



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus São José dos Campos

**ALINE SCALONE BRENTEL**

**EFEITO DO SISTEMA DE ACABAMENTO E POLIMENTO :  
rugosidade superficial e formação in situ de biofilme  
dentário inicial em uma cerâmica feldspática micro-  
particulada**



2008

**ALINE SCALONE BRENTEL**

**EFEITO DO SISTEMA DE ACABAMENTO E POLIMENTO NA  
RUGOSIDADE SUPERFICIAL E FORMAÇÃO IN SITU DE  
BIOFILME DENTÁRIO INICIAL EM UMA CERÂMICA  
FELDSPÁTICA MICRO-PARTICULADA**

Dissertação apresentada à Faculdade Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Prótese.

**Orientador Prof.Tit. Marco Antonio Bottino**

**São José dos Campos**

**2008**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com: Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2008

B752e Brentel, Aline Scalone.

Efeito do sistema de acabamento e polimento na rugosidade superficial e formação in situ de biofilme dentário inicial em cerâmica feldspática micro-particulada / Aline Scalone Brentel. \_\_ São José dos Campos : [s.n.]; 2008  
xx.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Bottino

1.Placa dentária. 2. Cerâmica. 3. Polimento dentário. I. Bottino, Marco Antonio. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD15

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 03 de dezembro de 2008 .

Assinatura :

E-mail: [asbrentel@yahoo.com.br](mailto:asbrentel@yahoo.com.br)

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof.Tit Marco Antonio Bottino**

Faculdade de Odontologia São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

**Prof.<sup>a</sup>.Tit Regina Maria Puppim Rontani**

Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Universidade de Campinas - UNICAMP

**Prof.Dr.Carlos Augusto Pavanelli**

Faculdade de Odontologia São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 10 de Outubro de 2008.

## DEDICATÓRIA

A **Deus**, por me fortalecer nos difíceis obstáculos encontrados nesta caminhada e me indicar os passos certos a serem dados nesta etapa de crescimento pessoal e profissional...

Aos meus pais **Maria Aparecida e Homero Brentel**, que estiveram sempre me acolhendo nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por estarem sempre do meu lado nessa jornada, onde encontrei muitas dificuldades. Meu eterno agradecimento pelo apoio e compreensão. Dedico essa grande conquista da minha vida a vocês.

A minha irmã, **Thaís**, pelo carinho, amor e incentivo na realização dos meus objetivos.

Aos meus tios **Silvia e Arnaldo**, obrigada pelo imenso carinho e por me apoiarem sempre.

Ao amor da minha vida, **Cesar**, que para mim é a luz que guia meu caminho. Tenho certeza que estará do meu lado me apoiando sempre em minhas decisões. Você é uma pessoa muito especial que Deus colocou em minha vida. Te amo !!

A toda minha família, alicerce da minha vida, por toda a força, ajuda, carinho e interesse no meu futuro. Sou imensamente grata pelo apoio.

A minha amiga **Milena Caccelli**, pela amizade, carinho, e apoio nos momentos que mais precisei.

A minha grande amiga Débora agradeço por me acolher em seus braços nos momentos difíceis, obrigada pela sua amizade verdadeira. Te considero mais que uma amiga.

A **Mônica e Viviane**, grandes amigas que com certeza participaram de momentos especiais da minha vida. A amizade de vocês é muito importante para mim. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, professor Titular **Marco Antonio Bottino**, agradeço o incentivo e confiança que depositou em mim nesse difícil trabalho, pelo tempo dedicado a mim, pela sua sabedoria e experiência, pelo seu apoio, conversas e ensinamentos nos momentos difíceis que apareceram. O meu muito obrigada.

Ao professor Titular **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, pela sua atenção e disponibilidade em me co-orientar nesse trabalho. Agradeço a maneira como me recebeu no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal/ Disciplina de Microbiologia e Imunologia.

A **Karla Zanini Kartorski** e **Luiz Felipe Valandro** pela atenção com que sempre me receberam. Agradeço o indispensável apoio, orientação e colaboração com as suas observações e sugestões em diversos momentos durante o mestrado e principalmente na execução desse trabalho. Minha eterna gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor Professor Adjunto **José Roberto Rodrigues**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, Especialidade Prótese Dentária, coordenado pelo Professor Adjunto **Clóvis Pagani**, pela oportunidade concedida.

Aos docentes do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, **Estevão Tomomitsu Kimpara, Sigmar de Mello Rode, Rubens Nisie Tango, Tarcísio José Arruda Paes-Júnior, Alexandre Luiz Souto Borges, Fernando Eidi Takahashi, Renato Sussumo Nishioka, Osvaldo Daniel Andreatta Filho, Eduardo Shigueyuki Uemura, José Eduardo Junho de Araújo, Lafayette Nogueira Júnior, Carlos Augusto Pavanelli, Marcos Yasunóri Maekawa**, pelo ensinamento transmitido e convívio durante esse anos.

Aos voluntários que participaram da fase experimental, meu muito obrigada pela cooperação de todos para a realização desse trabalho.

Às funcionárias da biblioteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, por toda a maneira prestativa na atenção de minhas necessidades.

Às funcionárias da seção de pós-graduação **Lilium, Rose, Erena e Cidinha** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pelas informações e serviços prestados.

Ao professor **Ivan Balducci** pelas orientações e realização da análise estatística de minha tese e de outros trabalhos no decorrer do curso de mestrado. Meus sinceros agradecimentos.

Às funcionárias da secretaria, **Susana e Marili** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, por toda a disponibilidade e carinho que sempre me receberam.

Aos funcionários **Inês, Miguel e Fernando** do departamento de prótese da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, por toda atenção e ajuda.

Ao funcionário do departamento Diagnóstico Bucal/ Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **Sérgio Alves**, por toda atenção durante esse período.

Ao funcionário do escritório de assessoria e fomento, **Carlos Alberto Guedes**, por toda atenção.

Ao técnico de Microscopia confocal laser, **Alexsander Seixas de Souza**, do Instituto Butantã, respectivamente, por toda disponibilidade e atenção durante as inúmeras visitas que fiz para as capturas das imagens desse estudo.

Meus sinceros agradecimentos à aluna de doutorado da da faculdade de odontologia de Piracicaba - Unicamp, **Suzana Portugal de Fúccio**. Pessoa fundamental para realização desse trabalho, pois esteve sempre disposta a me ajudar com relação ao uso do corante e na interpretação das imagens. Meu muito obrigado.

Ao Sr. **Sebastião**, técnico de Microscopia eletrônica de varredura da faculdade de química da Unesp-Araraquara, por me receber para realizar as microscopias.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de estudo (processo nº 06/54008-9) para a realização deste curso de pós-graduação.

Aos meus amigos da pós graduação: **Susana, Cristiane, Sheila, Aleska, Silvia, Sandra, Diana, Priscila, Regina, Luana e Gustavo, Lucas, Guilherme, Kaizo, Priscila, Anderson, Celina, Rodrigo, Humberto**. Levarei nossa amizade por toda a vida.

"Se pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos".

A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos como sinais para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho e a ação.

E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse um segredo...

O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída".

(Mahatma Ghandi)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	16
RESUMO.....	17
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Influência das propriedades da superfície sólida na adesão.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Acabamento e polimento das superfícies cerâmicas.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Formação <i>in situ</i> do biofilme dentário em materiais restauradores.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Análise do biofilme em microscopia confocal laser.....</b>	<b>55</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Obtenção das amostras cerâmicas.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Acabamento e polimento superficial das amostras.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3 Análises realizadas.....</b>	<b>72</b>
4.3.1 Análise da rugosidade superficial.....	72
4.3.2 Análise da hidrofobicidade da superfície cerâmica.....	73
4.3.3 Análise do biofilme dentário inicial formado <i>in situ</i> .....	75
4.3.3.1 Seleção e informação dos voluntários.....	75
4.3.3.2 Confecção do dispositivo bucal.....	76

4.3.3.3 Análise do biofilme dentário inicial formado <i>in situ</i> por microscopia confocal laser: biovolume e espessura média.....	77
4.3.3.4 Análise da vitalidade das bactérias no biofilme.....	81
4.3.3.5 Análise do biofilme dentário inicial formado <i>in situ</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	82
4.3.4 Topografia da superfície cerâmica.....	83
<b>4.4 Análise estatística.....</b>	<b>83</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>110</b>
APÊNDICE.....	119
ANEXO.....	125
ABSTRACT.....	126

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Matriz metálica utilizada para confecção das amostras.....	68
Figura 2 -	Amostras posicionadas entre os dedos para a realização das técnicas de acabamento e polimento. A) Broca diamantada; B) Ponta de borracha; C) Disco de feltro.....	71
Figura 3 -	A) Amostras posicionadas sobre placa de vidro. B) Leitura das amostras com rugosímetro de ponta.....	73
Figura 4 -	A) Amostra posicionada no dispositivo do aparelho com a gota em posição. B) Imagem reproduzida pelo software para o cálculo do ângulo de contato. C) Aparelho goniômetro usado.....	74
Figura - 5	Dispositivo confeccionado com as amostras posicionadas. A) Vista frontal. B) Vista lateral.....	77
Figura 6 -	A) Corante Live/ Dead ® Bac Light <sup>tm</sup> ; B) Syto 9 e iodeto isopropídeo; C) Corantes diluídos em ependorfes; D) Aplicação do corante sobre as amostras posicionadas em placa de Petri.....	79
Figura 7 -	Microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 META utilizado para análise do biofilme.....	80
Figura 8 -	Representação do gráfico de colunas dos valores	

	médios e desvio padrão da rugosidade superficial antes e após os procedimentos de acabamento e polimento em cada grupo.....	85
Figura 9 -	Imagens digitais representativas do biofilme formado (aumento de 4X no eixo z) sobre a superfície cerâmica submetida a diferentes procedimentos de acabamento e polimento: (A) Glaze (G1), (B) Glaze + Broca, (C) Glaze + Broca + Ponta de borracha, (D) Glaze + Broca + Ponta de borracha + Disco de feltro com pasta diamantada.....	88
Figura 10 -	Imagem digital representativa da arquitetura do biofilme na cerâmica VM7: interação das bactérias coradas de vermelho com a matriz de polissacarídeo corada de verde. A) e B) Aumento de 10x, (C) Aumento de 40x e (D) Aumento de 63 x.....	89
Figura 11 -	Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) do biofilme nos grupos.....	90
Figura 12 -	Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da espessura média ( $\mu\text{m}$ ) do biofilme nos grupos.....	90
Figura 13 -	Representação gráfica da correlação entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume do biofilme ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) nos grupos.....	93
Figura 14 -	Representação gráfica da correlação entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e espessura média do	

	biofilme ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos.....	93
Figura 15 -	Representação gráfica das médias e desvio padrão dos valores de pixels referentes à proporção de células viáveis e não viáveis.....	94
Figura 16 -	Micrografias representativas do grupo G1: presença de cocos isolados e diplococos.....	95
Figura 17 -	Micrografias representativas do grupo G2: estreptococos (A e C) e cocos (B e D) colonizando a superfície cerâmica.....	96
Figura 18 -	Micrografias representativas do grupo G3: presença de material fibrilar (A), e colônias de cocos e bastonetes curtos (B).....	96
Figura 19 -	Micrografias representativas do grupo G4: presença de material granular e bactérias isoladas.....	97
Figura 20 -	Micrografias representativas das superfícies da cerâmica VM7 em 750x e 2000x: (A) G1, (B) G2, (C) G3,(D)G4.....	98

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Materiais, marcas e fabricantes, e indicações de uso.....	67
Quadro 2	Ciclo de queima da cerâmica VM7.....	60
Quadro 3	Ciclo de vitrificação do glaze Vita Akzent 25.....	69
Quadro 4	Grupos do estudo considerando os fatores de experimento.....	70
Tabela 1	Análises realizadas no estudo.....	72
Tabela 2	Teste de Tukey da rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos experimentais.....	86
Tabela 3	Médias e desvio padrão dos valores de ângulo de contato (graus) nos grupos.....	87
Tabela 4	Médias, desvio padrão e coeficiente de variância dos valores de espessura média e biovolume nos grupos.....	91
Tabela 5	Valores de correlação linear de Pearson entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) e entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e espessura média ( $\mu\text{m}$ ).....	92
Tabela 6	Teste <i>t</i> -Student pareado: médias e desvio padrão dos valores de viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS , SIGLAS e SIMBOLOS

Å= amper

AC= acetato de celulose

cel /ml = célula / mililitro

ELS= Energia livre de superfície

erg/cm<sup>3</sup> = energia / centímetro cúbico

FEP = fluoretilenopropileno

kV= kilovolt

mA= micro-amper

MEV = microscópio eletrônico de varredura

MCVL= microscopia confocal de varredura a laser

Mn/m = Valor de tensão/ superfície mínima

mTorr = Pressão na etapa de plasma-polimerização

nm/minuto= nanometro/ minuto

Pd-Au= prata- ouro

PTFE= politetrafluoretileno

PVC = Polivinilclorídeo

Ra= rugosidade média

Rz = média de rugosidade

Brentel AS. Efeito do sistema de acabamento e polimento na rugosidade superficial e formação *in situ* de biofilme dentário inicial em uma cerâmica feldspática micro-particulada [dissertação] Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; São José dos Campos; 2008.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar uma cerâmica feldspática micro-particulada quanto à rugosidade superficial, hidrofobicidade e formação *in situ* do biofilme dentário. Amostras padronizadas da cerâmica foram confeccionadas e divididas em 4 grupos conforme o sistema de acabamento e polimento: glaze (G1); glaze e broca diamantada (G2); glaze, broca diamantada e pontas de borracha (G3); glaze, broca diamantada, ponta de borracha e disco de feltro impregnado com pasta diamantada (G4). Rugosidade foi avaliada antes e após os procedimentos de acabamento e polimento estabelecidos para cada grupo. O ângulo de contato da água deionizada foi avaliado em goniômetro. Dez pacientes usaram dispositivo bucal com amostras dos diferentes grupos durante 8 h. Decorrido o período experimental, o biofilme (n=10) foi analisado em microscopia confocal laser ( biovolume e espessura média) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=5). A rugosidade superficial foi significativamente diferente nos 4 grupos, sendo a ordem crescente de rugosidade  $G1 < G4 < G3 < G2$ . Em relação ao ângulo de contato, G1 apresentou a maior hidrofobicidade, não havendo diferenças entre os demais grupos. G1 e G4 foram semelhantes e apresentaram os menores valores de espessura média e biovolume do biofilme. G2 e G3 apresentaram os maiores valores de espessura média e biovolume sendo similares. Correlação positiva foi verificada entre rugosidade superficial e formação de biofilme *in situ*. As observações em MEV indicaram cocos isolados e diplococos em G1 com pouco material acelular. Em G2, presença de maior número de bactérias aderidas às amostras foi verificada. Em G3 foi verificado material fibrilar com cocos e bastonetes curtos constituindo colônias na superfície. Em G4, as amostras foram recobertas por material granular com poucos cocos isolados aderindo à superfície

**PALAVRAS CHAVE:** Placa dentária, Cerâmica, Polimento dentário

## 1 INTRODUÇÃO

A estética na odontologia evoluiu significativamente com o desenvolvimento de materiais como as cerâmicas odontológicas micro-particuladas. Estes novos materiais cerâmicos, usados para facetas laminadas, incrustações, coroas e próteses parciais fixas, são de interesse devido à adaptação marginal, resistência ao desgaste e à fratura e, principalmente, pela sua aparência estética <sup>9</sup>.

Em algumas situações clínicas, após a cimentação da restauração cerâmica, podem ser necessários ajustes finais intra-orais alterando o glaze, criando uma superfície mais rugosa <sup>60</sup> e podendo comprometer a estética. Nestas circunstâncias, novo polimento intra-oral da superfície cerâmica é preconizado, com o uso de materiais e instrumentos adequados <sup>15</sup>. Quando cerâmicas não recebem polimento adequado, algumas conseqüências têm sido relatadas como maior desgaste nos dentes antagonistas, enfraquecimento da estrutura cerâmica, e favorecimento da adesão de bactérias à superfície <sup>68, 59, 35, 39, 2</sup>.

A rugosidade superficial parece ser a propriedade dos materiais restauradores que desempenha maior influência no processo de formação do biofilme dentário. Nas superfícies rugosas e irregulares o biofilme forma-se em maior quantidade e apresenta maturação mais rápida quando comparado às superfícies lisas <sup>56, 23, 57</sup>. A energia livre superficial (ELS) dos materiais também influencia na formação do biofilme. Maior retenção do biofilme tem sido observada em substratos com alta ELS, ou seja, substratos hidrofílicos <sup>33, 54, 56</sup>.

Estudos têm demonstrado diferenças no biofilme formado sobre materiais restauradores, provavelmente devido às diferenças nas

propriedades dos materiais como rugosidade superficial e energia livre superficial<sup>38</sup>.

Diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a formação *in situ* do biofilme sobre materiais restauradores como as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão<sup>26, 27, 61,62</sup>. Todavia, estas técnicas exigem fixação, desidratação ou inclusão do biofilme o que altera a sua arquitetura não permitindo uma análise adequada.

Com o advento da microscopia confocal laser, pôde-se estudar biofilmes dentários totalmente hidratados possibilitando análise mais fiel das relações existentes entre os componentes do biofilme, bem como das relações entre o biofilme e o substrato ao qual está aderido<sup>19,46,5, 86, 38</sup>.

A aderência bacteriana a materiais restauradores mais novos, propostos por apresentarem melhores propriedades biológicas, estéticas e físico-químicas, como as cerâmicas feldspáticas micro-particuladas, é pouco conhecida.

Considerando a importância de se obter uma superfície cerâmica o mais lisa possível, diferentes métodos de polimento têm sido avaliados a fim de proporcionar menor rugosidade superficial e por consequência menor formação de biofilme<sup>15</sup>.

Assim, informações relativas aos sistemas de acabamento e polimento e o efeito destes sobre a formação do biofilme em cerâmicas feldspáticas micro-particuladas, podem ser valiosas para a manutenção da saúde bucal do paciente e para a longevidade do tratamento restaurador.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

Por razões didáticas, a revisão da literatura foi dividida em assuntos referentes ao objetivo da pesquisa.

### **2.1 A influência das propriedades das superfícies sólidas na adesão das bactérias**

A formação do biofilme dentário pode ocorrer sobre todas as superfícies sólidas no ambiente bucal, independente de serem superfícies naturais, como esmalte e cimento, ou artificiais, como materiais restauradores <sup>14, 73</sup>.

