imagem F: INF-Ag3,5.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 34 estão dispostas micrografias da secção transversal do grupo INF, em que se pode observar a formação de uma interfase vidro-zircônia. O vidro infiltrado engloba os grãos de zircônia formando um material gradado funcional. Esta característica explica o aumento da resistência apresentada por esse grupo, pois a infiltração com vidro produz um gradiente de módulo elástico que modifica as distribuições de tensões no material durante o ensaio de flexão. Em um material não gradado, a tensão máxima de tração durante esse ensaio se concentra na superfície; já no material com gradação, essa tensão ocorre abaixo da região gradada, tornando-o mais resistente. Essa característica reduz delaminações e lascamentos, melhorando a interface entre zircônia-cerâmica de cobertura, além da formação da interfase vidro-zircônia.

Figura 34- Micrografias da secção transversal do grupo INF

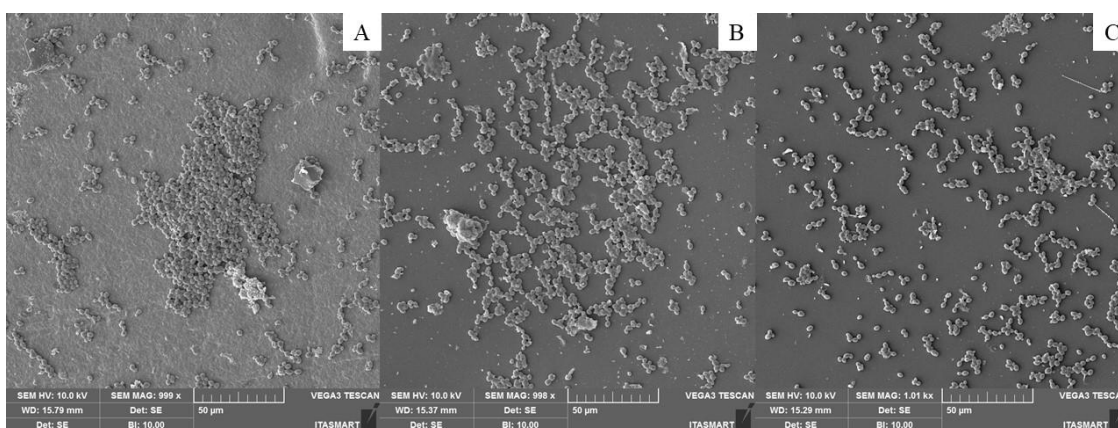


Legenda: Magnificações de 3000 (A); 5000 (B); 10000 (C); 20000 (D). Todas as imagens foram obtidas usando elétrons retroespalhados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Micrografias dos espécimes contaminados com biofilmes homotípicos também foram realizadas. Na Figura 35 estão dispostos os grupos P, G e INF da esquerda para direita contaminados com *C. albicans*, em que qualitativamente apresentam semelhança na concentração de colônias entre si.

Figura 35 – Micrografias das superfícies da zircônia polida (P), zircônia glazeada (G) e zircônia infiltrada por vidro (INF) contaminadas com *C. albicans*



Legenda: Magnificações de 10000 (A; B; C). Imagem A: Grupo P; Imagem B: Grupo G; Imagem C: Grupo INF. Imagens foram obtidas usando elétrons secundários.

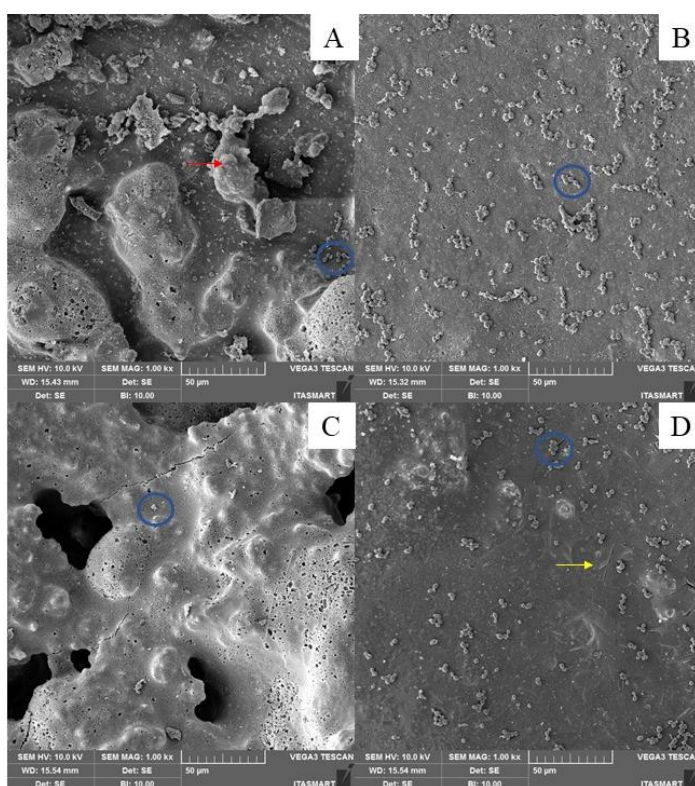
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas micrografias dispostas na Figuras 36 estão representadas as amostras dos grupos contendo prata e contaminadas com *C. albicans*. Em A e C estão os espécimes referentes a Ag 5 e INF-Ag5, e em B e D referentes a Ag4 e INF-Ag4. Em uma análise qualitativa foi possível concluir que há menor quantidade de colônias nas amostras contendo vidro de prata quando comparadas as amostras que não possuem vidro de prata que foram apresentadas anteriormente na Figura 35, o que corrobora com os resultados apresentados na Seção 5.3.1.

Os círculos em azul evidenciam a presença de colônias de *C. albicans*, a seta em vermelho o vidro de prata e em amarelo a presença dos cristais de combeíta.

É possível verificar menor aderência de *C. albicans* nos grupos com maior concentração de prata, sendo eles Ag5 e INF-Ag5 (Figura 36 A e C) do que nos grupos com prata a 4% (Ag4 e INF-Ag4) (Figuras 36 B e D).

Figura 36 – Micrografias das superfícies dos grupos Ag5%; Ag4%; INF-Ag5% e INF-Ag4% contaminadas com *C. albicans*

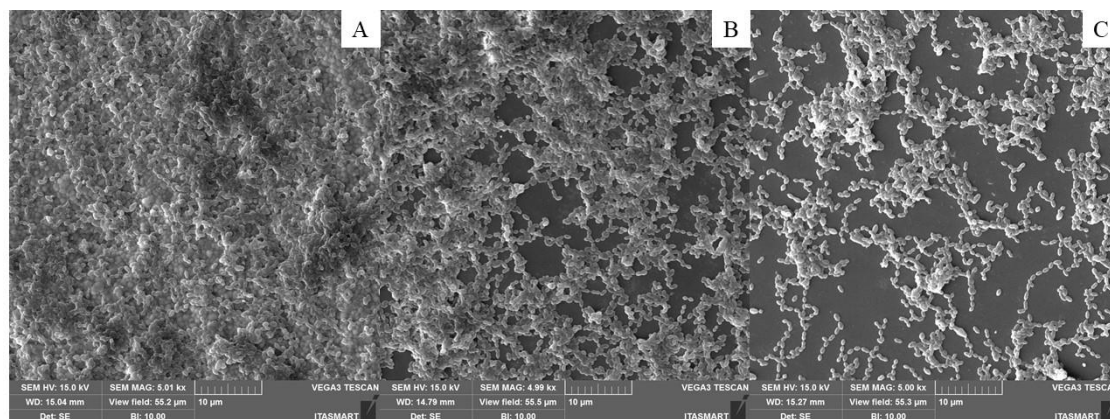


Legenda: Magnificações de 10000 (A; B; C; D). Seta vermelha indica o vidro com prata, círculo azul as colônias de *C. albicans* e seta amarela os cristais de combeíta. Imagens foram obtidas usando elétrons secundários.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras sem vidro de prata (P; G e INF) contaminadas com *S. mutans* também apresentaram crescimento de colônias qualitativamente parecidas entre si, como visto na Figura 37.

Figura 37 – Micrografias das superfícies dos grupos P; G e INF contaminadas com *S. mutans*

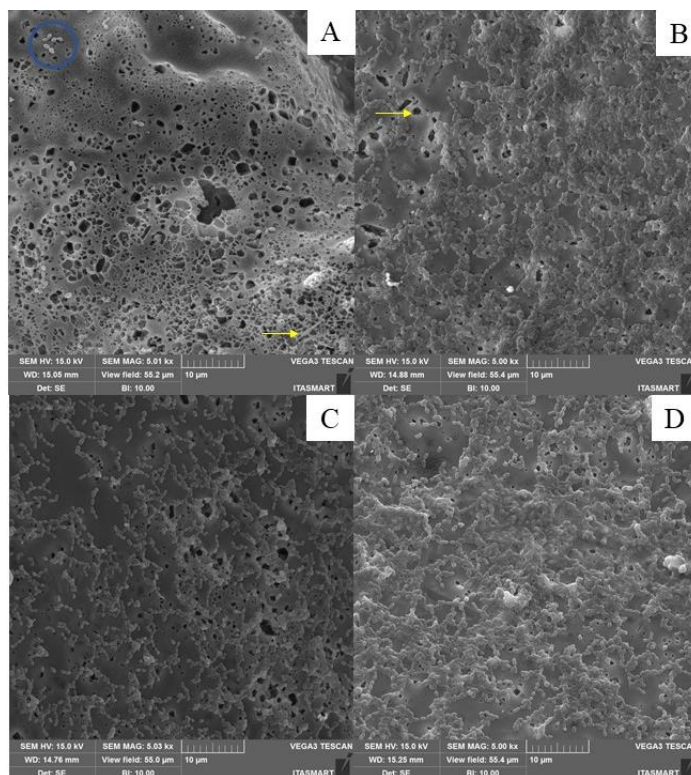


Legenda: Magnificações de 5000 (A; B; C). Imagem A: Grupo P; Imagem B: Grupo G; Imagem C: Grupo INF. Imagens foram obtidas utilizando elétrons secundários.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já nas micrografias apresentadas na Figura 38, observa-se uma menor adesão superficial de colônias de *S. mutans* no grupo Ag5 (Figura 38 A) quando comparado as micrografias dos grupos sem vidro de prata (Figura 37) e aos demais grupos com prata INF-Ag5; Ag4 e INF-Ag4, o que pode ser explicado pela maior proporção de prata presente no Ag5 e maior lisura presente nas amostras infiltradas por vidro antes da sinterização (INF-Ag5 e INF-Ag4).