Para que ocorra a adesão bacteriana inicial, é necessário que haja interações entre superfície e bactéria <sup>84</sup>.

A interação entre o filme de proteína presente na superfície sólida e as bactérias, faz com que este sirva de precursor para a fixação bacteriana. Porém o número e a condição de fixação da bactéria depende da força atômica da superfície sólida (energia livre de superfície), para que ocorra a deposição do filme protéico <sup>43</sup>.

Com relação à adesão bacteriana, tanto a rugosidade, como a energia livre de superfície, tem um importante papel. Porém, as bactérias são mais protegidas nas superfícies rugosas, contra as forças de cisalhamento, fazendo com que a adesão ocorra mais facilmente e, de modo irreversível. A rugosidade de superfície, portanto, é o fator de maior importância em comparação à energia livre de superfície, na determinação da formação e composição de placa <sup>55, 57</sup>.

Portanto, uma superfície com baixa energia e baixa rugosidade de superfície, pode diminuir o acúmulo de placa *in vivo*<sup>55</sup>.

Microrganismos com alta energia livre de superfície são encontrados em maioria na cavidade oral, podendo aderir preferencialmente a substratos hidrofílicos enquanto microrganismos com baixa energia de superfície são encontrados raramente na cavidade oral, o qual aderem melhor aos substratos hidrofóbicos<sup>79,13</sup>.

Com relação à fase de colonização, quando um microrganismo está firmemente fixado, inicia o crescimento de novas células, permanecendo fixas as microcolônias ou resultando em um novo biofilme. Uma vez que uma camada de microrganismo tenha sido estabelecida, um novo crescimento ocorre, através da multiplicação dos microrganismos já aderidos<sup>12</sup> ao mesmo tempo em que, ocorre a co-adesão entre as espécies.

O crescimento do biofilme dentário parece ocorrer principalmente pela multiplicação de células aderidas<sup>12,55</sup>.

Weerkamp et al.<sup>84</sup>, estudaram a medida do ângulo de contato da superfície bacteriana para determinar sua energia livre de superfície (ELS). As espécies de *S. mutans*, *S. sanguis* e *salivarius* apresentaram-se de forma homogênea, tendo alta ELS, não sendo afetado pela presença da película salivar. *S. mitis* tiveram ELS muito baixa, que diminuiu significativamente após a presença da película salivar. O cálculo da ELS na interface da adesão bacteriana na superfície sólida em suspensão de saliva mostrou que estreptococos com maior ELS encontram condições mais favoráveis para a adesão em superfícies com alta ELS. Entretanto, a ELS do *S. Mitis*, não permitiu, em função da presença da película salivar, ser capaz de aderir em superfícies com baixa ELS. Esses resultados indicam que, a superfície do esmalte dentário, com baixa ELS, seria desfavorável para adesão de uma maior quantidade de estreptococos orais.

O objetivo de Van Dijk et al.,<sup>78</sup>, foi avaliar o efeito da ELS com relação à aderência bacteriana *in vivo*. Utilizando-se 5 cachorros, da raça beagles onde se adaptou, no canino, uma coroa de ouro com uma abertura, onde foi colocada amostras de politetrafluoretileno (PTFE, Teflon Type, EUA), Parafilme (American Can Company, USA), Polivinilclorídeo (PVC, TkG, Alemanha), Dentina bovina, Esmalte bovino e Vidro. As amostras foram polidas para que chegasse na rugosidade de 0,1  $\mu\text{m}$  e foram posicionadas no dente. O ângulo de contato foi medido usando água e n- propanolol misturados e  $\alpha$ - bromonafitaleno. O ambiente oral mudou a ELS do substrato devido à presença da película salivar. Mais microrganismos aderiu, ao substrato com alta ELS inicial, com relação aos substratos com baixa ELS (PTFE e Parafilme). O alto número de microrganismos aderidos ao PVC foi menor, com relação ao Parafilme. Portanto, quando diferentes substratos foram expostos na cavidade de cachorros beagle, foi notado que a película formou-se em maior valor no substrato de baixa energia livre de superfície do que no de alta energia de superfície.

Christersson et al.<sup>18</sup>, avaliaram o efeito da ELS na retenção de microrganismos orais em saliva humana não estimulada. O número total e morfologia de microrganismos presentes na saliva foram registrados utilizando-se o fluxo celular, em seguida a superfície testada foi preparada para demonstrar o aumento da ELS crítica, verificada pela medida de ângulo de contato. Superfícies do esmalte com ELS inicialmente baixa (20 a 22 Mn/m), média (35-38 Mn/m) e alta (> 50 Mn/m) foram expostas à saliva com média de fluxo de 1ml/min, com tempo de exposição de 15min. A quantidade de bactéria que se fixou, foi avaliada em três zonas diferentes da superfície com microscópio óptico, e estatisticamente testados. A superfície do esmalte humano com média tensão superficial possibilitou a retenção de um alto número de microrganismos em comparação com outras superfícies testadas. Esses resultados demonstraram que, a retenção inicial dos microrganismos às

superfícies está fortemente relacionado à remoção das forças mecânicas e, ao estado da energia de superfície da superfície sólida exposta. A retenção microbiana às interfaces pode, entretanto, ser controlada pela seleção da tensão superficial crítica e forças de cisalhamento que ocorre no local.

Quirynen et al.<sup>55</sup>, fixaram polímeros nos incisivos de 20 voluntários, para avaliar a placa no período acima de nove dias, em 4 diferentes energias de superfície. A quantidade de placa foi registrada no período acima de 9 dias em teflon, parafilme, acetato de celulose e esmalte com ELS respectivamente de 20, 26, 57 e 88 erg/cm<sup>3</sup>. Amostras dos 3 primeiros materiais foram fixados na face vestibular dos incisivos superiores. O incisivo remanescente foi polido e serviu de análise de superfície do esmalte. O aumento da placa foi avaliado após 3, 6 e 9 dias por análise planimétrica para expressar como porcentagem a superfície total da placa. Para calcular a ELS, o ângulo de contato foi medido *in vitro* com água, água com n-propanolol e  $\alpha$ -bromonafitaleno. Os resultados indicaram que a aderência de microrganismos ao substrato, recoberto pela película salivar foi influenciado pela ELS do material, e que, portanto existe uma associação entre ELS do substrato e a quantidade de placa supragengival.

Yamamoto et al.<sup>80</sup>, avaliaram aderência *in vitro* de *Streptococcus oralis* sobre resina composta (Palfique Light) e a correlacionaram com rugosidade superficial do material. Amostras do material foram confeccionadas e polidas com lixas de papel de diferentes granulações obtendo-se rugosidades superficiais variando de 0,2 a 3,0  $\mu$ m. As amostras foram imersas em suspensão de 10<sup>8</sup> cel /ml radiomarcadas e incubadas por 2 h a 37°C em condições de anaerobiose. Após avaliação da aderência de *S. oralis*, as amostras foram lavadas, fixadas e desidratadas para serem examinadas em MEV. Foi verificado que a aderência bacteriana variou de 9,85 a 9,28 x 10<sup>6</sup> células /amostra para as mais rugosas e menos rugosas, respectivamente. Não foi

observada relação entre aderência de *S. oralis* e rugosidade superficial. Na análise com MEV, foi observado que fímbrias facilitaram a aderência das bactérias às partículas de carga da resina composta nas amostras com rugosidade de 0,2µm.

Com o objetivo de avaliar que a alta ELS e que o aumento da superfície rugosa facilita o acúmulo de placa supragengival *in situ*, Quirynen et al.<sup>56</sup>, correlacionaram o efeito dessas duas características no crescimento de placa. Amostras de fluoretilenopropileno (FEP) e acetato celulose (AC), superfícies, respectivamente, com baixa e intermediária energia livre de superfície, sendo que a metade de cada amostra tinha rugosidade de superfície de 0,1 µm e a outra metade de 0,2 µm, foram colocados em contato com os incisivos naturais de 16 voluntários, através da adesão de cianoacrilato. Durante 6 dias, não foi realizada nenhuma higiene oral e a presença de placa foi registrada no período de 3 e 6 dias. As amostras foram analisadas por meio de microscópio óptico, relacionando-se aos escores das proporções de bactérias, em forma de cocos, pequenos, médios, grandes e bastonetes ou células bacterianas de formato fusiforme. No terceiro dia, a significativa diferença deu-se com relação ao acúmulo de placa somente obtida em superfícies rugosas quando comparadas a lisas. Entretanto no 6º dia, significativamente, menos placa foi formada na parte mais lisa das amostras de FEP (19,4%), quando comparada com AC também na parte mais lisa (39,5%), e mais placa foi formada na parte rugosa de FEP (96,8%) e AC (98,2%). Houve pouca diferença com relação à composição bacteriana, grande porcentagem de cocos foi observado em FEP na parte lisa (86,2%) e menor na parte rugosa da amostra FEP (78,5%) e AC (82,8).

A aderência de *S. sanguis* e *S. mutans* em 7 restaurações foram avaliados por Satou et al.<sup>64</sup>, na presença e ausência da saliva artificial, em 4 resinas compostas: Silar (3M, USA), P 10 (3M, USA), Clearfil F3 (Kuraray, Japão), Microrest (GC, Japão), 2 ligas de amalgama: Valiant (Caulk, USA) e Fluor Alloy (Dentoria, França) e 1 liga Au-Ag-Pd

(GC, Japão ). O recobrimento salivar das amostras foi realizado com a saliva coletada que foi centrifugada por 20 min a 4 ° C a 20.000x para remoção dos debris. As amostras foram imersas em saliva por 1 h a 37° C em seguida lavadas em água destilada para realização dos testes de aderência. Para determinação da hidrofobicidade, foram utilizadas as amostras com e sem a presença de película salivar, utilizando água destilada. As características físico-químicas da superfície das bactérias e da restauração também foi medida, junto com o efeito do recobrimento salivar nas restaurações. A ELS das restaurações sem o recobrimento da saliva mostrou uma correlação positiva com o número de *S. mutans* e *S. sanguis* aderentes, já o *S. sanguis*, mostrou uma correlação positiva com as restaurações sem o recobrimento. A hidrofobicidade da superfície diminuiu com o recobrimento da saliva enquanto o ângulo de contato aumentou.

Suljak et al.<sup>72</sup>, avaliaram a habilidade de três bactérias orais. A aderência de *S. sanguis* CH3, *S. salivarius* HB e *Actinomyces viscosus* WG na presença e ausência de película salivar sobre amostras padronizadas de amalgama (ângulo de contato da água 60°) e compostos resinosos hidrofóbicos (Prisma APH, Herculite XRV e Z 100) foram comparados em um ensaio *in vitro* através de bactérias incubadas na saliva, e então, as bactérias não aderidas foram removidas com jato de PBS. Também foram determinados os ângulos de contato da água sobre os materiais e sobre as bactérias como uma medida de hidrofobicidade. O ângulo de contato foi feito como medida da hidrofobicidade de superfície utilizando a técnica da gota. Em adição ao ângulo de contato da água de três bactérias. As medidas dos ângulos de contato indicaram que a resina Z100 foi mais hidrofóbica seguida pela Herculite, e resina Prisma. O microrganismo mais hidrofóbico foi *S. sanguis*, seguido por *S. salivarius* e *A. viscosus*. Não foram observadas diferenças quanto ao número de microrganismos aderidos entre os diferentes materiais. Contudo, foi

verificado que o microrganismo mais hidrofóbico (*S. sanguis*) foi o que se aderiu em maior número a todos os materiais testados.

A aderência *in vitro* de cepas padrão de *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis* e *S. sobrinus* ao esmalte dentário humano, cerâmica (Cerec 2 Vitablocs Mark II) e cimento resinoso foi avaliada por Takatsuka et al <sup>74</sup>. Amostras padronizadas dos materiais foram confeccionadas e receberam os mesmos procedimentos de acabamento e polimento. Para a realização do teste de aderência na presença de saliva, as amostras foram imersas em saliva filtrada por 60 min a 37°C, e lavadas, a seguir, em água destilada. Também foram medidos os ângulos de contato dos microrganismos e dos materiais como índice de hidrofobicidade. Na ausência da saliva, o cimento resinoso foi o material mais hidrofóbico. O esmalte apresentou maior valor de ELS sendo mais hidrofílico, e a cerâmica apresentou valor intermediário. Com a cobertura da película salivar, a ELS dos três materiais foi similar. *S. sobrinus* apresentou maior ELS, não ocorrendo diferenças entre os demais microrganismos. Nas amostras avaliadas sem presença de saliva, observou-se maior aderência de *S. mitis*, *S. oralis* e *S. sobrinus* no esmalte seguido pela cerâmica e cimento resinoso. Já para o *S. sanguis*, maior aderência ocorreu no cimento resinoso seguido pelo esmalte e cerâmica. A aderência dos microrganismos testados diminuiu na presença de saliva, exceto a aderência de *S. sanguis* ao esmalte que não foi alterada.

## **2.2 Acabamento e polimento das superfícies cerâmicas**

Um dos maiores objetivos atuais das pesquisas com cerâmica é a produção de materiais resistentes que possam oferecer uma

utilização confiável para o uso odontológico. A quantificação dos parâmetros microestruturais é importante para o desenvolvimento da relação entre estrutura e propriedades. A análise quantitativa da microestrutura fornece uma associação entre a composição, as propriedades físicas, e as características estruturais dos materiais. A confiabilidade estrutural das cerâmicas odontológicas é um fator importante para o sucesso clínico das restaurações cerâmicas<sup>21</sup>.

Klausner et al.<sup>36</sup>, compararam a superfície polida e autoglazeada de uma porcelana. Vinte amostras da cerâmica para restaurações veneer (Vita VMK 68- Unitek Corp.) foram confeccionadas seguindo as recomendações do fabricante e em seguida glazeadas. As amostras foram divididas em 4 grupos de acordo com a seqüência de polimento: G1) Broca diamantada de granulação fina (Hanau-Densco-Dental) seguido pelo disco de borracha de granulação fina (Dedeco Nos – Dental development) e polido com óxido de alumínio, G2) Kit para polimento shofu (Shofu Dental corp., Menlo Park, Calif), G3) Broca diamantada fina seguido por disco de borracha de granulação média impregnado com abrasivo (Cratex Co, San Francisco), disco pouco abrasivo de borracha mole (J.F.Jelenko e Co Dental Products, NY), e em seguida polido com óxido de alumínio, G4) Ajuste com kit de brocas para escultura de porcelana Jelenko seguidos por kit de brocas para polimento Jelenko e G5) Grupo glaze como controle. As amostras foram analisadas no rugosímetro, após aplicação do glaze e após cada ajuste. Não houve diferença significativa entre a rugosidade de superfície quando houve polimento com relação ao glaze inicial.

Raimondo et al.<sup>58</sup>, compararam quatro diferentes sistemas de pastas de polimento com reglazeamento no forno e com kit de ajuste para porcelana. Trinta amostras de porcelana Vita de queima a vácuo foram confeccionadas seguindo as recomendações do fabricante utilizando a mesma técnica, em um mesmo forno. Todas as amostras tiveram o glaze retirado com uma ponta diamantada fina. Foi feito um

sulco com 1mm de profundidade e 2mm de comprimento de modo longitudinal em cada amostra com disco de óxido de alumínio para simular o sulco oclusal em um dente posterior. As amostras foram aleatoriamente separadas em 6 grupos (n=5) e numeradas de 1 a 30 para a identificação. As técnicas de acabamento foram divididas em 6 grupos: G1) Kit para ajuste de porcelana Shofu (Shofu Dental Corp.), G2) Reglazeamento em forno, G3) Pasta diamantada (Diamon Dust-Advanced Dental Products), G4) Glaze N shine (Dental Ventures of América) e G5) Sistema de polimento de porcelana (Trusluster-Braseler), G6) Kit de acabamento de porcelana (Dia-gloss- Pollard Dental Products). As amostras polidas e reglazeadas foram classificadas de acordo com a qualidade de acabamento por observadores e por MEV. As imagens em MEV revelaram que o melhor acabamento foi das amostras reglazeadas seguido por Trusler, Dia gloss Diamont Dust, Shofu e Glaze shine.

Paterson et al.<sup>50</sup>, avaliaram o efeito do uso de um kit utilizando-se 40 amostras de porcelana de Vita VMK (Vita Zahnfabrick). Foi realizado um pré-glazeamento usando uma pedra de desgaste (Alpine stone –Ash Instruments Dentsply) e em seguida glazeadas. As amostras foram divididas em 4 grupos: G1) Nenhum tratamento (controle), G2) Glaze, sobrepolido usando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante, G3) Superfície ligeiramente reduzida usando broca diamantada de granulação fina e G4) Amostras do grupo 3 (G3) foram polidas usando um kit comercial para polimento. As amostras foram avaliadas por meio de perfilômetro e MEV. O kit comercial usado é capaz de produzir uma melh. significativa na lisura superficial da porcelana previamente ajustada com broca diamantada. O kit testado mostrou ser incapaz de restaurar a porcelana ajustada ao grau de lisura superficial comparada a porcelana glazeada.

Patterson et al.<sup>51</sup>, avaliaram a eficiência do uso de um kit de acabamento (Diamond paste- Chamelon Dental products) em 20 amostras da cerâmica Vitadur N (Vita, Alemanha) na superfície da

porcelana após desgaste da superfície com ponta montada diamantada fina (30 µm) e extra- fina (15µm), tendo o grupo glaze como controle. O procedimento de desgaste e acabamento foi padronizado e a técnica utilizada simulou a técnica clínica. As amostras foram analisadas qualitativamente por MEV e quantitativamente por perfilômetro. Antes do glazeamento em todas as amostras, estas receberam um pré-glaze usando uma ponta montada (Alpine- Ash instruments). O acabamento com pontas dimantadas, com 15 µm, resultou em melhor acabamento superficial do que brocas com 30 µm, embora a superfície resultou em maior rugosidade com relação à amostra glazeada. Usando o kit testado posteriormente ao uso da ponta diamantada com 15 µm resultou em uma superfície comparável ao glaze original.

Anusavice <sup>2</sup>, ponderou que a durabilidade química é o principal requisito das cerâmicas no ambiente oral, pois as próteses devem resistir à degradação na presença de uma variedade de soluções com diferentes pH. Segundo o autor, a degradação dos materiais ocorre geralmente pela ação de forças mecânicas, ataque químico, ou a combinação desses fatores. Os possíveis efeitos fisiológicos das cerâmicas são: a tendência de abrasionar estruturas dentárias antagonistas, a emissão de componentes radioativos, a possibilidade de substâncias químicas alterarem sua superfície tornando-as mais rugosas e favorecendo a retenção de biofilme, e a liberação de substâncias potencialmente tóxicas em consequência da abrasão e do ataque químico.