Figura 38 – Micrografias das superfícies dos grupos Ag5; Ag4; INF-Ag5 e INF-Ag4 contaminadas com *S. mutans*

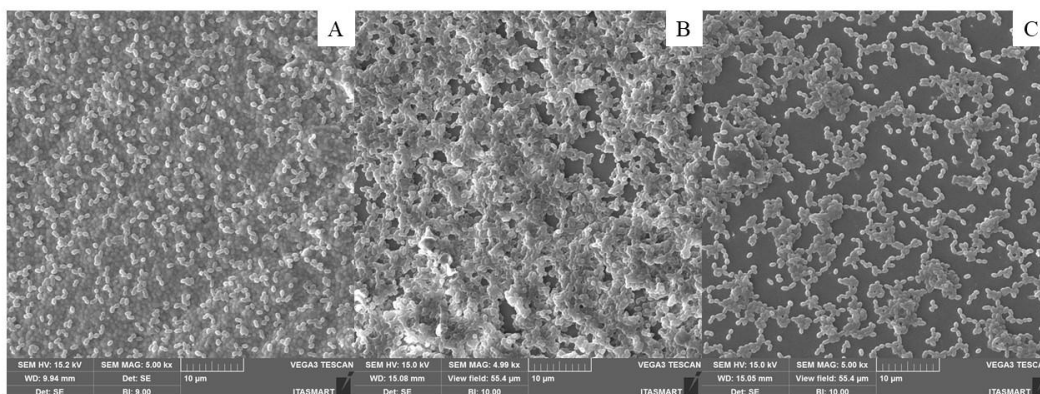


Legenda: Magnificações de 5000 (A; B; C). O círculo azul representa as colônias de *S. mutans* e a seta amarela os cristais de combeíta. Imagens foram obtidas usando elétrons secundários.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Figuras 39 e 40 estão dispostas micrografias das amostras contaminadas por *S. sanguinis*. Em nenhum dos grupos contendo vidro de prata se observou menor crescimento de colônias qualitativamente em comparação aos grupos sem vidro de prata, o que corrobora com os achados quantitativos exemplificados na Seção 5.3.1.

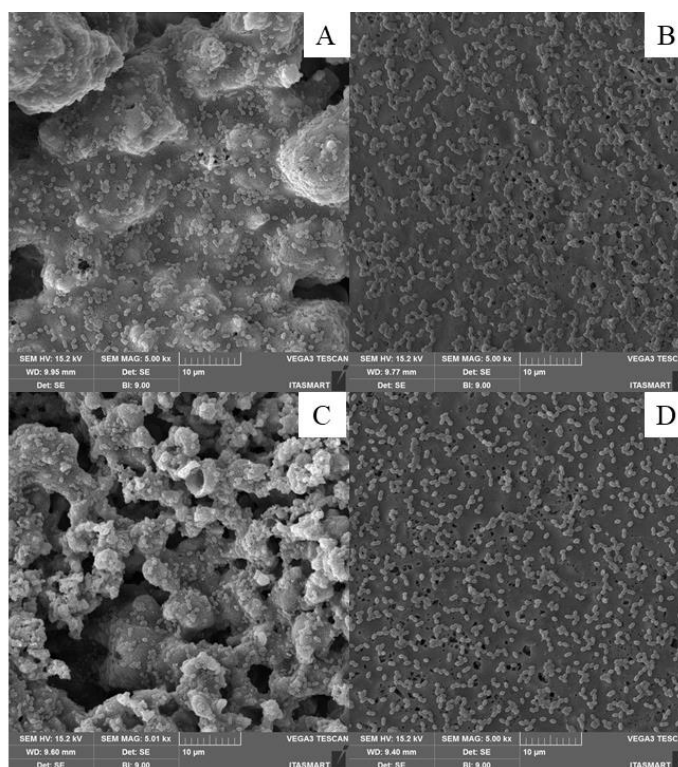
Figura 39 – Micrografias das superfícies dos grupos P; G e INF contaminadas com *S. sanguinis*



Legenda: Magnificações de 5000 (A; B; C). Imagem A: Grupo P; Imagem B: Grupo G; Imagem C: Grupo INF. Imagens foram obtidas utilizando elétrons secundários.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 40 – Micrografias das superfícies dos grupos Ag5; Ag4; INF-Ag5 e INF-Ag4 contaminadas com *S. sanguinis*

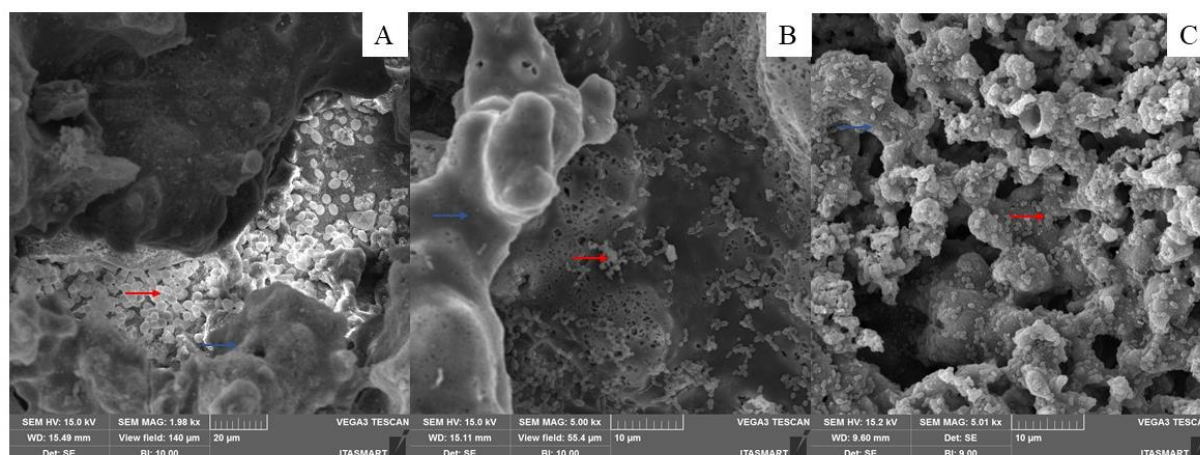


Legenda: Magnificações de 5000 (A; B; C; D). Imagem A: Grupo Ag5; Imagem B: Grupo Ag4; Imagem C: INF-Ag5; Imagem D: INF-Ag4. Imagens foram obtidas utilizando elétrons secundários.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 41 estão apresentadas três micrografias do grupo Ag5 contaminadas com *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis*. É possível observar que nos defeitos internos do material, especificamente entre o vidro de prata e os grãos de zircônia houve crescimento de colônias dos microrganismos. Esses defeitos estão associados aos altos valores de rugosidades apresentados na Seção 5.1 e seu tamanho sobrepõe o tamanho das colônias, permitindo que haja crescimento dentro do defeito. Essas irregularidades podem ter favorecido a alta formação de colônias em alguns grupos, mesmo contendo prata.

Figura 41 – Micrografias das superfícies do grupo Ag5 contaminado com *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis*



Legenda: Magnificações de 1000 (A) e 5000 (B; C). Imagem A: Grupo Ag5 contaminado com *C. albicans*; Imagem B: Grupo Ag5 contaminado com *S. mutans*; Imagem C: Ag5 contaminado com *S. sanguinis*. Imagens foram obtidas utilizando elétrons secundários.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como um dos objetivos o desenvolvimento de um vidro baseado no vidro de Guldiren et al. (2017), seguindo os mesmos conceitos já descritos por Zhang, Kim (2009). A inovação proposta foi a incorporação de prata, um íon nocivo a microrganismos, no vidro para aplicação na zircônia monolítica e a partir disso, avaliar sua interação entre propriedades de superfície, formação de biofilme e viabilidade de queratinócitos humanos.

A formação de biofilme na cavidade bucal é um processo gradual e complexo que requer diversas etapas. O biofilme se trata de estruturas tridimensionais de cepas bacterianas que ancoram em superfícies sólidas como dentes, implantes e raízes. O mesmo possui um importante papel em doenças bucais, sendo a principal a cárie dental (Krzyściak et al., 2014). Nesse sentido, a evolução de materiais para uso odontológico capazes de inibir o desenvolvimento do biofilme tem um âmbito meritório no controle de doenças como: cárie, periodontite, peri-implantite etc. A utilização desse material em *abutments*, implantes, parafusos de implantes, braquetes ortodônticos, coroas totais e restaurações parciais podem ser de extrema importância na evolução de um bom prognóstico do tratamento restaurador, evitando recidiva da doença cárie e patologias periodontais.

Biomateriais com atividades antimicrobianas à base de prata surgiram no intuito de promover inibição microbiológica eficaz e, em determinada concentração, não tóxica para as células humanas (Mijnendonckx et al., 2013). Conforme estudo de Vale et al. (2019), em que foram analisado nanopartículas de biovidro contendo prata, suas propriedades foram promissoras e poderiam ser utilizadas na área biomédica para aplicações odontológicas.

A atividade antimicrobiana da prata se dá devido à liberação iônica (Agnihotri et al., 2013). Os íons de prata são conservados em seu estado iônico na

estrutura do vidro e são facilmente movidos no meio aquoso a partir da troca com íons H^+ e H_2O da água ou ambiente úmido (Borrelli et al., 2015), o que justifica a hipótese do presente estudo em que o vidro de prata incorporado à zircônia para utilização como material restaurador odontológico poderia ter efeito antimicrobiano. Outro mecanismo atribuído à sua atividade antibacteriana se dá pela interação dos íons de prata com proteínas superficiais das células microbianas, levando à interrupção da respiração e conseqüentemente, morte celular (Mijnendonckx et al., 2013). A prata também age no rompimento da membrana celular bacteriana e posterior invasão no citoplasma, interferindo no núcleo da célula (Eckhardt et al., 2013).