Scurria ; Powers <sup>67</sup>, avaliaram a rugosidade superficial de uma cerâmica convencional e outra utilizada para sistema CAD-CAM, utilizando diferentes sistemas de polimento. Discos da cerâmica feldspática Ceramco e da cerâmica vítrea usinada Dicor MGC foram fabricados e polidos com diferentes combinações de instrumentos. Pontas diamantadas, géis de polimento, pontas de silicone, pontas de oxido de alumínio, e pastas de óxido de alumínio foram utilizados. Foi realizada a

análise da rugosidade e da topografia da superfície, após polimento. Os resultados indicaram diferenças significantes nas médias de rugosidade entre as cerâmicas e as técnicas. As pontas diamantadas e os géis produziram superfícies mais lisas nos dois materiais, entretanto as pontas de óxido de alumínio e as pastas foram estatisticamente semelhantes para a cerâmica Dicor. A porcelana feldspática tem um polimento superior com instrumentos intra-orais quando comparado com auto-glaze. A cerâmica Dicor pode ter um polimento superior com relação à cerâmica Ceramo II. Acabamento com ponta diamantada e pasta diamantada produziram superfície mais lisa para ambas cerâmicas, entretanto, a ponta de óxido de alumínio e as pastas foram equivalentes com relação à cerâmica MGC. A broca carbide não melhorou a lisura nas combinações testadas.

Ward et al.<sup>82</sup>, avaliaram a eficácia de 8 diferentes técnicas de polimento intra-oral em 3 porcelanas opalescentes: Ceramo II Opal- Ceramo Inc., Burlington, NJ., Vintage/Opal 58- 3M Dental products e Duceram-LFC- Ducera Dental, Alemanha). Quarenta discos de cada cerâmica foram confeccionados, todas as amostras foram desgastadas com ponta diamantada de granulação 60 µm. Quatro amostras de cada porcelana foi selecionada para controle da broca diamantada. A rugosidade superficial das porcelanas foi medida cinco vezes em cada disco antes e após o procedimento de polimento. Os resultados foram comparados aos grupos controle do glaze e autoglaze. Cinco técnicas entre as testadas produziram uma superfície mais lisa do que o glaze. O uso de uma broca carbide com granulação de 30 µm após o polimento com pasta diamantada produziu uma superfície mais lisa. A maioria dos kits, para polimento, tiveram lisura superficial maior do que o glaze e auto-glaze. O uso de broca carbide com 30 µm de granulação depois da aplicação da pasta diamantada produz melhor lisura de superfície.

Fuzzi et al.<sup>22</sup>, avaliaram a rugosidade superficial de 54 amostras de porcelana Vita VMK 68. Antes do glaze (líquido- Glasur

Geller, Creation -Austria, e pó- Steele's Super Glaze, Kentzler- Kaschner Dental- Alemanha) a superfície de cada amostra foi preparada com ponta diamantada de 30  $\mu\text{m}$  e lixa d'água com 220 de granulometria, após glazeamento e após 9 tipos de acabamento e polimento superficial sendo um deles o grupo controle: G1: Acabamento superficial com ponta diamantada com 30  $\mu\text{m}$  (Komet- Brasseler- Alemanha), G2: Acabamento com pontas diamantadas 30 e 15  $\mu\text{m}$ , G3: Acabamento com pontas diamantadas 30, 15 e 8  $\mu\text{m}$ , G4: Acabamento com ponta diamantada 30  $\mu\text{m}$  seguida da ponta carbide, G5: Acabamento com ponta diamantada 30  $\mu\text{m}$  seguida do disco de borracha Ceramiste (Shofu Dental), G6: Acabamento com ponta diamantada 30  $\mu\text{m}$  seguida por Dia finish nº 40 (Renfert- Alemanha) G7: Acabamento com ponta diamantada 30  $\mu\text{m}$  seguida do disco de borracha Ceramiste (Shofu Dental) seguido da pasta diamantada (Two diamont gel – Premier dental products), G8: Acabamento com ponta diamantada 30  $\mu\text{m}$  seguida por Dia finish nº 40 e seguido da pasta diamantada (Two diamont gel. Em seguida, as amostras foram analisadas qualitativamente por MEV, e quantitativamente por profilômetro. A melhor média de rugosidade foi obtida usando pontas diamandadas, usadas respectivamente na seqüência 30, 15 e 8  $\mu\text{m}$ . A análise por MEV mostrou que todos os tratamentos resultaram em superfícies porosas ou com presença de fissuras, entretanto a superfície glazeada, foi a que apresentou os melhores resultados. Não houve diferença significativa detectada entre os tratamentos, o uso da broca diamantada com 30  $\mu\text{m}$  produziu uma superfície mais rugosa. Nenhuma correlação foi encontrada entre os resultados do MEV com a rugosidade superficial.

Kawai et al.<sup>35</sup>, avaliaram a quantidade de biofilme dentário e rugosidade superficial que foi verificada sobre diferentes materiais odontológicos. Foi avaliada a relação entre a rugosidade de superfície e a quantidade de placa bacteriana *in vitro*. Esse estudo comparou a quantidade de adesão dos componentes da placa (célula bacteriana e

glucans) nos discos cerâmicos com vários graus de rugosidade de superfície, para avaliar o efeito da rugosidade de superfície na quantidade do acúmulo de placa. Foram confeccionados 60 discos com 9 mm de diâmetro de cerâmica ( Vita Celay blanks A3M-9), em seguida glazeadas (IPS glaze –ivoclar ) As amostras foram divididas em 4 grupos; Grupo G: controle com glaze, Grupo R : Glaze + lixas d'água com granulação 120 , Grupo S : Glaze + lixas d'água com granulação de 600 e Grupo D: Glaze + disco de feltro impregnado com pasta diamantada. A rugosidade de superfície foi medida em todos os grupos. A superfície obtida pelo polimento com pasta diamantada foi a que apresentou a maior lisura de superfície, seguida da superfície glazeada, lixa água de 600 e por último de 120. A quantidade de glucans aderido aumentou com o tempo de incubação. O valor da rugosidade de superfície, e a quantidade de adesão de placa diminuíram, com o aumento do polimento. Entretanto, mais quantidade de placa foi mais aderida em superfícies glazeadas do que superfícies polidas com pasta diamantada.

Gomis et al.<sup>24</sup>, comparam o efeito de quatro sistemas de acabamento e polimento, sendo que todos os grupos receberam um acabamento anterior com broca diamantada e polimento posterior com pasta diamantada; G1: Sistema White silicon (Komet), G2: Sistema kit shofu, G3: Brocas diamantadas (Komet) 15 µm e 30 µm e G4: Seqüência de três discos Sof-lex. Relataram que após quatro leituras em rugosímetro, que foi seguido aos dois procedimentos realizados em todos os grupos (broca diamantada e pasta diamantada), todos os métodos reduziram a média de rugosidade, sendo que os discos sof-lex foram os mais efetivos com relação aos outros métodos. O disco sof-lex mostrou melhores resultados com média de rugosidade de 0,2 µm. Entretanto esses discos são difíceis de manipular na região de molar. A pasta diamantada não melhorou os valores Ra de rugosidade de superfícies cerâmicas com acabamento com Sof-lex, brocas diamantadas ou kit shofu, somente reduziu a média do pico de rugosidade (Rz), embora não

tenha melhdo a média de rugosidade (Ra), indicando que, todos os sistemas testados reduziram a média Ra de rugosidade inicial, porém Soflex foi o mais eficiente.

Jung et al.<sup>34</sup>, realizaram 40 cavidades classe II, restauradas com compósito microhíbrido Tetric-vivadent e as outras 40 com IPS Empress. As inlays foram inseridas com cimento dual, Variolink Ultra (Vivadent, Schaan, Liechtenstein). As inlays de compósito resinoso e de cerâmica foram divididas em 4 grupos de 10, onde variou-se o acabamento e polimento. Foram realizados 4 diferentes tipos de acabamento e polimento no compósito: 1) Acabamento com brocas diamantadas e broca de tungstênio, ambas com 30µm seguido do polimento com disco de feltro impregnado com diamante (Diafix oral-Muller Dental, Alemanha), 2) Mesmo acabamento anterior seguido pelo polimento com gel impregnado com diamante (Two Striper MPS- Premier Dental products, USA), 3) Acabamento com brocas diamantadas de 30 e 20 µm seguido do polimento com disco de feltro impregnado com diamante (Diafix oral- Muller Dental, Alemanha) 4) Mesmo acabamento anterior seguido do polimento com gel impregnado com diamante (Two Striper MPS- Premier Dental products, USA). Com relação à cerâmica foram realizados 4 diferentes tipos de acabamento e polimento: 1) Acabamento com brocas diamantadas e broca de tungstênio, ambas com 30µm seguido do polimento gel impregnado com diamante (Two Striper MPS- Premier Dental products, USA), 2) Mesmo acabamento anterior seguido pelo polimento com ponta de borracha para polimento impregnada com diamante (Brassler, USA), 3) Acabamento com brocas diamantadas de 30 e 20 µm seguido do polimento com polimento gel impregnado com diamante (Two Striper MPS- Premier Dental products, USA) 4) Mesmo acabamento anterior seguido do polimento com Ceramiste (Shofu Inc, Japão). Após o polimento réplicas de restaurações foram confeccionadas com moldagem e seu preechimento com resina epoxi, para observação das margens em MEV, com relação à qualidade

das margens. As réplicas foram avaliadas com relação à qualidade da superfície por meio de micrografias, onde foi observadas a lisura, contorno da margem, menor rugosidade e rugosidade mais severa. Nenhum instrumento usado para acabamento e polimento causou efeito destrutivo significativo, nas margens e superfícies das inlays de resina ou cerâmica. Sob as condições clínicas, não houve diferença significativa, entre os quatro métodos com relação à resina e a cerâmica com relação à qualidade da margem e da superfície.

Wright et al <sup>87</sup>, compararam a rugosidade superficial produzida por 3 diferentes sistemas de polimento de porcelanas de baixa fusão. Foram confeccionados 63 discos de porcelana (Finesse; Dentsply Ceramco, Burlington, NJ). As amostras foram mantidas em água destilada por 5 min e colocadas no forno para a realização do autoglaze e em seguida divididos em 3 grupos, os dois lados do disco receberam acabamento com ponta diamantada de média granulação, para remover as irregularidades, sendo que um desses lados foi auto-glazeado tornando-se grupo controle o outro lado polido. Os três sistemas de polimento usados foram Jelenko polishing system (Heraeus kulzer, Armonk, NY), Sistema de polimento Axis dental (Axis dental irvington, Texas) e sistema de polimento brasseler (Brassiler-USA). Um lado de cada amostra foi removido o auto-glaze com broca diamantada e essa superfície foi polida com 1 dos 3 sistemas testados. No outro lado do disco, o auto-glaze foi usado como controle. O polimento foi realizado pelo mesmo operador até a superfície apresentar brilho a olho nu, simulando um procedimento clínico. A superfície de cada disco foi avaliada quantitativamente usando um profilômetro e qualitativamente usando MEV. Os resultados desse trabalho *in vitro* indicaram que o polimento mecânico na cerâmica Finesse pode produzir maior lisura de superfície do que o auto-glaze, como evidente pela redução do Ra e aparências visuais em MEV. O kit Axis produziu um melhor acabamento superficial do que Jelenko e Brasseler, avaliando a margem oclusal e

superfície do inlay de compósito resinoso e cerâmica após acabamento e polimento.

O efeito de vários tratamentos de superfície e técnicas de glazeamento foram relacionadas com relação à rugosidade e hidrofobicidade da superfície cerâmica por Aksoy et al. <sup>3</sup>. Nesse trabalho, após a confecção de trinta amostras de cerâmica Ceramo-II, estas foram aleatoriamente divididas em 5 grupos, onde avaliou-se o efeito de vários tratamentos: G1: brocas diamantadas (Ivoclar-Vivadent), G2: pedra abrasiva (Shofu dental) seguida por brocas diamantadas (Ivoclar-Vivadent), G3: polimento com ponta montada de borracha (Dedeco dental) seguida por broca diamantadas (Ivoclar-Vivadent), G4: polimento com 0,1 µm de pó de óxido de alumínio (Hunter Assoc.), seguido por broca diamantada (Ivoclar-Vivadent), e pedra abrasiva (Shofu dental), G5: Lixas com fina granulação (EC Moore) seguida por broca diamantada (Ivoclar-Vivadent), e pedra abrasiva (Shofu dental). Três amostras de cada um dos grupos foram divididas em 2 grupos: glazeamento e autoglaze onde se avaliou a relação entre a rugosidade final de superfície e o resultado da hidrofobicidade por análise da energia livre de superfície, usando medidas de ângulo de contato colocadas na superfície com os respectivos tratamentos. Os resultados mostram que o glazeamento prevalece sobre os diferentes procedimentos realizados na superfície e melhora a homogeneidade da lisura de superfície. Superfícies com autoglaze são menos lisas. Esses resultados sugerem que um glazeamento mostra esporádicas irregularidades de superfície e variação de ângulo de contato entre 35 e 50. O glazeamento deve ser preferido após procedimentos de superfície para obter uma lisura e boa energia livre de superfície.

Al-Wahadni et al. <sup>4</sup>, avaliaram, *in vitro*, as alterações na rugosidade superficial de diferentes cerâmicas glazeadas, não glazeadas e polidas. Amostras padronizadas das cerâmicas IPS Empress 2 e In-Ceram Alumina/Vitadur Alpha foram confeccionadas. As amostras foram desgastadas com rodas abrasivas e lixas de silicone a fim de se obter

superfícies planas, em seguida foram divididas conforme o polimento: glaze, polimento com diferentes pontas do Kit Shofu para porcelana e não glazeadas. Em seguida, as amostras foram avaliadas quanto à rugosidade superficial. Os resultados demonstraram diferenças significantes na rugosidade entre as cerâmicas e as técnicas. Observou-se menor rugosidade nas amostras glazeadas de IPS Empress 2 quando comparadas às não glazeadas; e com a seqüência de pontas do Kit Shofu. Rugosidades intermediárias, entre as amostras glazeadas e não glazeadas de IPS Empress 2, foram verificadas. Para as amostras de In-Ceram/Vitadur Alpha glazeadas, foi verificada menor rugosidade quando comparada às não glazeadas. A seqüência de pontas do Kit Shofu também promoveu rugosidades intermediárias, entre as amostras glazeadas e não glazeadas de In-Ceram/Vitadur Alpha. A rugosidade das amostras não glazeadas de IPS Empress 2 foi maior do que as amostras não glazeadas de In-Ceram/Vitadur Alpha.

Bottino et al.<sup>10</sup>, testaram a hipótese de que métodos de polimento mecânicos, das superfícies cerâmicas permite, uma rugosidade de superfície similar as superfícies glazeadas. Vinte e cinco discos de cerâmica Vitadur –Alpha (Vita Zahnfabrik-Alemanha) foram preparados de acordo com o fabricante. Todas as amostras foram glazeadas e aleatoriamente divididas em 5 grupos de acordo com acabamento e polimento: G1: glaze (Vita Akzent 24- Vita), G2: acabamento com broca diamantada, G3: G2 + polimento com silicone de borracha, G4: G3 + polimento com disco de feltro e pasta diamantada de polimento. Posteriormente a média de rugosidade de superfície foi calculada. A análise qualitativa foi feita em MEV. Com relação à rugosidade de superfície, G1 e G4 foram estatisticamente similares, G2 apresentou alta rugosidade seguido pelos grupos G3, G5, G4 e G1 em ordem decrescente. A hipótese foi parcialmente confirmada somente com o polimento mecânico (G4) produzindo rugosidade superficial similar a

superfície glazeada, apesar do acabamento e polimento serem procedimento tecnicamente críticos.

Camacho et al.<sup>15</sup>, observou a eficiência de diferentes veículos associados a pastas diamantadas indicadas para polimentos odontológicos (Crytar Paste- Kota Ind e Com. Ltda e Diamond Excel- FGM Produtos odontológicos, Brasil) associadas a quatro veículos: G1) Taça de borracha- Webbed Latch, Dent América, EUA, G2) Escova de Robinson- ( One Gross-Dent América Ind), G3) Roda de feltro (Mini Felt wheel Kota Ind e Com Ltda) e G4) Disco de feltro Super Snap Buff Discs- Shofu Inc, Japão) foram avaliadas. A cerâmica Ceramo II (Ceramo Inc. EUA) foi selecionada para confecção das amostras. A rugosidade superficial das amostras de cerâmica foi determinada pelo rugosímetro. Não houve diferença estatística significativa entre as pastas, de polimento avaliadas, contudo houve diferença estatística entre os veículos. A escova de Robinson, a Roda de feltro e o Disco de feltro foram veículos efetivos para serem usados em associação com as pastas de diamante. O uso da taça de borracha foi o veículo menos eficiente para polimento mecânico das superfícies cerâmicas.

Kantorski et al.<sup>37</sup>, compararam a média da rugosidade superficial das cerâmicas feldspáticas, alumina e zircônia, testando a hipótese de que a cerâmica feldspática tem baixa média de rugosidade superficial com relação às cerâmicas usadas para infra- estrutura. Oito amostras em forma de disco, (5mm de diâmetro, 2mm de espessura) de cada material cerâmico foi fabricado de acordo com as instruções dos fabricantes: V7: cerâmica feldspática veneer (VM7), VA: cerâmica feldspática veneer (Vitadur  $\alpha$ ); IA- Cerâmica vítrea infiltrada por alumina (Vita In ceram alumina); IZB- Bloco de cerâmica vítrea infiltrada por alumina e reforçada por zircôniam (Vita In ceram zircônia 2000 para Cerec In lab). Todos os materiais foram glazeados como recomendado pelo fabricante. Utilizando-se rugosímetro de ponta, realizou-se quatro leituras em cada amostras (n=8) e os valores de Ra foram estatisticamente

analisados. A V7 mostrou maior lisura de superfície do que VA e, não houve diferença estatística entre os valores médios de rugosidade das cerâmicas contendo alto conteúdo cristalino (IA, IZS, IZB).