Diversos estudos já demonstraram a atividade da prata contra microrganismos como *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, etc (Guldiren, Aydin, 2017; Vale et al., 2019). No estudo atual foram selecionados para os testes biofilme homotípico com *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis*. O *S. mutans* possui uma alta capacidade de formação de biofilme inicial isoladamente (Tamura et al., 2009) que pode ser estimulada por proteínas salivares (Ahn et al., 2008) e *S. sanguinis* é um componente da flora fisiológica (Krzyściak et al., 2014). Já *C. albicans* foi escolhido por ser um fungo patógeno envolvido em infecções orais oportunistas (Metwalli et al., 2013); estudos evidenciam a interação entre *C. albicans* e *S. mutans* em biofilmes dentais mostrando que essa coadesão é essencial para o desenvolvimento da doença cárie (Jarosz et al., 2009).

Os achados qualitativos do MEV corroboram com os dados de rugosidade, em que os grupos Ag5; INF-Ag5, Ag4 e INF-Ag4 apresentaram maior altura média absoluta das irregularidades ao longo do perfil (R_a). A rugosidade superficial influencia no acúmulo de biofilme (Anami et al., 2012) e é formado em maior quantidade, amadurecendo mais cedo em superfícies ásperas (Quirynen et al., 1993). Apesar da literatura demonstrar relação direta entre o parâmetro R_a e valores de adesão bacteriana (Aykent et al., 2010), o presente estudo não seguiu

essa correlação, pois ainda que o grupo Ag5 tenha a rugosidade média mais alta entre os grupos testados, ele se mostrou o mais efetivo contra a formação de colônias de *C. albicans* e *S. mutans*, o que pode ser justificado pelo alto efeito antimicrobiano do vidro de prata através da sua liberação iônica (Guldiren, Aydın, 2017). Os presentes achados corroboram com estudo de Poggio (2009) que salientou que a rugosidade do material não foi a principal razão para adesão de *S. mutans*. Isso pode ser explicado devido à ausência de proteínas salivares no teste *in vitro* já que em superfícies rugosas há maior acúmulo de saliva e conseqüentemente mais bactéria (Montanaro et al., 2004).

Além da rugosidade, outras propriedades superficiais como molhabilidade e energia livre superficial (ELS) influenciam na adesão bacteriana (Dal Piva et al., 2018). Estudos sugerem que superfícies com baixa ELS tenderiam a ter menor aderência bacteriana do que superfícies com maiores valores de ELS (De Avila et al., 2016; Poggio et al., 2009), entretanto, no presente trabalho o grupo Ag5 apresentou maior valor de ELS mesmo obtendo menor aderência bacteriana de *C. albicans* e *S. mutans*. Isso pode ser elucidado pela liberação iônica da prata (Guldiren, Aydın, 2017) que inibiu a formação de colônias mesmo em amostras com valores mais altos de ELS e rugosidade.

Os resultados apresentados no estudo mostraram que todos os grupos possuem um comportamento parcialmente hidrofílico por exibirem valores de contato médio maior que 0 e menor que 180 (Shirtcliffe et al., 2010), o que dificulta o contato direto entre o material e o microrganismo devido à presença de uma película de água entre os dois (Dal Piva et al., 2018). Outra propriedade de superfície como a composição química do material pode influenciar também na correlação entre adesão bacteriana e ELS, além disso, estudos simulando as condições clínicas são necessários, pois a presença de saliva recobrando o material restaurador leva à formação da película adquirida e favorece o desenvolvimento do biofilme (De Avila et al., 2016).

O estudo feito por Guldiren, Aydin (2017) mostrou que amostras tratadas em meio iônico com prata inibiram o crescimento de *C. albicans* em um contato de 24h, o que corrobora com os achados do presente estudo em que os grupos Ag5, INF-Ag5, Ag4 e INF-Ag4 tiveram a formação de biofilme de *C. albicans* significativamente menor quando comparados aos grupos sem prata. A *C. albicans* tem a capacidade de alternar sua morfologia entre as formas de levedura e hifa (Metwalli et al., 2013); essa modificação contribui para sua patogenicidade.

Os resultados da UFC/mL com *S. mutans* mostraram que o Ag5 teve efeito inibitório no número de células viáveis de *S. mutans*, embora seja o grupo com maior valor de rugosidade superficial. Esse resultado corrobora com Poggio et al. (2009) e Eick et al., (2004) que não encontraram correlação entre rugosidade superficial e crescimento de colônias de *S. mutans* em materiais restauradores. Entretanto, outros estudos mostraram que a rugosidade superficial tem como consequência maior quantidade de bactéria devido acúmulo maior de saliva (Montanaro et al., 2004).

Os *Streptococcus* possuem estruturas denominadas de longos filamentos que exibem elevada propriedade adesiva e são fundamentais para formação de biofilme (Krzyściak et al., 2014); essa característica pode desvendar o motivo da não eficiência da prata contra o *S. sanguinis* e a inibição do crescimento do *S. mutans* ter sido alcançada apenas com a maior concentração de prata apresentada no estudo. Outro fundamento para o vidro de prata possuir maior efeito inibitório contra *C. albicans* do que contra os *Streptococcus* pode ser explicado por uma maior facilidade de adesão do *Streptococcus* a superfícies em gerais, até mesmo as mais lisas (Yuan et al., 2016) devido à produção de uma substância insolúvel em água que é um facilitador da união do microrganismo ao substrato (Mukasa, Slade, 1973).