Kou et al.<sup>39</sup>, avaliaram a rugosidade superficial de cinco diferentes cerâmicas para infraestrutura: Vita In –ceram Alumina, Vita In-ceram zircônia, IPS Empress 2, Procera All Ceram e Denzir, após acabamento e polimento por usando ponta rotatória diamantada e discos de polimento. Para o acabamento superficial foi utilizado brocas diamantadas de diferentes granulações: inicialmente a média (107 a 126  $\mu\text{m}$ ), seguido de um instrumento fino (76  $\mu\text{m}$ ) e um extra fino por último (46  $\mu\text{m}$ ). Em seguida, foi realizado polimento com discos Sof-lex com granulações de 100  $\mu\text{m}$ , 29  $\mu\text{m}$ , 14  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ . A rugosidade de superfície foi registrada utilizando um rugosímetro, antes e após acabamento com broca diamantada seguido de polimento com sistema Sof-Lex. A superfície foi avaliada qualitativamente, por MEV. Antes do acabamento, Procera All Ceram e Denzir tiveram uma superfície mais lisa enquanto IPS Empress 2 mostrou mais rugosa. Após o acabamento, todos os materiais, exceto IPS Empress 2 tornou-se mais rugosa. O polimento com disco Sof-lex foi melhor acabamento sem diferença significativa entre Denzir, Vita Mark II e IPS Empress 2 ou entre Procera e AllCeram e In ceram Zirconia. Não houve diferença significativa entre os grupos polidos com Procera All ceram ou In ceram alumina. O polimento da Denzir, TPS Empress 2 e In ceram zirconia, tornou a superfície mais lisa após o desgaste, enquanto o efeito do polimento em Procera All Ceram e In ceram zirconia não foi efetivo. Os resultados revelaram que, é recomendado, um sistema de polimento impregnado com diamantes produz superfícies mais lisas do que discos flexíveis.

Sarac et al.<sup>63</sup>, utilizando-se leituras de rugosidade e análise topográfica em MEV, observaram que as técnicas de polimento modificam a lisura da superfície da cerâmica feldspática Vitadur Alpha,

pois todas as amostras após diferentes métodos de acabamento e polimento mostraram significativa diferença de valores de rugosidade em relação ao grupo controle. A avaliação das técnicas de polimento mostrou que o uso do kit de polimento sozinho ou o uso de pasta ou aplicação de um bastão de polimento (bastão diamantado-shofu dental), criou superfícies tão lisas como amostras glazeadas. Puderam concluir, utilizando-se da análise em MEV que, as amostras do grupo pertencente ao kit de ajuste, sozinho ou em combinação com os outros materiais usados, mostrou uma micrografia com aparente lisura e poucos poros, que são inevitáveis em função da remoção do glaze pela broca diamantada e em função da técnica de manufatura da cerâmica, resultando em uma superfície rugosa. E que as partículas abrasivas do kit de ajuste por ser bastante duro, conseguiu retirar as irregularidades da superfície cerâmica e o uso da pasta de polimento melhorou o polimento se usada após o kit, pois sozinho, como visto pelo MEV não conseguiu tirar as irregularidades, concluindo que alta rugosidade foi observada no uso da pasta de polimento e bastão de polimentos quando usados sozinhos.

Tholt de Vasconcellos et al.<sup>76</sup>, avaliaram a rugosidade superficial de cerâmicas após diferentes técnicas de polimento intra-oral, utilizando microscopia de força atômica e o rugosímetro. Diferentes cerâmicas foram avaliadas: Vitadur Alpha, IPS Empress 2 e AllCeram. Espécimes cerâmicos padronizados foram confeccionados conforme as recomendações dos fabricantes, e submetidos a diferentes tratamentos de superfície: G1) glaze (controle); G2) glaze, desgaste e polimento com o sistema Eva; G3) glaze, desgaste e polimento com o sistema Identoflex; G4) glaze e polimento com o sistema Identoflex, 5) glaze, desgaste e polimento com o sistema Shofu. Os desgastes das amostras foram realizados com partículas diamantadas de 90 µm, 38 µm e 25 µm. Dois instrumentos de medição da rugosidade foram utilizados: rugosímetro e microscopia de força atômica. Para o padrão Ra no rugosímetro a cerâmica IPS Empress 2 apresentou-se mais lisa nos grupos 1, 3, 4 e 5

do que no grupo 2. As cerâmicas Vitadur Alpha e AllCeram apresentaram-se mais lisas nos grupos 1, 2, 4 e 5 do que no grupo 3. Considerando o padrão Ry no rugosímetro, a cerâmica AllCeram 3 foi mais rugosa no grupo 3 quando comparada aos demais grupos (1, 2, 4, 5), e considerando somente o grupo 3, a cerâmica AllCeram 3 foi mais rugosa do que as cerâmicas IPS Empress 2 e Vitadur Alpha. Para o padrão Ra no microscópio de força atômica, a cerâmica IPS Empress 2 foi mais rugosa no grupo 2, seguido do grupo 3; não houve diferenças entre os grupos 1, 4 e 5. Para a Vitadur Alpha, o grupo 1 foi mais liso quando comparado aos grupos 2 e 5. A All Ceram obteve superfície mais rugosa no grupo 3 do nos grupos 1, 2 e 4. Com relação ao parâmetro Ry no microscópio de força atômica, nas três cerâmicas as superfícies do grupo 1 apresentaram mais lisas, seguidas do grupo 4. A cerâmica IPS Empress 2 foi mais rugosa que a Vitadur Alpha e All Ceram no grupo 2. O grupo 3 da Vitadur Alpha teve superfície mais lisa que a AllCeram.

### **2.3 Formação, *in situ*, de biofilme dentário em materiais restauradores**

Utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão, Lie et al. <sup>41</sup>, estudaram a morfologia da película adquirida adsorvida sobre resina epóxi e hidroxiapatita, após 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h na cavidade bucal. Três tipos morfológicos diferentes de película foram observados. A película globular observada nos estágios iniciais continha estruturas redondas e ovais em íntimo contato com a superfície dos materiais, ou mostrando inserção por estrutura semelhante a um pedículo. Na maioria dos casos, apresentou regularidade, mas também foi visualizada com glóbulos apresentando diversidade de forma e dimensão. Seu crescimento ocorreu, em alguns casos, pelo aumento da espessura,

e, em outros casos, os glóbulos foram cobertos por camada granular que mascarava seus contornos proporcionando aparência mais densa e homogênea. A película fibrilar foi caracterizada como uma mistura de grandes e pequenos glóbulos conectados por uma rede fibrilar. O terceiro tipo de película foi observado como um filme liso e homogêneo. Em algumas amostras dos materiais, mesmo após 24 e 48 h, a película adquirida apresentava-se de várias formas o que justificava sua divisão em diferentes tipos. Gradual aumento na espessura foi observado nas primeiras 6 h. Entre 6 e 12 h, houve leve redução, e a partir de 12 h, novamente foi observado aumento da espessura.

Lie et al.<sup>42</sup>, estudou morfologia do biofilme dentário formado sobre amostras de hidroxiapatita, em seis indivíduos com adequada higiene bucal, por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Após 2 h no ambiente bucal, as amostras de hidroxiapatita apresentaram-se cobertas por fina película. Bactérias foram regularmente visualizadas após 4 e 6 h, sendo células individuais ou pequenos agregados de células com mesma morfologia. As primeiras bactérias foram cocos gram positivos, mas bastonetes curtos também foram encontrados. A película apresentou-se com aspecto globular, granular ou fibrilar. O modo mais freqüente de adesão dos microrganismos foi pelo contato direto da parede celular bacteriana e a película. Bactérias também foram visualizadas a alguma distância da superfície da película, mas com finas fibrilas entre a parede celular e a película. Microrganismos também foram observados totalmente embebidos na película. Pequenas irregularidades na superfície do dispositivo de resina epóxi utilizado para fixação das amostras de hidroxiapatita, foram rapidamente cobertos por material similar ao da película, e nas irregularidades mais amplas, colonização bacteriana foi observada. Caracteristicamente, as bactérias apresentam-se mais densamente agrupadas nesses defeitos quando comparadas às áreas lisas.

de Wet ; Ferreira <sup>20</sup>, avaliaram a formação do biofilme dentário sobre resina composta não glazeada, glazeada ou polida. Amostras padronizadas de resina composta foram confeccionadas e divididas em grupos de acordo com o tipo de acabamento e glaze: 1) polimerizada sobre placa de vidro; 2) polida com broca diamantada; 3) glazeadas com Adaptic Glaze; 4) glazeadas com Concise Enamel Bond; 5) glazeadas com Nuval-Seal; 6) glazeadas com Finite. Em seguida, uma amostra de cada grupo foi selecionada e submetida à escovação manual com escova dental nova e, dentifrício por, 500 e 5000 ciclos. A rugosidade superficial das amostras submetidas ou não à escovação foi examinada. Avaliação da formação de biofilme *in situ*, foi realizada em 100 pacientes com restaurações classe IV. A superfície vestibular do dente restaurado foi dividida em duas partes, sendo A – glazeada e B – não glazeada. A presença ou ausência de placa foi avaliada em 3 meses, 6 meses e um ano. Também foi realizada a comparação da formação de placa em uma paciente que permaneceu sem realizar higiene bucal por 10 dias. Os resultados demonstraram que amostras glazeadas apresentaram média de rugosidades superficiais menores quando comparada às amostras não glazeadas. Superfícies cobertas pelo glaze Finite foram significativamente mais rugosas do que as superfícies cobertas pelo outros glazes, polidas ou polimerizadas sobre placa de vidro. Após cinco mil ciclos de escovação, os glazes Concise Enamel Bond e Nuval-Seal apresentaram aumento da rugosidade superficial. O mesmo foi observado na superfície da resina composta que foi polimerizada sobre placa de vidro. *In situ*, foi observada pouca evidência de acúmulo de biofilme sobre superfícies glazeadas (parte A). Nas superfícies não glazeadas (parte B), a quantidade de biofilme aderido foi significativa. Quantidades similares de biofilme formaram-se sobre os diferentes glazes, exceto para o glaze Finite que apresentou maior quantidade de biofilme depositado após três meses.

Para Brex M. et al. <sup>12</sup>, o crescimento de placa pode ser resultado da proliferação da bactéria sempre presente no dente e /ou uma contínua deposição de bactérias adicionais da saliva. Assim propuseram estudar a relativa significância desses dois mecanismos. Durante 4, 8 e 24 h, placa foi formada em filmes plásticos colocados da superfície vestibular de pré molares. Filtros que recobriam esse filme plástico permaneceram por 4 ou 20 h. Após a remoção as amostras foram analisadas em MEV. Após 4 h o filme plástico estava recoberto por material acelular, ou bactéria, células epiteliais e leucócitos. Após 8 h, as amostras apresentavam a mesma arquitetura, mas contendo maior quantidade de componente celular. Em 24 h, a placa consistiu de múltiplas camadas de bactérias. Os dados indicaram que, o número de bactéria aumentou entre 4 e 8 h e que não teve diferença no número de bactérias observado nas amostras de 8 hs com ou sem filtro. Os resultados indicam que, a proliferação da massa de bactérias no dente aumenta durante a formação inicial de placa, ou seja, entre 8 e 16 h.

Em um estudo clínico, Chan; Weber <sup>14</sup>, avaliaram a retenção do biofilme dentário sobre dentes naturais e coroas totais de diferentes materiais restauradores. Participaram do estudo 19 pacientes que haviam recebido coroas totais de cerâmica (Cerestore) nos últimos 14 meses. A cimentação mais recente destas coroas foi a quatro semanas do início do estudo. Dois examinadores realizaram a avaliação do índice de placa de acordo com Silness; Løe (1964). Foram avaliadas coroas de Cerestore, coroas metalo-cerâmicas, de ouro e de resina acrílica. Como controle, dentes hígidos foram incluídos. Foi observado que no mesmo paciente havia diferenças nos índices de placa nos quadrante, confirmando que algumas áreas são higienizadas de forma mais adequada que outras. Por este motivo, o índice de placa de uma coroa foi comparado com o índice de placa do quadrante a que estava inserida. Os resultados demonstraram que o índice de placa da coroa em relação ao seu quadrante foi de 32% para as coroas de Cerestore, 90% para as

metalo-cerâmicas, 148% para as de ouro e 152% para as coroas de resina e acrílica. Já os dentes naturais apresentaram valores de 110%. Segundo os autores, a alta taxa de biofilme encontrada na coroas metalocerâmicas pode ter ocorrido devido ao fato de que a maioria apresentava somente a face vestibular coberta por cerâmica e as demais cobertas com metal. Coroas de ouro acumularam mais biofilme que o esperado, provavelmente porque foram utilizadas em áreas posteriores não estéticas e também mais difíceis de serem higienizadas. Coroas de Cerestore foram utilizadas em áreas anteriores e posteriores e mantiveram baixo índice de biofilme em qualquer localização.

Com o objetivo de examinar, a colonização microbiana inicial do esmalte e superfície radicular *in vivo* e comparar esses resultados com o uso do MEV, Nyvad; Fejerskov <sup>48</sup>, avaliaram a colonização microbiana inicial (4 a 48 h), sobre esmalte e superfície radicular utilizando MEV e MET. Amostras de esmalte e superfície radicular, foram fixadas na face vestibular de dispositivos bucais confeccionados para seis voluntários. Nas primeiras 8 h, os indivíduos realizaram bochechos com solução de sacarose a 10% por dois minutos, logo após a colocação do dispositivo e em intervalos de uma h e trinta minutos sem ingestão de alimentos. Posteriormente, para períodos breves de alimentação, o dispositivo foi removido e mantido em umidade. Nenhum procedimento de higiene bucal foi realizado. Em 4 h de exposição bucal, as superfícies de esmalte encontraram-se parcialmente cobertas por material granular, que foi particularmente evidente nas áreas irregulares. Poucos cocos foram visualizados nas áreas irregulares. Após oito hs, micro-colônias de cocos e bastonetes foram visualizadas nas irregularidades. As bactérias dispersas foram observadas no restante da superfície. Em 12 h, o número de colônias bacterianas aumentou de forma significativa. Proliferação bacteriana em monocamada foi observada, colônias vizinhas pareciam se fundir. Contudo, cobertura bacteriana total da superfície não foi verificada devido à presença de

matriz inter-microbiana entre as bactérias. Concluíram assim que, tanto no esmalte quanto na superfície radicular o estágio inicial de colonização bacteriana foi caracterizada pela absorção de bactérias em forma de cocos, no interior da película, e que após 12 h, a colonização bacteriana aumentou significativamente. A presença de múltiplos microrganismos, com septo, sugeriu que o aumento da microbiota poderia ser parcialmente devido à divisão celular bacteriana. Após 48h, a superfície dental foi completamente recoberta por um fino depósito microbiano, variável na superfície total e entre os indivíduos. Na superfície radicular, a distribuição da microbiota, foi mais homogênea e com pouca diferença foi registrado entre os espécimes. Quantitativamente, a superfície radicular foi sempre mais colonizada que a superfície dental.

A avaliação de biofilme dentário formado sobre coroas totais de diferentes materiais restauradores foi realizada por Adamczyk; Spiechowicz <sup>1</sup>. Inicialmente, 20 pacientes que precisavam de tratamento restaurador receberam coroas totais de resina acrílica, liga de prata / paládio e cerâmica (Vita VMK 68). Através do índice de placa e técnica de visualização fluorescente, foi avaliada a quantidade de biofilme formado sobre toda a dentição em vários períodos após a cimentação (1, 3, 24, 48 h, 3 e 7 dias). Raspagem e limpeza, foram realizadas após cada avaliação. Na segunda parte do estudo, três tipos de restaurações (metálica, resina acrílica, cerâmica), foram realizadas em dez pacientes e cimentadas, provisoriamente. A quantidade de biofilme formado sobre as coroas provisórias foi avaliada nos períodos de 1, 3 e 24 h através de MEV. Amostras de biofilme coletadas em 24 h foram avaliadas quanto a sua composição química. Os resultados demonstraram que superfícies dentárias naturais de pacientes que receberam restaurações cerâmicas apresentaram menos biofilme em todos os períodos. Os achados com MEV confirmaram os resultados clínicos. Coroas metálicas apresentaram maior quantidade de biofilme distribuído de forma densa. Coroas de resina acrílica também apresentaram grande quantidade de biofilme, mais

frouxamente distribuído. Nas coroas cerâmicas, o biofilme apresentou-se mais frouxamente distribuído e em menor quantidade.

A formação de biofilme dentário *in situ*, sobre vários materiais restauradores foi avaliada por Siegrist et al.<sup>69</sup>. Três indivíduos, que necessitavam de tratamento protético (prótese fixa com pântico) foram selecionados. Facetas de ligas de prata-paládio (AgPd), de cromo-cobalto (CrCo), de cromo-cobalto-titânio (CrCoTi), de ouro a 50% e 85%, amálgama, cerâmica, esmalte e dentina foram fixadas da face vestibular dos pânticos. Foram realizadas avaliações microbiológicas e MEV do biofilme formado sobre as facetas após 4 e 24 h. Durante estes períodos, nenhum procedimento de higiene bucal foi realizado e os pacientes seguiram suas dietas normais. Os resultados microbiológicos indicaram que de 4 para 24 h houve aumento de trinta vezes na contagem total de bactérias. Em ambos os tempos e para todos os materiais, a microbiota consistiu principalmente de cocos e bacilos facultativos. Os bacilos facultativos Gram-positivos encontrados foram principalmente espécies de *Actinomyces*. Microrganismos anaeróbios foram detectados em porcentagens muito baixas. Após 4 h, a dentina apresentou mais alta contagem total de bactérias seguida pelo amálgama. No MEV, foi observado que o amálgama e o esmalte acumularam mais biofilme, seguidos pela cerâmica e ligas. Em 24 h, o amálgama foi o material que acumulou a maior quantidade de biofilme, seguido pela liga de AgPd, esmalte, dentina, cerâmica e liga de ouro a 85%. As ligas de ouro a 50%, de CrCo e de CrCoTi acumularam a menor quantidade de biofilme. Foi concluído que a cerâmica, a liga de AgPd e as duas ligas de ouro foram os materiais que acumularam menor número de células bacterianas com valores próximos aos verificados no esmalte e dentina.