Estudo *in vitro* realizado por Vale et al. (2019) testaram atividade antimicrobiana por meio de halo de inibição contra *E. coli* e *S. aureus* e obteve

zona inibitória em torno do biovidro com prata relativamente pequena. Este fato, segundo Vale et al. (2019), pode estar relacionado com o mecanismo de difusão controlada que descreve uma menor taxa de liberação de Ag⁺ liberadas da matriz do biovidro, devido à maior eletronegatividade do íon prata e, conseqüentemente, a forte ligação covalente Ag-O na estrutura do vidro (Kozon et al., 2016).

Também foi constatada a presença da combeíta no vidro de prata, um silicato com elevada bioatividade que é formado quando a temperatura de calcinação do vidro é cerca de 1000°C (Zheng et al., 2015). Essa bioatividade da combeíta (Spirandeli et al., 2020) pode também ter auxiliado na inibição do crescimento de microrganismos nos grupos testados.

A prata pode ter efeito tóxico, portanto, sua concentração tem importância crítica para as células humanas (Guldiren, Aydın, 2017). Pensando na toxicidade, foi feito o primeiro teste de UFC/mL com concentrações crescentes da prata no vidro para que fosse definido qual menor concentração de prata produziria efeito antimicrobiano se assemelhando ao teste de concentração inibitória mínima. A partir desse teste foram estabelecidas as concentrações de 5% e 4% de prata com segurança. A prata possui liberação gradual de longo prazo (Krzyściak et al., 2014) e isso pode limitar seu efeito tóxico celular.

Os resultados do ensaio MTT indicaram que as células HaCaT em contato precoce (24 horas) com o Ag5 e INF-Ag5 causam danos suficientes para caracterizá-los como materiais citotóxicos, porém os grupos Ag4 e INF-Ag4, apesar de apresentar viabilidade celular inferior a 50% após 24 horas, apresentou estatisticamente citotoxicidade semelhante ao grupo P, G e INF. O grupo G representa um *glaze* comercial já consolidado no mercado odontológico com amplo uso clínico, sugerindo que, em um teste a longo prazo, o tratamento com 4% de prata resultaria em menor citotoxicidade do que o *glaze* comercial. Outra visão é que um contato precoce de 24h entre as células e os materiais pode não promover tempo o suficiente para o crescimento das células e o desenvolvimento

de seus mecanismos de defesa contra o material (De Deus et al., 2005).

No presente trabalho foi utilizado um vidro de infiltração produzido através do método sol-gel com propriedades semelhantes ao produzido por Zhang, Kim (2009), no entanto, o vidro é aplicado na zircônia não sinterizada por meio de pó e líquido seguido de uma queima a 1550 °C por 2 h, o que difere da metodologia de Zhang, Kim (2009) em que as amostras são fabricadas a partir de discos pré sinterizados (1400 °C por 1 h) seguidas por infiltração e sinterização do vidro a 1450 °C por 2 h. Tanto o vidro produzido por Campos (2021) como o de Zhang, Kim (2009) formam uma gradação do material iniciando na camada de vidro superficial, seguido por uma interfase vidro-zircônia e um *bulk* de zircônia densa. Essa gradação eleva a resistência à flexão do material infiltrado quando comparada à zircônia homogênea como visto no presente trabalho, em que o grupo INF apresentou maiores valores de resistência em MPa do que os demais grupos, corroborando com os achados de Zhang, Kim (2009) e Campos (2021). Esse mecanismo pode ser explicado pela infiltração do vidro nos defeitos inerentes da Y-TZP, o que não ocorre na Y-TZP sem vidro. Ademais, a infiltração do vidro na zircônia mais porosa, antes da sinterização, permite uma maior interação entre o vidro e os grãos de zircônia tornando os materiais mais compatíveis.

No estudo em questão, o grupo INF apresentou o maior valor de resistência à flexão em MPa (acima de 1500 MPa) dentre os demais grupos, seguido do INF-Ag4 que exibiu valores acima de 900 MPa, revelando que, apesar da incorporação da prata 4%, o grupo INF-Ag4 é mais resistente do que o grupo P (zircônia monolítica polida) e G (*glaze* comercial). O grupo INF-Ag5 obteve semelhança significativa com P e G, o que é vantajoso pois o grupo teste se equipara aos grupos controles que já são de amplo uso clínico no mercado odontológico. O Ag4 e Ag5 foram os menos resistentes, todavia apesar dessa queda de resistência, os mesmos mostraram valores acima de 500 MPa, o que em uma situação clínica

leva a um bom prognóstico restaurador em pacientes sem parafunção. Esses resultados demonstram que lançar mão da infiltração na zircônia pré sinterizada seguido da aplicação do vidro de prata na amostra já sinterizada é uma maneira de compensar os defeitos criados pela aplicação da prata no material.