O objetivo de Gatewood et al.<sup>23</sup>, foi caracterizar e comparar utilizando MEV, a maturação da placa microbiana subgengival no esmalte e titânio polido e a placa subgengival com amostras de

cimento, titânio com aplicação de plasma e superfície de hidroxiapatita. Amostras foram obtidas de implante de titânio e de terceiros molares inclusos seccionados. Dez pacientes após tratamento com profundidade de bolsa maior que 6 mm. As amostras de esmalte e titânio foi posicionada na região supra-gengival e as amostras de cimento, titânio com plasma e superfície de hidroxiapatita foram posicionadas na região subgengival. Os paciente foram instruídos a não realizar a higiene oral, as amostras foram removidas no período de 1, 3, 5, 7, e 10 dias. As amostras foram analisadas em MEV em cada intervalo de tempo. A seqüência da aparência de vários morfotipos microbianos em placa sub e supragengival independentemente da superfície. Tanto a placa supra como subgengival, dependendo do intervalo de tempo, cocos, bastonetes de vários tamanhos, organismos filamentosas, fusiformes, espiroquetas. Isso indica que a superfície natural do dente, titânio polido e titânio com plasma e hidroxiapatita suporta a maturação da placa microbiana com inclusão sucessiva de uma variedade de morfotipo.

A formação do biofilme dentário e a vitalidade de bactérias sobre materiais restauradores foram avaliados por Hahn et al.<sup>25</sup>. Facetas de cerâmicas (Dicor, Flexo-Ceram), cimento resinoso e esmalte dentário humano, foram fixadas na área interproximal de *inlays* de dez pacientes. A extensão vertical das facetas foi padronizada para terminar a 1mm coronal a gengiva inter-proximal e a extensão horizontal foi determinada pela extensão da cada *inlay* individual. Após três dias de acúmulo de biofilme, amostras dos materiais foram removidas e o biofilme foi coletado com cureta estéril. Uma alíquota foi utilizada para avaliar a contagem total de bactérias em microscopia de campo escuro e outra para avaliar as unidades formadoras de colônias (UFC). Por meio da técnica de fluorescência vital, foi avaliada a contagem total de bactérias viáveis sobre os materiais. Os resultados mostraram que ambas as cerâmicas avaliadas apresentaram valores significativamente mais baixos de UFC e

contagem total de bactérias quando comparadas ao esmalte ou cimento resinoso.

Castellani et al.<sup>17</sup>, estudaram a formação do biofilme dentário inicial sobre cerâmica feldspática (Vita Zahnfabrik GmbH) e cerâmica vítrea (Dicor). Dez indivíduos, sem sinais de doenças bucais, foram selecionados para o estudo. Amostras padronizadas, glazeadas e não glazeadas da cerâmica feldspática, e caracterizada e não caracterizada da cerâmica vítrea, foram confeccionadas. Estas amostras foram seccionadas em duas partes iguais e fixadas na face vestibular de um dispositivo bucal individualizado. Os indivíduos usaram o dispositivo por períodos de 4, 12, 24 e 48 h, nos quais nenhum procedimento de higiene bucal foi realizado. O biofilme foi obtido da superfície das amostras e também do esmalte de dentes hígidos. A cultura bacteriana foi realizada para determinar o número de bactérias aeróbias e anaeróbias presentes. Os resultados indicaram que, incluindo o esmalte, todos os materiais mostraram um aumento progressivo de microrganismos aeróbios e anaeróbios. As superfícies mais rugosas apresentaram maior número de bactérias quando comparadas as superfícies mais lisas dos materiais correspondentes (cerâmicas vítrea caracterizada e cerâmica feldspática glazeada) no intervalo de 12 e 24 h. Nenhuma diferença foi encontrada entre o número de bactérias aeróbias e anaeróbias sobre cerâmica vítrea caracterizada e cerâmica feldspática glazeada ou entre a cerâmica vítrea não caracterizada e cerâmica feldspática não glazeada neste mesmo intervalo. Maior número de microrganismos foi relacionado à rugosidade superficial e não ao tipo de material.

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada por Hannig et al.<sup>26</sup>, para estudar a formação da película adquirida *in vivo*, sobre amostras de esmalte bovino e materiais restauradores (amálgama, liga fundida, cerâmica feldspática e vítrea, resinas compostas particuladas, resinas compostas não particuladas e resinas acrílicas).

Foram selecionados 3 voluntários, não usuário de droga, nicotina, sem uso de medicamentos, e com ausência de distúrbios salivares, ausência de cárie ou restaurações em más condições. Os participantes assinaram o termo de consentimento. Amostras de dente bovino, amalgama, titânio e resina composta, cerâmica feldspática (VITA VMK 68) e cerâmica vítrea DICOR. Estas amostras foram colocadas em um dispositivo na face vestibular e lingual dos três pacientes. Imediatamente, após as duas hs de uso, as amostras foram retiradas e lavadas com água destilada, e seguido o método de fixação para visualização em microscópio eletrônico de transmissão. Amostras dos materiais foram submetidas ao mesmo procedimento de polimento e fixadas em dispositivos bucais usados por três indivíduos. Não foram observadas diferenças na película adquirida formada nos diferentes materiais. O presente estudo utilizou microscópio eletrônico de varredura para mostrar, em um primeiro momento, o padrão morfogenético e ultraestrutural da formação da película salivar formada nos materiais restauradores *in situ*. Contudo, diferenças foram verificadas entre amostras fixadas na face vestibular e palatina do dispositivo. Após 2 hs, as superfícies de todas as amostras fixadas na face palatina do dispositivo estavam cobertas por fino filme micro-granular. Próximo à superfície dos materiais foi observada uma camada basal eletro-densa e superficialmente uma camada granular homogênea menos densa. A espessura da película formada sobre as amostras palatinas raramente excedia 100nm depois de 6 hs. As amostras vestibulares foram cobertas por camada basal granular fina de alta densidade eletrônica. Sobre esta camada, uma segunda camada heterogênea de baixa densidade eletrônica estava presente. Em 2 e 6 hs, a espessura variou de 100 a 1000nm.

Rimondini et al <sup>61</sup>, avaliaram a colonização bacteriana *in vivo* sobre amostras de titânio com diferentes rugosidades superficiais, após 24 h. Foram confeccionados 48 discos de titânio com 4mm de diâmetro que foram divididos em 3 grupos de acordo com o polimento:

Grupo A foi polido com disco de polimento impregnado com pasta diamantada (3  $\mu\text{m}$ ) e com ponta de borracha com óxido de sílica com grânulos de 0,04  $\mu\text{m}$ ; Grupo B foi polido com disco de polimento impregnado com pasta diamantada (6 $\mu\text{m}$ ); e Grupo C foi jateado com abrasivo de 200  $\mu\text{m}$ . Uma amostra de cada grupo foi fixada em um dispositivo usado por 8 voluntários. A rugosidade, quantificação e morfologia bacteriana, foi avaliada em MEV após as amostras serem processadas. A soma das cinco áreas de cada amostra, recebeu a classificação do escore que pertencia. O grupo A apresentou menos bactéria que o grupo B e este menos bactéria que o grupo C. Cocos foram observados em todos os grupos enquanto bastonetes foram encontrados em diferentes quantidades entre os grupos. O grupo A foi significativamente mais liso que o grupo B e C. Foi concluído que a superfície do titânio com Ra menor ou igual a 0.08  $\mu\text{m}$  e Rz menor ou igual 1.02  $\mu\text{m}$  apresentam forte acúmulo e maturação da placa em 24 h. Concluindo que, nas amostras lisas, houve menor acúmulo de bactérias, sendo que somente cocos foram verificados. Nas amostras com rugosidade intermediária, foram encontrados bastonetes curtos e longos. Nas amostras rugosas, caracterizadas pela presença de ranhuras e depressões, foram observados bastonetes longos agregados ou em camadas.

Rasperini et al. <sup>60</sup>, avaliou por meio de métodos microbiológicos e MEV, o processo de colonização bacteriana e formação de placa no abutment de titânio e cerâmica Ceradapt (Nobel Biocare). Foram selecionados 4 voluntários, sem problemas periodontais, que usaram dispositivo removível para facilitar a higiene oral porém sem escovação do dispositivo com 8 amostras de cerâmica altamente polida e de titânio foram fixadas. Duas amostras de cada material foram retiradas no período de 6 e 24 h e 7 a 14 dias. Uma amostra de cada período foi congelada para análise microbiana e as outras amostras para análise em MEV após fixação em etanol 75%. A análise comparativa dos 2 materiais

testados revelou pouca diferença significativa na quantidade de colonização bacteriana após 24 h, a maior parte da colonização já estava presente em ambos os materiais, atingindo o nível máximo de colonização após 7 dias. Esse estudo demonstrou, que o abutment de titânio e cerâmica, mostram propriedades muito similares com relação à colonização da microbiota oral.

A formação de biofilme dentário inicial, sobre esmalte e materiais restauradores foi avaliada, por meio de microscopia eletrônica de transmissão por Hannig et al.<sup>26</sup>. Amostras de esmalte, amálgama, ligas fundidas, titânio, cerâmicas feldspáticas, cerâmica vítrea, resinas compostas e resinas não particuladas foram fixadas na área vestibular e palatina de dispositivos bucais confeccionados para três indivíduos com adequado padrão de higiene bucal. O dispositivo foi usado por 24 h, sendo removido durante as refeições e armazenado em ambiente com 100% de umidade. Após as refeições, os indivíduos realizaram a higiene bucal sem dentífrico, sendo que nenhum procedimento de limpeza foi realizado no dispositivo. Após 24 h, as amostras foram removidas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados não indicaram diferenças quanto ao biofilme inicial nos diferentes materiais. Contudo, foram observadas diferenças no biofilme entre amostras fixadas na vestibular e palatina do dispositivo. Amostras palatinas apresentaram-se completamente cobertas por película granular homogênea. A colonização pareceu não se estender para as áreas lisas. Poucos cocos isolados foram verificados nestas áreas. Em todas as amostras vestibulares, havia várias camadas de microrganismos que cobriam parcialmente ou totalmente a superfície. Cocos predominaram. Agregação bacteriana ou adesão às superfícies foi mediada por filamentos da parede celular. Foi concluído que a formação inicial do biofilme parece ser influenciada mais pelo ambiente bucal do que pelas propriedades dos materiais

Takeuchi et al.<sup>75</sup>, determinaram a formação estrutural do biofilme formado pela microbiota oral, na superfície da hidroxiapatita. As amostras foram aderidas a superfície vestibular dos molares superiores e inferiores de 8 voluntários por 2 a 4 dias e de 20 voluntários de 8 a 21 dias. Os MEVs das amostras foram realizados na secção vertical dos discos. Durante a colonização inicial (fase de pré-organização) foram formados por cocos, enquanto, na fase de pós-organização, foram formados por bacilos. Na colonização secundária (após o sétimo dia) células filamentosas foram encontradas tanto na fase de pré como de pós-organização. A co-agregação entre microrganismos organizou a estrutura do biofilme em forma de fibras e a colonização secundária filamentosa, foi caracterizada pela indução da co-agregação.

A colonização bacteriana foi avaliada *in situ* sobre superfície da cerâmica do tipo zircônia tetragonal estabilizado por ítria (Y-TZP) e titânio por Rimondini et al.<sup>62</sup>. Para o estudo, 10 indivíduos com bom padrão de higiene bucal foram selecionados. Um dispositivo de silicone foi desenvolvido para a fixação das amostras na região de molar e pré-molar na face vestibular superior, usado por 10 voluntários por 24 hs, sendo que nenhum procedimento de higiene bucal foi realizado. A seguir, as amostras foram removidas e processadas, para análise em MEV. Cinco campos (20 x 25 µm) foram aleatoriamente selecionados de modo que uma área total de 100 x 125µm foi avaliada em cada amostra. Para cada área visualizada, as variáveis registradas eram: presença (=1), ou ausência(=0) de cocos, bastonetes curto (menor que 10 µm) e bastonetes longos (maior que 10 µm). *S. mutans* aderiu mais à cerâmica de zircônia quando comparado ao titânio, enquanto *S. sanguis* pareceu aderir mais facilmente ao titânio. Nenhuma diferença foi observada quanto à adesão de *P. gingivalis* e *Actinomyces*. Amostras de Y-TZP acumularam menor quantidade de bactéria, a superfície de titânio teve prevalência de cocos, poucos bastonetes curtos e nenhum bastonete longo, sugerindo uma formação imatura de placa. O polimento da Y-TZP, não foi

estatisticamente satisfatório com relação à diminuição de microrganismos formados. Portanto, Y-TZP pode ser considerado um material promissor na confecção de abutment.

Tanner et al.<sup>73</sup>, compararam dois diferentes compostos de fibra reforçada (vidro e polietileno), cerâmica dental e compósito resinoso, com relação à formação inicial de placa *in situ*. Amostras em forma de discos tiveram a superfície dos materiais desgastada com irrigação e em seguida, polida com pontas de silicone. A rugosidade de superfície (Ra) foi medida anteriormente ao estudo, a média dos valores de rugosidade após o polimento das amostras foi de 0,05  $\mu\text{m}$ , para cerâmicas, 0,05  $\mu\text{m}$ , para compósito resinoso, 0,07  $\mu\text{m}$ , para compósito reforçado por fibra de vidro e 0,51  $\mu\text{m}$ , para compósito reforçado por polietileno. A superfície do polietileno foi a que apresentou rugosidade mais significativa. As amostras foram aleatoriamente distribuídas entre o primeiro e segundo pré-molares superiores de 14 voluntários com boa saúde bucal. Não houve escovação da área e nem uso de antimicrobianos. Amostras de placa foram coletadas 24 h após a fixação dos espécimes. *S. mutans* e bactérias facultativas foram cultivadas. Com relação, a contagem de *S. mutans* e bactérias facultativas, polietileno mostraram uma maior contagem e cerâmica mostrou uma menor contagem. O compósito de fibra reforçado por vidro apresentou semelhança aos materiais restauradores com relação à aderência de *S. mutans* e o acúmulo de placa.

Scott et al.<sup>65</sup>, com o objetivo de avaliar o efeito do procedimento de polimento da superfície cerâmica, compararam a cerâmica do tipo zircônia tetragonal estabilizada por ítria (Y-TZP). glazeada e polida com relação colonização bacteriana inicial, sendo assim, 20 amostras, em forma de discos, foram confeccionadas. Dois voluntários, com alto nível de higiene foram selecionados para o estudo. Um dispositivo oral fixado nos pré-molares e molares foi confeccionado para cada voluntário. Amostras da cerâmica polida e glazeada foram fixadas no dispositivo por vestibular e lingual. Após 20 min e 1h as

amostras foram removidas do meio bucal e imediatamente processadas para análise em MEV. As amostras glazeadas mostraram maior irregularidade do que amostras polidas. Deposição de material granular foi verificada em todas as amostras, nos dois períodos analisados. O material granular recobriu mais intensamente as áreas irregulares e essa espessura aumentou após 1h. Após uma h, foi verificado que a espessura de material depositado foi maior em amostras fixadas na região vestibular do que lingual. Não houve diferença observada com relação à morfologia bacteriana em nenhum tempo do estudo. Bactérias em forma de cocos e bastonetes prevaleceram. Dessa forma a superfície glazada mostrou maior tendência a acumular placa.

Scott et al.<sup>66</sup>, avaliaram o efeito da superfície glazeada e polida da cerâmica do tipo zircônia tetragonal estabilizada por ítria (Y-TZP Lava System- 3M) , bem como o efeito da remoção das bactérias aderidas. Dois voluntários usaram o dispositivo com amostras polidas e glazeadas fixadas do lado direito e esquerdo. Após 20 min, 1 h e 6 h os voluntários realizaram a escovação de ambos os lados do dispositivo. As amostras foram analisadas em MEV. O material granular foi verificado nas amostras especialmente nas superfícies irregulares. Após uma h não houve diferença estatística entre a superfície glazeada (Glaze G-4040-3M ESPE) e a superfície polida com disco de borracha, por 10 s (3-Step Silicon- Silishine LC), com relação a presença de bactérias. Entretanto a superfície glazeada mostrou acumular mais biofilme e a escovação não removeu, completamente, o biofilme. Superfícies polidas podem ter tendência a acumular menos biofilme.

Pereira et al.<sup>52</sup>, avaliaram *in situ* a colonização bacteriana inicial em cerâmicas feldspáticas submetidas a diferentes glazamentos. Utilizando as cerâmicas feldspáticas VM7 e VM13 (Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha), foram confeccionadas 28 amostras (24 para análise do biofilme e 4 para análise da topografia da superfície). As amostras foram submetidas a dois diferentes métodos de glazamento e

foram divididas em 4 grupos: VM7 com aplicação do glaze Vita Akzent (G1), VM7 com auto-glaze superficial (G2), VM13 com aplicação do glaze Vita Akzent (G3), VM13 com auto-glaze superficial (G4). Seis indivíduos com boa saúde oral usaram um dispositivo oral por 8 h com as 4 amostras fixadas. As amostras foram analisadas em MEV utilizando 5 campos (20 x 25 µm) que foram aleatoriamente selecionadas de modo que uma área total de 100 x 125µm foi avaliada em cada amostra. O valor de cada amostra foi somado para chegar ao resultado final. Uma amostra de cada grupo foi analisada em MEV para observar o padrão de topografia. Foi encontrada diferença com relação a colonização bacteriana entre as cerâmicas feldspáticas e entre os tipos de glaze utilizados. O padrão de topografia da superfície da cerâmica mostrou ter influenciado na colonização bacteriana.

#### **2.4 Análise do biofilme em Microscopia Confocal Laser**

O microscópio confocal de varredura a laser (MCVL) é um microscópio fluorescente que permite que o laser atravesse a amostra para que ocorra sua varredura interna. Essa penetração do laser permite a excitação dos fluoróforos presentes nos corantes, resultando na liberação de energia fluorescente, que é detectada pelos tubos fotomultiplicadores, que registram essa excitação. O escaneamento é controlado por um microprocessador que coordena a leitura e a transferência de dados ao computador para produção da imagem digital. As imagens digitais na secção óptica sagital (x-y), produzidas em série ("stacks"), são automaticamente coletadas. A série de imagens pode ser processada por computador para criar reconstruções tridimensionais <sup>49</sup>.

As vantagens do uso da microscopia confocal seriam: melhor resolução em função da perda de luz ser significativamente

reduzida devido à abertura confocal (pinhole), boa performance da microscopia em 3D, o seccionamento óptico que evita que ocorra a interferência da parafina na amostra, durante o seccionamento mecânico, impedindo assim, que ocorra distorção durante o corte mecânico e como última vantagem, o seccionamento óptico para MCVL ser de 1  $\mu\text{m}$  já o mecânico é de 8  $\mu\text{m}$  <sup>16</sup>.

Dessa forma, a MCVL tem provado ser ideal para estudar o biofilme microbiano, pois permite a análise de biofilmes *in situ*, ou seja, de forma hidratada e sem nenhum tipo de fixação química ou técnica de inclusão. Essa característica acoplada com a habilidade em digitalizar as imagens ópticas de secções finas, de locais específicos do biofilme, e livres de interferências ópticas fora de foco (fora da abertura pinhole), permite a observação espacial no eixo horizontal (xy) e sagital (xz), que existe entre a bactéria, seus produtos extracelulares e seu meio <sup>85</sup>.

O programa COMSTAT é capaz de analisar as imagens tri-dimensionais obtidas em MCVL pela soma das secções ópticas de cada imagem. Na análise quantitativa realizada por esse programa, o operador estabelece um valor de limiar para cada conjunto de secções ópticas (isto é, para cada amostra do biofilme). Este limiar auxilia o programa na identificação da presença ou ausência de biomassa em cada *pixel* de cada imagem. Portanto, o operador analisa as secções de todas as amostras e seleciona um limiar em que apenas o biofilme possa ser quantificado pelo programa, fazendo com que o *background* (plano na superfície que o biofilme está depositado), seja identificado, e transformado em fundo preto. Assim, quando cada secção for convertida em imagem preta e branca, pelo programa, os *pixels* brancos significam a presença de biomassa e os pretos, a ausência de biomassa. Em seguida, seleciona -se as ferramentas do programa para quantificar as propriedades do biofilme <sup>28</sup>.

Assim, a caracterização quantitativa da característica estrutural do biofilme é uma ferramenta valiosa para estudar a resposta e

o comportamento do biofilme. Atualmente, a MCVL é uma ferramenta de escolha para estudar os biofilmes diretamente no seu habitat natural (*in situ*)<sup>49;71;47;81</sup>, devido sua característica não invasiva e não destrutiva.

Lawrence et al.<sup>40</sup>, usaram a MCVL para visualizar o biofilme totalmente hidratado. O objetivo desse estudo foi analisar a arquitetura e identificar os componentes significantes da estrutura do biofilme, para facilitar a análise quantitativa e investigação, já que a MCVL permite uma melhor análise quantitativa da estrutura. A melhor visualização deu-se em função do maior zoom e ausência de imagens fora de foco fazendo com que essa microscopia forneça melhores resultados para a análise de células bacterianas vivas do que a microscopia convencional. As secções ópticas da MCVL foram acessíveis para o aumento da quantidade de análises microscópicas computadas com a mínima interferência, localizadas abaixo ou acima do material celular. O uso do MCVL, em conjunto com a técnica de coloração fluorescente, permitiu o seccionamento horizontal (xy) e sagital (xz) de biofilmes intactos de *P.aeruginosa*, *P. fluorescences* e *V. parahaemolyticus*. A secção foi obtida pela técnica do processamento de imagens permite avaliar a distribuição de áreas celular e não celular dentro da matriz do biofilme. O biofilme dessas três diferentes espécies exibiu distintos arranjos e maiores componentes estruturais de material celular e acelular. Os resultados demonstraram o potencial do MCVL para imagens não invasivas do biofilme intacto e confirmam o efetivo aumento na resolução de imagens mais profundas e imagens do campo, eliminando imagens fora de foco através do uso do MCVL. As células obtidas na MCVL são facilmente detalhadas, permitindo a determinação do número, a área e biomassa celular. Pois, as células, situadas em todas as camadas da massa do biofilme, são claramente visíveis sem nenhuma interferência de imagens fora de foco proveniente da camada celular abaixo ou acima da visualizada ou proveniente de materiais não celulares. Os biofilmes maduros, não mostraram evidência de microcolônias

distintas, indicando redistribuição de células no interior do biofilme durante o desenvolvimento.

A primeira pesquisa que avaliou biofilme dentário, utilizando a técnica de fluorescência vital, em conjunto com análise em microscópio confocal laser, foi realizada em 1998 por Netuschil et al <sup>46</sup>. O objetivo de seu trabalho foi provar a combinação praticável de duas diferentes técnicas: coloração de fluorescência do biofilme dental para avaliar sua vitalidade e a MCVL, para visualizar a topografia tridimensional. Amostras de vidro e de esmalte dentário foram fixadas em dispositivos bucais confeccionados para 6 indivíduos com adequado padrão de higiene bucal. Para estudar a fluorescência concomitante com a MCVL, investigou-se biofilme dentário humano *in situ*, utilizando amostras de biofilme dentário. O valor máximo da espessura do biofilme formado sobre o esmalte dentário foi de 8, 35 e 45 µm no período de 1, 2 e 3 dias, removido pelo uso de slabs, a amostra foi corada com diacetato fluorescente e brometo etídio, e colocado em fixador com tolueno/polaróide. Para o seccionamento óptico, a seqüência de imagens foram tomadas ao longo do eixo com incrementos adequados em : 0,25/0,50/0,75/1.00 µm. A fluorescência vital permitiu, visualizar a célula bacteriana conforme a vitalidade e morfologia da estrutura e ainda revelar que os microrganismos viáveis localizavam-se no topo de uma camada de células mortas.

Boulos et al.<sup>11</sup>, utilizou corantes fluorescentes (kit de viabilidade bacteriana Bac light ® LIVE \ DEAD, com o objetivo de avaliar a quantificação e a viabilidade de bactérias embebidas em água. As condições ótimas de incubação foram encontradas entre 15 a 10 min, à temperatura ambiente no escuro. O total de células (vermelha + verde) e a viabilidade celular (células coradas de verde) foram contadas simultaneamente. Fatores afetando o procedimento de coloração foram testados (adição de glutaraldeído, tempo de coloração e impacto da solução de cloro). Na ausência de estresse, as contagens de células

viáveis foram comparadas com a contagem celular com ausência de estresse. O aumento do estresse ambiental induziu à diminuição da viabilidade, o qual foi constatado pela contagem do número de células com vitalidade.

Heydorn et al.<sup>28</sup>, descrevem o programa COMSTAT possui, e avalia a organização estrutural de quatro comunidades microbianas por esse programa, o qual compreende 10 ferramentas para a quantificação das imagens do biofilme em 3 dimensões de 4 espécies bacterianas (*P. aureofaciens*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*), o qual foram codificadas com uma proteína fluorescente verde. A análise pelo programa COMSTAT, utilizou-se de 4 variáveis para descrever a estrutura do biofilme: média de espessura, rugosidade, recobrimento do substrato e a razão da superfície pelo volume. Essas variáveis mostraram que as 4 espécies apresentam diferentes modos de crescimento do biofilme.

Wood et al.<sup>86</sup>, avaliaram em MCVL, o biofilme formado por 8 voluntários, que usaram dois dispositivos em forma de anel de nylon fixados por resina no segundo molar superior no lado direito e esquerdo por 4 dias. Imediatamente, após a remoção do biofilme intacto dos voluntários, a medida de profundidade indicou que a placa formada no dispositivo foi mais espessa na junção entre o nylon e o esmalte do que no centro do dispositivo. A luz refletida nas imagens mostradas no MCVL mostrou uma estrutura heterogênea em todo o biofilme. Isso está em contraste com as imagens vistas em MEV, sugerindo uma estrutura mais compacta. O biofilme corado com fluorescência pode sugerir que o biofilme é repleto de muitos vasos.

Para examinar a estrutura espacial do biofilme dental utilizando-se a técnica de fluorescência vital, Auschill et al. 2001, combinaram a análise óptica das secções fornecidas pelo MCVL. Lâminas de esmalte foram fixados intra-oralmente em 3 voluntários por 5 dias para acúmulo de placa. Após corar as amostras com diacetato fluorescente e brometo etídeo, as amostras foram processadas para examinação MCVL.

Secções ópticas de 1µm foram analisadas no eixo x e y nesses biofilmes dentais. Um dos biofilmes mostrou 15 µm de espessura e menor viabilidade enquanto outros mostraram espessura maior (25 e 31µm) e maior vitalidade. O programa FLUORO<sup>®</sup>, foi usado para calcular a porcentagem de células viáveis (verdes) e não viáveis (vermelha). Em todos esses exemplos de viabilidade da placa bacteriana aumentou com relação à parte central da superfície do esmalte e diminuiu em outras partes do biofilme. O biofilme dental mostrou uma distribuição desigual de microrganismos vivos e mortos. Nos 3 biofilmes estudados, a porcentagem de microrganismos vitais foi em menor quantidade adjacente ao esmalte e aumentou na parte central.

Petrisor et al. <sup>53</sup>, avaliaram a utilização do MCVL em conjunto com diferentes técnicas de análise de imagens para investigar a estrutura do biofilme. O objetivo foi reconstituir a estrutura tri-dimensional do biofilme e estimar o seu biovolume, utilizando-se de dois programas: COMSTAT e o Sistema de informação geométrica, para quantificar a análise das imagens fornecidas pelo MCVL. O volume de 30 microesféras poliméricas fluorescentes com um diâmetro conhecido foi usada para comparar os dois programas. Em seguida, para estimar o biovolume de *P. aeruginosa* utilizou-se de uma secção com 1 µm com distância de 0,2µm entre as secções. Os resultados indicaram o sistema de informação geométrica produziu resultados próximos aos resultados do COMSTAT. O processamento da imagem, em conjunto com a fluorescência, permitiu identificar as espécies e quantificar mudanças com relação ao crescimento do biofilme e sua morfologia.

Auschill et al. <sup>5</sup>, investigaram a formação de biofilme dentário sobre diferentes materiais restauradores. Os materiais testados foram: amálgama, ouro, cerâmica, resina composta, compômero e cimento de ionômero de vidro. Amostras padronizadas dos materiais foram confeccionadas e fixadas em dispositivos bucais para três estudantes selecionados. Os dispositivos foram mantidos na cavidade

bucal por cinco dias. Decorrido este período, as amostras foram removidas e o biofilme formado foi corado com diacetato fluorescente e brometo de etídeo, para visualizar a porcentagem de bactérias viáveis e não viáveis. Em seguida, foi realizada análise em microscópio confocal laser. Amostras de resina composta (Pertac II) e cerâmica (IPS Empress) apresentaram proporção de bactérias viáveis em torno de 4 a 21% e de 34 a 86%, respectivamente. Espessura do biofilme variou de 1 a 6  $\mu\text{m}$  sobre a cerâmica e resina composta, respectivamente. Metais e compômeros mostraram alto valor de área coberta por biofilme, enquanto a resina composta e a cerâmica mostraram redução na área coberta e aumento da vitalidade do biofilme. Contudo, as cerâmicas mostraram uma menor área coberta com a mais alta taxa de vitalidade bacteriana. Quando a vitalidade das bactérias foi comparada com a espessura verificou-se que as cerâmicas apresentaram o biofilme mais fino, mas com maior taxa de vitalidade bacteriana.

Hope et al.<sup>30</sup>, usaram o MCVL, para avaliar a distribuição espacial das bactérias viáveis e não viáveis e a espessura das camadas viáveis no eixo x-y, no crescimento da placa dental *in vitro*. Utilizando-se do método *in vitro* CDFF, para a reprodução do crescimento do biofilme, com a fermentação do biofilme em profundidade constante. Esse sistema apresenta-se de forma rotatória contendo cavidades com reentrâncias, onde foram inseridas as amostras de hidroxiapatita. Os discos usados para suporte do biofilme foram fissurados na profundidade de 200  $\mu\text{m}$ . Os biofilmes maduros foram removidos com 17 a 27 dias de inoculação. Os discos foram colocados na placa de petri e corados com componente A e B do kit *Bac Light*® LIVE/DEAD (Molecular probes, Oregon USA) que permaneceu por 10 min no escuro para permitir o desenvolvimento da coloração. Todas as imagens foram analisadas no programa Image J. As secções ópticas compreendendo ou não a presença da viabilidade foram separadas pelos canais de cores. A ferramenta *plot profile* do Image J, foi usada para medir a intensidade de *pixel* (fluorescência ao redor das linhas

de interesse). A análise da secção óptica, mostrou camadas exteriores de biofilme contendo bactérias viáveis, enquanto na região interna contendo bactérias não viáveis.

Hope et al.<sup>31</sup>, realizaram a medida da espessura e a distribuição da viabilidade do biofilme oral utilizando a MCVL, com objetivo de identificar semelhanças do biofilme em algumas regiões e determinar as suas dimensões. Os biofilmes tiveram crescimento aeróbio em profundidade constante utilizando-se um método *in vitro* CDFF. A variação da distribuição da viabilidade, foi observada pela medida da espessura do biofilme. Observou-se que, o centro do biofilme (fatias mais centrais) era composta por bactérias não viáveis. Pode-se correlacionar o aumento do número de bactérias não viáveis com a profundidade da secção óptica.

Konishi et al.<sup>38</sup>, avaliaram, *in vivo*, a formação inicial de biofilme dentário em resina composta e esmalte humano utilizando MCVL. Amostras padronizadas dos materiais foram confeccionadas e fixadas nos primeiros molares superiores de 3 voluntários. Após 4, 8 e 24 h, as amostras foram removidas e processadas para análise quantitativa do biofilme formado sobre as amostras. Secções ópticas foram realizadas e imagens do biofilme foram obtidas para cada secção. A proporção da área ocupada por bactérias em relação à área total e a espessura do biofilme em cada secção foram avaliadas. A espessura e densidade do biofilme aumentaram com o tempo. Não houve diferença na espessura entre os materiais. A resina composta apresentou maior quantidade de bactérias aderidas com relação ao esmalte.

Staudt, et al.<sup>70</sup>, avaliaram a arquitetura e volume de múltiplas espécies de biofilmes hidratados utilizando a MCVL. A distribuição das células bacterianas foi determinada pelo uso do corante SYTO 60, e a glicoproteína Alexa-488. As imagens digitais em 3D foram empregadas para visualização e quantificação do biovolume, espessura e biomassa do biofilme. Esses dados foram comparados utilizando-se

MCVL e medidas gravimétricas. Foi demonstrado que, a espessura do biofilme, foi determinada por ambos os métodos e que, ambos resultaram em baixo crescimento do biofilme. Já, o baixo crescimento do biofilme, com relação à massa e volume foi calculada por MVCL e também, pela medida gravimétrica. Os resultados com a utilização do MVCL, mostrou-se semelhante aos resultados obtidos por métodos já estabelecidos. No entanto, os resultados quantitativos das imagens em 3D resultou em uma importante ferramenta para visualizar a arquitetura do biofilme e quantificar a estrutura do biofilme devido sua alta resolução.

Hu et al.<sup>32</sup>, avaliaram a distribuição espacial do zinco utilizando-se a transição representativa do metal, e a atividade da biomassa no biofilme bacteriano, utilizando a MCVL de 2 fótons (2p LSM), que permite uma análise da espessura do biofilme semelhante a observação utilizando MCVL e também a excitação seletiva de um pequeno foco com relação a grande profundidade de localização. O biofilme de *E. coli* foi desenvolvido pela técnica de fluxo contínuo em baixas condições resultando em espessura de biofilme de 10 a 50  $\mu\text{m}$  após 1 a 2 dias. Quando visualizados por 2p LSM, mostraram ter estruturas heterogêneas com densas células dispersas, rugosidade superficial e espaços vazios. Biofilmes homogêneos localizaram-se em regiões mais internas e apresentaram uma biomassa inativa, observada pelo corante de viabilidade LIVE\ DEAD (Syto 9 e Iodeto isopropídeo). As frações ativas do biofilme estiveram na dependência da espessura e foram atribuídos as características heterogêneas da estrutura do biofilme. O zinco ligado ao fluorocromo foi usado para visualizar a localização espacial deste no interior do biofilme. O zinco foi distribuído igualmente na espessura de 12  $\mu\text{m}$  do biofilme, mas foi localizado somente na superfície do biofilme, permitindo a evidência direta que suporta o conceito de que a espessura de biofilme pode conferir resistência à toxicidade do metal pela ligação do metal, que dependendo do tamanho da interface do líquido com o biofilme possa retardar a difusão do metal dentro do biofilme.

Devido o difícil acesso da placa dental abaixo da margem gengival, Hope et al.<sup>31</sup>, usaram o MCVL. Os discos de hidroxiapatita, foram colocados no interior de um recipiente contendo cultura de célula. Utilizando a MCVL com uso do corante Bac light™ /LIVE DEAD (Molecular probes), recipiente foi colocado no interior de uma câmara, onde o microscópio foi fixado. Essa câmara recebeu continuamente um fluxo de gás anaeróbico. Foram usadas as lentes objetivas de 20x 40x e 63x com imersão em água, que revelaram que o biofilme constituiu de bactérias sobrepostas em forma de coluna, separada por canais de água. Os microrganismos da placa dental alcançaram um estágio de equilíbrio após 4 dias. A imagem do microscópio de MCVL da microbiota subgengival, revelou uma distribuição espacial da viabilidade celular como uma camada externa de bactérias não viáveis ao redor de um centro de bactérias.

### 3 PROPOSIÇÃO

As proposições do presente trabalho foram:

- a) avaliar a rugosidade superficial de uma cerâmica feldspática microparticulada (VM7, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha) submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento;
- b) avaliar a hidrofobicidade superficial de uma cerâmica feldspática micro-particulada submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento;
- c) avaliar a colonização bacteriana inicial formado *in situ* sobre uma cerâmica feldspática micro-particulada submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento por meio microscopia confocal de varredura a laser (MCVL);
- d) correlacionar a viabilidade celular com a quantificação do biofilme inicial formado *in situ* em uma cerâmica feldspática micro-particulada submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento;
- e) correlacionar rugosidade superficial com a quantificação do biofilme inicial formado *in situ* em uma cerâmica feldspática micro-particulada

submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento;

- f) avaliar o biofilme dentário inicial formado *in situ* sobre uma cerâmica feldspática micro-particulada submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- g) avaliar a topografia da cerâmica feldspática microparticulada submetida à diferentes sistemas de acabamento e polimento por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### 4. MATERIAL E MÉTODO

Os materiais utilizados para a realização dos experimentos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Materiais, marcas e fabricantes, e indicações de uso.