Além disso, Zhang et al. (2012) mostraram que a resistência à fratura por lascamento da zircônia infiltrada por vidro é maior do que para zircônias com aplicação de cerâmica de cobertura e semelhante às zircônias não graduadas, o que suprime uma das desvantagens principais da zircônia que é o lascamento ou *chipping* da cerâmica de cobertura devido à diferença de coeficiente de expansão térmica entre os materiais. Em relação à estética, embora não tão boa quanto a da cerâmica por estratificação, a infiltração oferece melhorias pois a composição do vidro pode ser controlada, sendo, portanto, superiores à zircônia pura (Zhang et al., 2012). A camada de vidro de infiltração no interior de um material policristalino denso permite ajustar suas propriedades ópticas (Zhang, Kim, 2009). Ainda, o vidro de prata que é aplicado na zircônia sinterizada não mostrou alteração de cor significativa como no estudo de Mohsen, Abu-Eittah (2015). O vidro residual encontrado na superfície também promoveu a vantagem de impedir a absorção de água e prevenir a DBT da Y-TZP (Campos et al., 2016; Ramos et al., 2019).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados foi possível produzir um material gradado à base de zircônia e vidro com método sol-gel e com adição de prata, sendo efetivo na inibição da formação de biofilme de *C. albicans* e *S. mutans* mesmo tendo apresentado maior valor de rugosidade e ELS. A zircônia produzida com o vidro com prata 4% foi mais promissora para uma possível utilização na clínica odontológica, pois se apresentou com satisfatória resistência à flexão, se comportando melhor do que a zircônia polida ou com *glaze* comercial, além de ser efetiva contra *C. albicans* e ter viabilidade celular semelhante ao grupo controle.

REFERÊNCIA*

Abdallah RM, Emera RMK, Gebreil AS. Antimicrobial activity of silver nanoparticles. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2015;5(2):447–51.

Agnihotri S, Mukherji Soumyo, Mukherji Suparna. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale*. 2013;5(16):7328–40. doi: 10.1039/c3nr00024a. PMID: 23821237.

Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4259-68. doi: 10.1128/IAI.00422-08. Epub 2008 Jul 14. PMID: 18625741; PMCID: PMC2519434.

Ammar Y, Swailes D, Bridgens B, Chen J. Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. *Surf Coat Technol*. 2015;284:410–6.

Anami LC, Pereira CA, Guerra E, E Souza RODA, Jorge AOC, Bottino MA. Morphology and bacterial colonisation of tooth/ceramic restoration interface after different cement excess removal techniques. *J Dent*. 2012;40(9):742–9. doi: 10.1016/j.jdent.2012.05.005.

Asharani PV, Mun KLG, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279–90.

De Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DMP, De Assis Mollo F. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*. 2016;115(4):428–36. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.09.016. PMID: 26597465.

Aykent F, Yondem I, Ozyesil AG, Gunal SK, Avunduk MC, Ozkan S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *J Prosthet Dent*. 2010;103(4):221–7. doi: 10.1016/S0022-3913(10)60034-0. PMID: 20362765.

Bapat RA, Chaubal T V, Joshi CP, Bapat PR, Choudhury H, Pandey M, et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater Sci Eng C*. 2018;91(2017):881–98. doi: 10.1016/j.msec.2018.05.069

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htmlhtml

Bohidar SK, Sharma R, Mishra PR. Functionally graded materials: a critical review. *Int J Res.* 2014;1(7):289–301.

Borrelli NF, Senaratne W, Wei Y, Petzold O. Physics and chemistry of antimicrobial behavior of ion-exchanged silver in glass. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(4):2195–201. doi: 10.1021/am508159z. PMID: 25562105.

Campos TMB, Ramos NC, Machado JPB, Bottino MA, Souza ROA, Melo RM. A new silica-infiltrated Y-TZP obtained by the sol-gel method. *J Dent.* 2016;48:55–61. doi: 10.1016/j.jdent.2016.03.004.

Campos TMB, Marques RMM, Ribeiro AOP, Montanheiro LAT, Silva AC, Thim GP. Microstructure and mechanical properties of fully sintered zirconia glazed with an experimental glass. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021;113:104093. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104093. PMID: 33022517.

Cherif A Mohsen, Manal R. Abu-Eittah RMMH. Effect of silver nanoparticles and silver hydroxyapatite nanoparticles on color and fracture strength of dental ceramic. *Rep Opin.* 2015;13(3):1576–80.

Dal Piva AMO, Contreras LPC, Ribeiro FC, Anami LC, Camargo SEA, Jorge AOC, et al. Monolithic ceramics: effect of finishing techniques on surface properties, bacterial adhesion and cell viability. *Oper Dent.* 2018;43(3):315–25. doi: 10.2341/17-011-L.

De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005;38(9):604–9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00987.x. PMID: 16104973.

Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem Rev.* 2013;113(7):4708–54. doi: 10.1021/cr300288v. PMID: 23488929.

Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil.* 2004;31(3):278–85. doi: 10.1046/j.0305-182X.2003.01233.x. PMID: 15025662.

Fiori MA, Paula MM da S, Bernardin AM, Riella HG, Angioletto E. Bactericide glasses developed by Na⁺/Ag⁺ ionic exchange. *Mater Sci Eng C.* 2009;29(5):1569–73. doi: 10.1016/j.msec.2008.12.014.

García-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejía-Rubalcava C, Jiménez-Martínez R, Cuevas-Guajardo S, Sánchez-Reyna PA, et al. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J*. 2011;61(6):297–301. doi: 10.1111/j.1875-595X.2011.00072.x.