<b>Material</b>	<b>Marca / Fabricante</b>	<b>Indicação</b>
Cerâmica feldspática micro-particulada	VM 7 (Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha)	Confecção de restaurações livres de metal
Glaze	Vita Akzent 25 (Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha)	Glazeamento de restaurações com ou sem metal
Broca diamantada	4138F- fina (30 µm) (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil)	Acabamento de restaurações cerâmicas
Ponta de Borracha	Borracha abrasiva cinza Vicking (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil)	Polimento de restaurações cerâmicas
Discos de feltro	Discos de feltro Diamond (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil)	Polimento de restaurações cerâmicas
Pasta diamantada	Diamond Excel (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil)	Polimento de restaurações cerâmicas

##### 4.1 Obtenção das amostras cerâmicas

Noventa e seis amostras da cerâmica feldspática VM7 Enamel (VITA Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha) foram confeccionadas, seguindo as recomendações do fabricante, em tamanho padronizado (forma de disco, diâmetro de 5 mm, espessura de 2 mm).

Para isso, foi utilizada uma matriz metálica (Figura 1) com dimensões aumentadas em aproximadamente 12% (5,6 mm e 3 mm), a fim de compensar a contração de sinterização da cerâmica. A matriz metálica foi posicionada sobre uma base de gesso refratário; o pó e o líquido modelador da cerâmica foram misturados em uma placa de vidro; e a massa cerâmica foi aplicada nos espaços da matriz com espátula de teflon. O excesso de líquido foi eliminado com papel absorvente. Após modelagem, a massa cerâmica foi removida da matriz e submetida ao processo de sinterização em forno Vacumat 40 (Vita Zahnfabrik), segundo os ciclos e temperaturas recomendadas pelo fabricante para a cerâmica (Quadro 2). Finalizada a sinterização, e decorrido o tempo de 10 min para o resfriamento, as superfícies testes das amostras foram regularizadas utilizando-se lixas de papel de diversas graduações (360, 600, 1200) (3M do Brasil Ltda, Brasil). A seguir, as amostras foram limpas em ultrassom (Vitasonic, VITA Zahnfabrik) imersas em água destilada por 5 min, e vitrificadas usando glaze Vita Akzent 25 (Vita Zahnfabrik) seguindo o ciclo de temperatura recomendado pelo fabricante (Quadros 3).

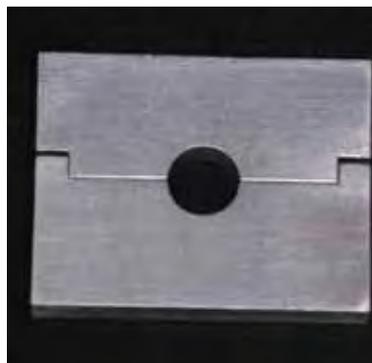


Figura 1 - Matriz metálica utilizada para confecção das amostras.

Quadro 2 - Ciclo de queima da cerâmica VM7

Pré-secagem: 500°C, temperatura constante por 6 minutos
Temperatura em elevação por 7,27 minutos, 55°C/minuto
Temperatura de 910°C
Temperatura constante por 1 minuto
Vácuo por 7,27 minutos

Quadro 3 - Ciclo de vitrificação do glaze Vita Akzent 25

Pré-secagem: 500°C, temperatura constante por 4 minutos
Temperatura em elevação por 5 minutos, 80°C/minuto
Temperatura de 900°C
Temperatura constante por 1 minuto

#### 4.2 Acabamento e polimento superficial das amostras

Após o glaze, as amostras foram aleatoriamente divididas em 4 grupos (n= 24) de acordo com o acabamento e polimento realizado descritos no Quadro 4:

Quadro 4 – Grupos do estudo considerando os fatores de experimento

<b>Material</b>	<b>Condição Experimental</b>	<b>Grupos</b>	<b>Nº/amostras</b>
<b>VM7</b>	1) Glaze	G1 (controle)	24
	2) Glaze + broca diamantada	G2	24
	3) Glaze + broca diamantada + ponta de borracha	G3	24
	4) Glaze + broca diamantada + ponta de borracha + disco de feltro com pasta diamantada	G4	24

Inicialmente, 24 amostras glazeadas foram separadas para o grupo controle. As demais amostras referentes aos grupos G2, G3 e G4 (72 amostras) foram submetidas ao desgaste com broca diamantada fina (30  $\mu\text{m}$ , 4138F, KG Sorensen) montada em aparelho de alta rotação (Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) sob constante refrigeração em água destilada. O procedimento foi realizado por único operador com as amostras presas entre os dedos com tempo de acabamento padronizado de 10 s desenvolvendo movimentos circulares <sup>10</sup> (Figura 2 - A). Vinte e quatro amostras foram então separadas para o grupo G2.

As 48 amostras restantes foram submetidas ao polimento com ponta de borracha abrasiva cinza Viking (KG Sorensen) montada em aparelho de baixa rotação (Peça Reta Intramatic 10 ABN, Kavo do Brasil) sob constante refrigeração em água destilada. O procedimento foi realizado por único operador com as amostras presas entre os dedos com tempo de acabamento padronizado de 10 s desenvolvendo movimentos circulares a 8.600 rpm (Figura 2 - B).

Vinte e quatro amostras foram separadas para o grupo G3, e as 24 amostras restantes receberam polimento com discos feltro

impregnados com pasta diamantada (Diamond Excel, KG Sorensen) montados em aparelho de baixa rotação (Contra- Ângulo Intramatic 10 ABN, Kavo do Brasil) sob constante refrigeração em água destilada. O procedimento também foi realizado por único operador com as amostras presas entre os dedos (Figura 2 - C) com tempo de acabamento padronizado de 10 s desenvolvendo movimentos circulares a 8.600 rpm.

Após a realização do acabamento e polimento de todos os grupos, as amostras foram novamente limpas em ultrassom (Vitasonic, VITA Zahnfabrik) imersas em água destilada por 5 min.

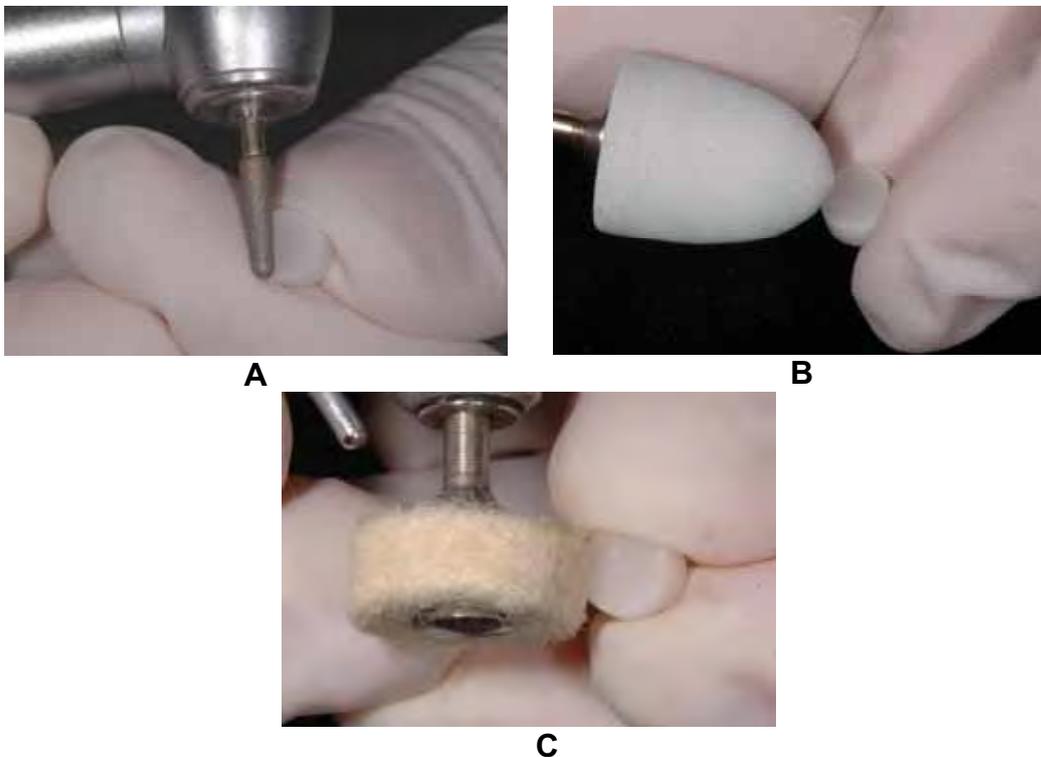


Figura 2 - Amostras posicionadas entre os dedos para a realização das técnicas de acabamento e polimento. A) Broca diamantada; B) Ponta de borracha; C) Disco de feltro.

### 4.3 Análises realizadas

As análises realizadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Análises realizadas no estudo.

<b>Análise</b>	<b>Número de amostras / grupo</b>
Rugosidade superficial	10
Hidrofobicidade	3
Biofilme dentário inicial <i>in situ</i> com microscopia confocal laser (MVCL)	10
Vitalidade das bactérias no biofilme	10
Biofilme dentário inicial <i>in situ</i> com microscopia eletrônica de varredura (MEV)	5
Topografia da superfície cerâmica	5

#### 4.3.1 Análise da rugosidade superficial

A rugosidade superficial foi avaliada antes e após a realização dos procedimentos de acabamento e polimento estabelecidos para cada grupo. A avaliação da rugosidade superficial antes dos procedimentos de acabamento e polimento objetivou avaliar a superfície cerâmica sem nenhum tratamento. A análise quantitativa da rugosidade superficial foi realizada em um rugosímetro Mitutoyo SJ 400 (Tóquio, Japão), com o parâmetro Ra ( $\mu\text{m}$ ), que corresponde a média aritmética

dos valores absolutos das ordenadas de afastamento (picos e vales) em relação a linha média dentro do percurso de medição. Quatro medidas foram realizadas sobre a superfície das amostras: duas medidas em uma direção e duas medidas em outra direção perpendicular a primeira (aproximadamente 1 mm de distância entre as medidas). A ponta do rugosímetro realizou percurso de 3 mm. Um valor médio para cada amostra foi obtido a partir das quatro medidas. A seguir, foi obtida a média para cada grupo (Figura 3).

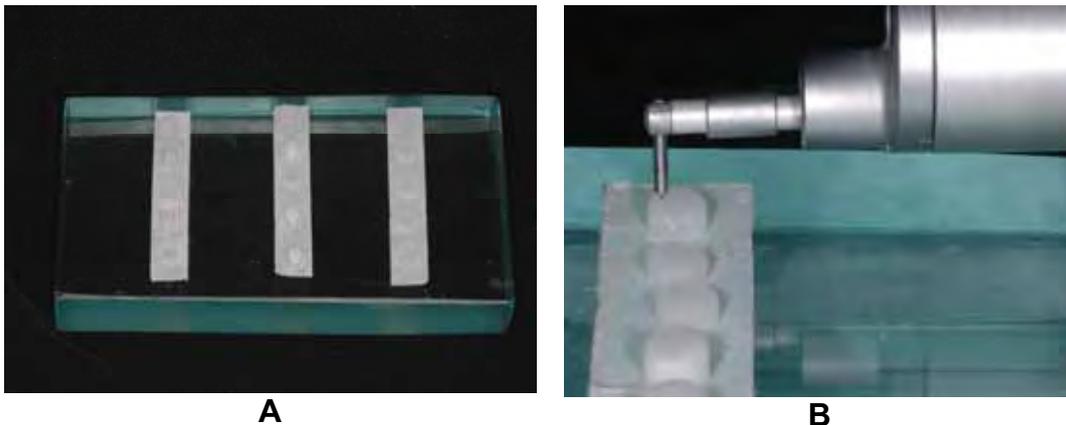


Figura 3 – A) Amostras posicionadas sobre placa de vidro; B) Leitura das amostras com rugosímetro de ponta.

#### 4.3.2 Análise da hidrofobicidade da superfície cerâmica

A hidrofobicidade do substrato cerâmico submetido a diferentes condições de acabamento e polimento foi avaliada, em 3 amostras de cada grupo, por meio da medida do ângulo de contato da água sobre as amostras. O ângulo de contato foi determinado utilizando-se a técnica da gota.

O líquido usado para calcular a hidrofobicidade foi a água deionizada <sup>72</sup> depositada sobre a superfície lisa e plana da amostra cerâmica com auxílio de uma seringa adaptada ao goniômetro (Ramé-

Hart – DROPimage, Advanced, USA) (Figura 4). O ângulo de contato (graus) foi calculado pelo software *Advanced Drop Shape Analysis* do próprio equipamento, a partir de três medições de ângulo de contato para cada amostra. O software calculou a média e o desvio padrão das medidas obtidas em cada amostra.

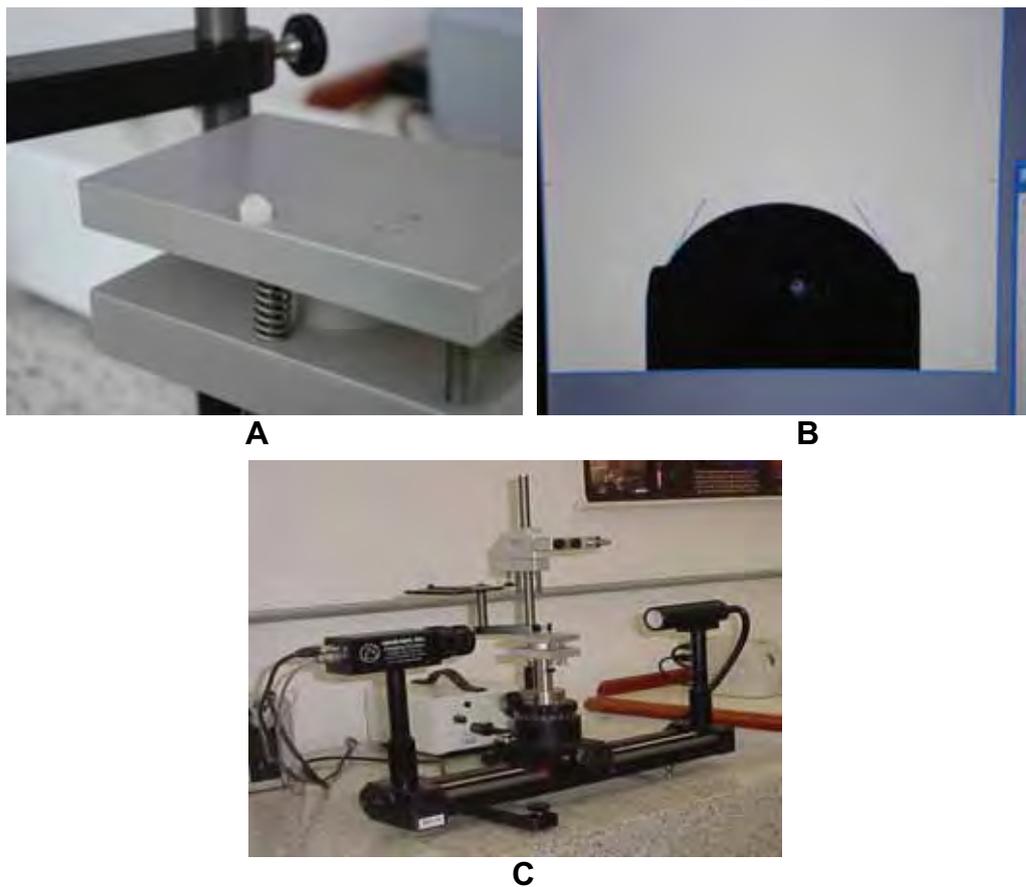


Figura 4 - A) Amostra posicionada no dispositivo do aparelho com a gota em posição. B) Imagem reproduzida pelo software para o cálculo do ângulo de contato. C) Aparelho goniômetro utilizado.

### 4.3.3 Análise do biofilme dentário inicial formado *in situ*

#### 4.3.3.1 Seleção e informação dos voluntários

Foram selecionados 10 voluntários de ambos os sexos com boa saúde geral. Os voluntários foram informados da pesquisa e concordando com sua participação assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (051/2006-PH/CEP) (Anexo A).

Para a seleção dos participantes foi realizada anamnese, exame clínico e registro do fluxo salivar. Indivíduos selecionados não poderiam apresentar hábitos relacionados ao fumo e álcool, uso de medicamentos que interferem na secreção salivar, uso de antibióticos nos três meses prévios ao início do estudo, xerostomia, e realização de radioterapia nos últimos 6 meses. No exame clínico foram selecionados apenas indivíduos com adequado controle de higiene bucal avaliado pelo índice Løe e Silness (1963), com ausência de cárie e doença periodontal.

Borrachas de silicone hiperbolóide, estéreis e descartáveis (Saúde Bucal®, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizadas para estimular o fluxo salivar durante 5 min vertendo toda saliva obtida em recipiente de vidro. O volume de saliva depositada foi medido com seringa descartável de 10 ml. O volume medido em ml foi dividido por 5 (5 min de coleta), para obtenção da velocidade do fluxo em ml/min, sendo considerado fluxo normal de salivacão valores maiores ou iguais a 0,7 ml/min) (Togashi, 1998).

Os dados da anamnese, exame clínico e avaliação do fluxo salivar para cada participante foram anotados em ficha desenvolvida para o estudo (Apêndice B).

#### 4.3.3.2 Confeção do dispositivo bucal

Os participantes selecionados para o estudo foram submetidos ao procedimento de moldagem da arcada superior utilizando-se alginato (Jeltrate, Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, foram obtidos modelos em gesso especial (Durone, Dentsply Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) para a confecção de dispositivos intra-buciais personalizados em resina fotopolimerizável (Elite LC Tray, Zhermack®, Rovigo, Itália). Este dispositivo recobriu a coroa dos molares e pré-molares superiores.

Uma amostra de cada grupo foi fixada na face vestibular do dispositivo<sup>66</sup>, sendo quatro no lado direito para análise do biofilme em MEV e quatro no lado esquerdo para análise do biofilme em MCVL (Figura 5). Dez pacientes foram selecionados para análise do biofilme em MCVL, enquanto cinco destes foram selecionados para avaliação do biofilme em MEV.

Antes do uso do dispositivo, os voluntários realizaram higiene bucal como de costume sem uso de dentífrico ou colutórios. A seguir, permaneceram com os dispositivos intra-buciais por período de 8 hs<sup>48</sup>. Nenhuma ingestão de líquido ou alimentos ocorreu durante o período experimental<sup>62</sup>.



Figura 5 - Dispositivo confeccionado com as amostras posicionadas. A) Vista frontal. B) Vista lateral.