Guldiren D, Aydın S. Antimicrobial property of silver, silver-zinc and silver-copper incorporated soda lime glass prepared by ion exchange. *Mater Sci Eng C*. 2017;78:826–32. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.134.

Jarosz LM, Deng DM, Van Der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 2009;8(11):1658–64. doi: 10.1128/EC.00070-09. PMID: 19717744.

Katakam S, Siva Rama Krishna D, Sampath Kumar TS. Microwave processing of functionally graded bioactive materials. *Mater Lett*. 2003;57(18):2716–21. doi: 10.1016/S0167-577X(02)01364-2.

Kozon D, Zheng K, Boccardi E, Liu Y, Liverani L, Boccaccini AR. Synthesis of monodispersed Ag-doped bioactive glass nanoparticles via surface modification. *Materials (Basel)*. 2016 Mar 24;9(4):225. doi: 10.3390/ma9040225. PMID: 28773349; PMCID: PMC5502798.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499–515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. PMID: 24154653.

Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett Appl Microbiol*. 1997;25(4):279–83. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00219.x.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLOS Pathog*. 2013;9(10):e1003616. doi: 10.1371/journal.ppat.1003616. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24146611; PMCID: PMC3798555.

Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S, Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *BioMetals*. 2013;26(4):609–21. doi: 10.1007/s10534-013-9645-z.

- Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, et al. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*. 2004;25(18):4457–63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.031. PMID: 15046936.
- Mukasa H, Slade HD. Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect Immun*. 1973;8(4):555–62. doi: 10.1128/iai.8.4.555-562.1973. PMID: 4582634.
- Örtorp A, Kihl ML, Carlsson GE. A 3-year retrospective and clinical follow-up study of zirconia single crowns performed in a private practice. *J Dent*. 2009;37(9):731–6. doi: 10.1016/j.jdent.2009.06.002.
- Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. *Int J Artif Organs*. 2009;32(9):671–7. doi: 10.1177/039139880903200917. PMID: 19882549.
- Quirynen M, Bollen CML, Schotte A, Marechal M, van Steenberghe D, van der Mei HC, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993;72(9):1304–9. doi: 10.1177/00220345930720090801. PMID: 8395545.
- Ramos NC, Kaizer MR, Campos TMB, Kim J, Zhang Y, Melo RM. Silica-based infiltrations for enhanced zirconia-resin interface toughness. *J Dent Res*. 2019;98(4):423–9. doi: 10.1177/0022034518819477.
- Shi GM, Han JK, Zhang ZD, Song HY, Lee BT. Pretreatment effect on the synthesis of Ag-coated Al₂O₃ powders by electroless deposition process. *Surf Coatings Technol*. 2005;195(2–3):333–7. doi: 10.1016/j.surfcoat.2004.08.186.
- Shirtcliffe NJ, McHale G, Atherton S, Newton MI. An introduction to superhydrophobicity. *Adv Colloid Interface Sci*. 2010;161(1–2):124–38. doi: 10.1016/j.cis.2009.11.001.
- Souza JCM, Mota RRC, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CAM, Magini RS. Biofilm formation on different materials used in oral rehabilitation. *Braz Dent J*. 2016;27(2):141–7. doi: 10.1590/0103-6440201600625.
- Spirandeli BR, Campos TMB, Ribas RG, Thim GP, Trichês E de S. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceram Int*. 2020;46(12):20264–71. doi:

10.1016/j.ceramint.2020.05.108.

Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(2):152–61. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00489.x. PMID: 19239643.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2:68-81. doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x. PMID: 16968383.

Vagropoulou GI, Klifopoulou GL, Vlahou SG, Hirayama H, Michalakis K. Complications and survival rates of inlays and onlays vs complete coverage restorations: a systematic review and analysis of studies. *J Oral Rehabil*. 2018;45(11):903–20. doi: 10.1111/joor.12695. PMID: 30019391

Vale AC, Pereira PR, Barbosa AM, Torrado E, Alves NM. Optimization of silver-containing bioglass nanoparticles envisaging biomedical applications. *Mater Sci Eng C*. 2019;94:161–8. doi: 10.1016/j.msec.2018.09.027. PMID: 30423697.

Yuan C, Wang X, Gao X, Chen F, Liang X, Li D. Effects of surface properties of polymer-based restorative materials on early adhesion of *Streptococcus mutans* in vitro. *J Dent*. 2016;54:33–40. doi: 10.1016/j.jdent.2016.07.010. PMID: 27452343.

Zhang Y, Chai H, Lee JJW, Lawn BR. Chipping resistance of graded zirconia ceramics for dental crowns. *J Dent Res*. 2012;91(3):311–5. doi: 10.1177/0022034511434356. PMID: 22232142.

Zhang Y, Kim JW. Graded structures for damage resistant and aesthetic all-ceramic restorations. *Dent Mater*. 2009;25(6):781–90. doi: 10.1016/j.dental.2009.01.002. PMID: 19187955.

Zheng K, Solodovnyk A, Li W, Goudouri OM, Stähli C, Nazhat SN, et al. Aging time and temperature effects on the structure and bioactivity of gel-derived 45S5 glass-ceramics. *J Am Ceram Soc*. 2015;98(1):30–8. doi: 10.1111/jace.13258.