#### 4.3.3.3 Análise do biofilme dentário inicial formado *in situ* por microscopia confocal laser: biovolume e espessura média

Decorrido o período experimental de 8 hs, as amostras foram cuidadosamente removidas do dispositivo intra-bucal e armazenadas em recipiente estéril preenchido com algodão embebido em solução salina estéril (NaCl 0,9%), a fim de manter a umidade do ambiente, e a viabilidade bacteriana durante o transporte até o microscópio confocal laser. O recipiente contendo as amostras foi colocado em isopor com gelo para manter uma temperatura viável para impedir a desnaturação das células bacterianas.

No momento da análise no microscópio confocal laser, as amostras foram colocadas em placa de Petri estéril para serem coradas utilizando-se o kit Live/ Dead ® Bac Light <sup>tm</sup> Bacterial Viability and Counting (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) (Figura 6). Esse kit é composto por dois corantes fluorescentes à base de ácido nucléico: o corante SYTO 9 ® cora de verde as células vivas (quando penetra em células com a membrana celular intacta); e o corante iodeto isopropídeo

cora de vermelho as células mortas (quando penetra em células com a membrana celular danificada). Conforme recomendado pelo fabricante, os corantes foram diluídos de modo separado em solução salina estéril (NaCl 0,9%) em ependorfes na proporção 10 ml de solução salina para 4 µl dos corantes <sup>44</sup>.

Com uma pipeta automática (Pipetman® P-Gilson S.A.S, França) pré-calibrada em 10 µl com ponta estéril, uma gota de cada corante foi aplicada sobre a superfície do biofilme formado sobre as amostra sem que houvesse contato da ponta da pipeta com a superfície sob investigação. A cada aplicação, as pontas da pipeta foram substituídas para evitar contaminação tanto nos fracos que continham os corantes dissolvidos como na superfície do biofilme a ser analisada. Após aplicação dos corantes, a placa de Petri foi fechada e envolta por um papel laminado, com objetivo de realizar a incubação dos corantes por 15 minutos em temperatura ambiente com ausência de luz. <sup>11</sup>.

A seguir, as amostras foram posicionadas sobre uma lamínula, de modo a deixar a superfície a ser analisada em contato com a mesma, o que possibilitou a análise do biofilme formado em microscópio confocal laser (LSM 510 META, Zeiss, Germany) (Figura 7). O comprimento de onda de luz usado para a excitação dos corantes foi de 488 nm, sendo que toda a luz emitida entre 500-550 nm e abaixo de 560 nm foi coletada por diferentes filtros. Foram utilizadas lentes ópticas com aumento de 4x/ 0.13 para visualização de toda a amostra e quantificação da espessura média de biofilme e biovolume por meio da análise com software COMSTAT. O aumento de 10x/ 0.3 foi usado para visualização da arquitetura do biofilme.

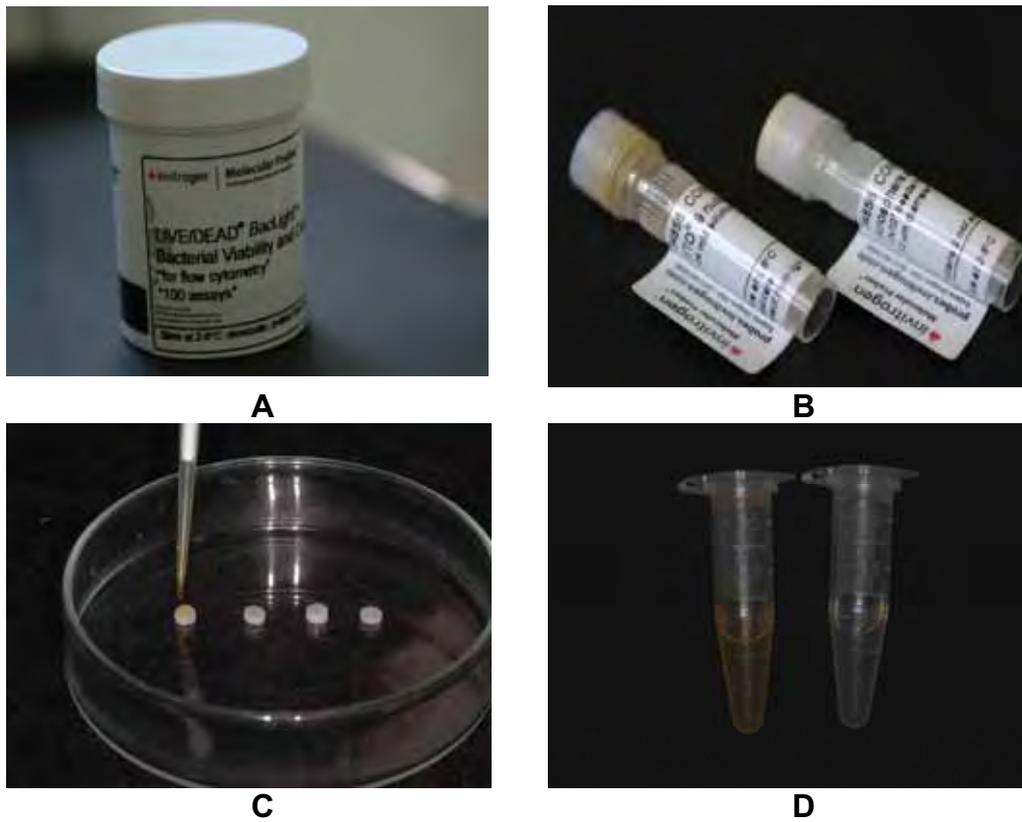


Figura 6 - A) Corante Live/ Dead ® Bac Light™; B) Syto 9 e iodeto isopropílico; C) Corantes diluídos em ependorfes; D) Aplicação do corante sobre as amostras posicionadas em placa de Petri.



Figura 7 - Microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 META utilizado para análise do biofilme.

Para a quantificação de algumas propriedades do biofilme, como o biovolume e a espessura média, utilizou-se o programa COMSTAT<sup>28</sup>. Tal programa é capaz de avaliar as imagens tridimensionais (3D) obtidas em MCVL, analisando a imagem de cada secção óptica em aumento de 4x. Este aumento foi selecionado a fim de abranger a maior área da superfície da amostra obtendo-se valores representativos de cada uma delas. O número de secções ópticas variou entre as amostras de acordo com a espessura do biofilme formado..

Previamente à análise pelo programa COMSTAT, o operador estabeleceu um valor de limiar para cada conjunto de secções ópticas (isto é, para cada amostra). Este limiar auxilia o programa na identificação da presença ou ausência de biomassa em cada *pixel* de cada imagem. Portanto, o operador analisou as secções de todas as amostras e selecionou um limiar em que apenas o biofilme pudesse ser quantificado pelo programa, fazendo com que o *background* (superfície da

amostra cerâmica), facilmente identificado, fosse transformado em fundo preto. Desta forma, quando cada secção era convertida em imagem preta e branca pelo programa, os *pixels* brancos significavam a presença de biomassa e os pretos representavam a ausência de biomassa. Em seguida, duas ferramentas do programa COMSTAT foram selecionadas para quantificar as propriedades do biofilme: espessura média ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ). Essas ferramentas são indicadores quantitativos da adaptação e maturação do biofilme sobre diferentes superfícies, já que maiores valores de espessura e biovolume representam acúmulos maiores de biofilme sobre os respectivos substratos <sup>28</sup>.

#### 4.3.3.4 Análise da vitalidade das bactérias no biofilme

O corante Bac Light LIVE/ DEAD cora as células viáveis de verde fluorescente e as células não viáveis de vermelho fluorescente. Para demonstrar a viabilidade bacteriana do biofilme formado nos 4 grupos em estudo, foi realizada análise utilizando o programa Image J 1.22 d (The National Institutes of Health, USA). A partir das imagens capturadas em MCVL, em aumento de 4x, foi realizada a formatação das imagens em JPG. Dessa forma, atribuindo o canal viável como a cor verde (células bacterianas viáveis coradas com syto 9) e o canal não viável como a cor vermelha (células bacterianas não viáveis coradas com iodeto isopropídeo) foi usada a ferramenta histograma de cor para obter a proporção da cor verde e vermelha. Em seguida, esses dados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão.

#### 4.3.3.5 Análise do biofilme dentário inicial formado *in situ* por microscopia eletrônica de varredura

Decorrido o período experimental de 8 h, as amostras foram cuidadosamente removidas e processadas para análise no microscópio eletrônico de varredura (Jeol 5400, Jeol Ltda, Japão).

Inicialmente, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado em cacodilato de sódio 1M por 24 h. A seguir, foram lavadas em água e desidratadas subsequentemente, por uma série de passagens em concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90% e 100% por 40 min cada) <sup>48,61,62</sup>.

Após 24 hs em temperatura ambiente, as amostras foram fixadas em stubs, usando fita adesiva dupla-face de carbono (SPI, West Chester, PA, USA), e metalizadas com liga de ouro-paládio (Polaron SC 7620 Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, UK) (tempo: 130 s, corrente de 10-15 mA, vácuo de 130 mTorr, taxa de metalização: 3,5 nm/minuto, camada de Pd-Au de aproximadamente 80 Å). O microscópio eletrônico de varredura foi operado em 10 e 15 kV.

Foi realizada análise descritiva do material formado sobre as amostras. Cada amostra foi avaliada de modo a verificar todas as características do material depositado, como presença de bactérias isoladas e/ou agregados, morfologia bacteriana e características do material acelular presente.

#### 4.3.4 Topografia da superfície cerâmica

Amostras cerâmicas, submetidas aos procedimentos de acabamento e polimento de cada grupo, não expostas ao ambiente bucal foram avaliadas com MEV a fim de verificar a topografia superficial.

### 4.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foram utilizados os programas computacionais MINITAB (Minitab, versão 14.12, 2004), STATISTICA (StatSoft, version 5.5, 2000) e STATISTIX (*Analytical Software*, versão 8.0, 2003).

O fator avaliado foi tipo de acabamento e polimento em quatro níveis conforme os grupos G1, G2, G3 e G4.

Os dados de rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ), antes e após os procedimentos de acabamento e polimento foram submetidos à estatística descritiva, e teste *t*- Student.

Os dados de rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ), após os procedimentos de acabamento e polimento foram submetidos à estatística descritiva, análise de variância um fator e teste Tukey.

Os dados obtidos de ângulo de contato (graus) foram submetidos à estatística descritiva, análise de variância um fator e teste Tukey.

Os dados de biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) e espessura média ( $\mu\text{m}$ ) do biofilme foram submetidos à estatística descritiva, análise de variância RM e teste Tukey.

Os dados de vitalidade bacteriana no biofilme foram submetidos à estatística descritiva e ao teste *t*- Student.

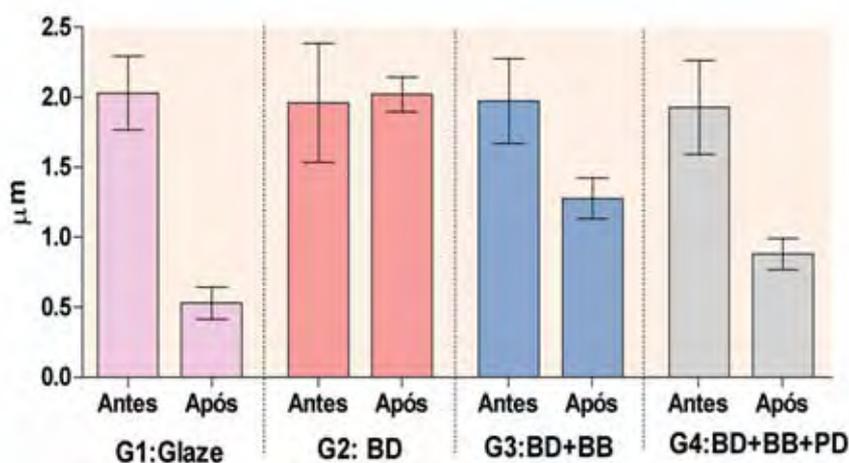
O coeficiente linear de Pearson foi usado para verificar se existia correlação entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), e entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e espessura média ( $\mu\text{m}$ ) do biofilme.

Nível de significância de 5% foi utilizado em todos os testes estatísticos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Rugosidade Superficial

As médias e desvio padrão dos valores de rugosidade superficial antes e após os procedimentos de acabamento e polimento pré-estabelecidos em cada grupo experimental estão representados na Figura 8. Esses valores foram analisados pelo teste *t*-Student pareado. Os resultados indicaram que apenas no grupo G2 (glaze + broca diamantada) não houve diferença significativa entre a rugosidade antes do glaze e após o acabamento e polimento aplicado ( $P < 0,0001$ ).



BD: broca diamantada; BB: ponta de borracha; PD: disco de feltro impregnado com pasta diamantada.

Figura 8 - Representação do gráfico de colunas dos valores médios e desvio padrão da rugosidade superficial antes e após os procedimentos de acabamento e polimento em cada grupo.

Os dados de rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) obtidos após os procedimentos de acabamento e polimento nos grupos experimentais foram submetidos à Análise de Variância um fator, sendo verificado que a

rugosidade foi significativamente influenciada pelos procedimentos de acabamento e polimento ( $P < 0,0001$ ). Para avaliar as diferenças na rugosidade superficial entre os grupos foi aplicado o teste Tukey (Tabela 2).

Tabela 2 - Teste de Tukey da rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos experimentais

<b>Condições experimentais</b>	<b>Média <math>\pm</math> desvio padrão</b>
G1	$0,53 \pm 0,11^a$
G2	$2,02 \pm 0,12^b$
G3	$1,27 \pm 0,14^c$
G4	$0,88 \pm 0,11^d$

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, médias seguidas de letra diferente apresentam diferença estatística.

O grupo submetido ao glaze (G1) apresentou a menor rugosidade superficial, enquanto o grupo submetido ao glaze e broca diamantada (G2) apresentou a maior rugosidade. Todos os grupos diferiram entre si.

## 5.2 Hidrofobicidade da superfície cerâmica

As médias e desvio padrão dos valores de ângulo de contato (graus) da água deionizada nas amostras cerâmicas submetidas aos diferentes procedimentos de acabamento e polimento estão apresentados na Tabela 3. Pela análise de variância um fator foi observado que o ângulo de contato foi influenciado pelos procedimentos de acabamento e polimento ( $P < 0,0001$ ). O teste Tukey (Tabela 3) demonstrou que a superfície cerâmica glazeada (G1) apresentou ângulo

de contato significativamente maior que os demais grupos, sendo a superfície mais hidrofóbica.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão dos valores de ângulo de contato (graus) nos grupos

<b>Grupos</b>	<b>Ângulo de contato (graus)</b>
G1	107,66 ± 1,25 <sup>a</sup>
G2	64,54 ± 0,53 <sup>b</sup>
G3	73,74 ± 3,74 <sup>b</sup>
G4	74,80 ± 3,71 <sup>b</sup>

### **5.3 Análise do biofilme dentário inicial *in situ* em microscopia confocal laser**

As imagens digitais (aumento de 4x) do biofilme formado sobre as amostras cerâmicas submetidas a diferentes procedimentos de acabamento e polimento apresentaram diferenças (Figura 9). Nos grupos G1 e G4, a camada de biofilme formado pareceu apresentar menor quantidade de células bacterianas, sendo possível a observação da superfície cerâmica. Em G2, o biofilme formado pareceu recobrir completamente a superfície da cerâmica.

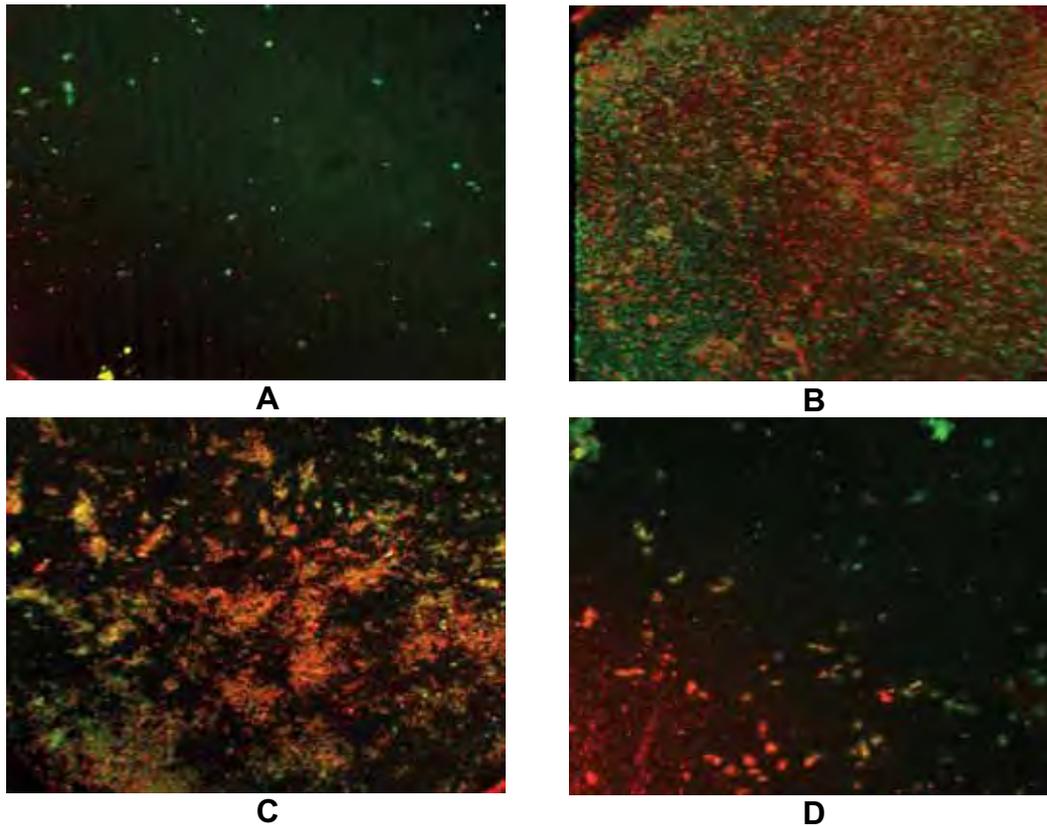


Figura 9 – Imagens digitais representativas do biofilme formado (aumento de 4X no eixo z) sobre a superfície cerâmica submetida a diferentes procedimentos de acabamento e polimento: (A) Glaze (G1); (B) Glaze + Broca; (C) Glaze + Broca + Ponta de borracha; (D) Glaze + Broca + Ponta de borracha + Disco de feltro com pasta diamantada.

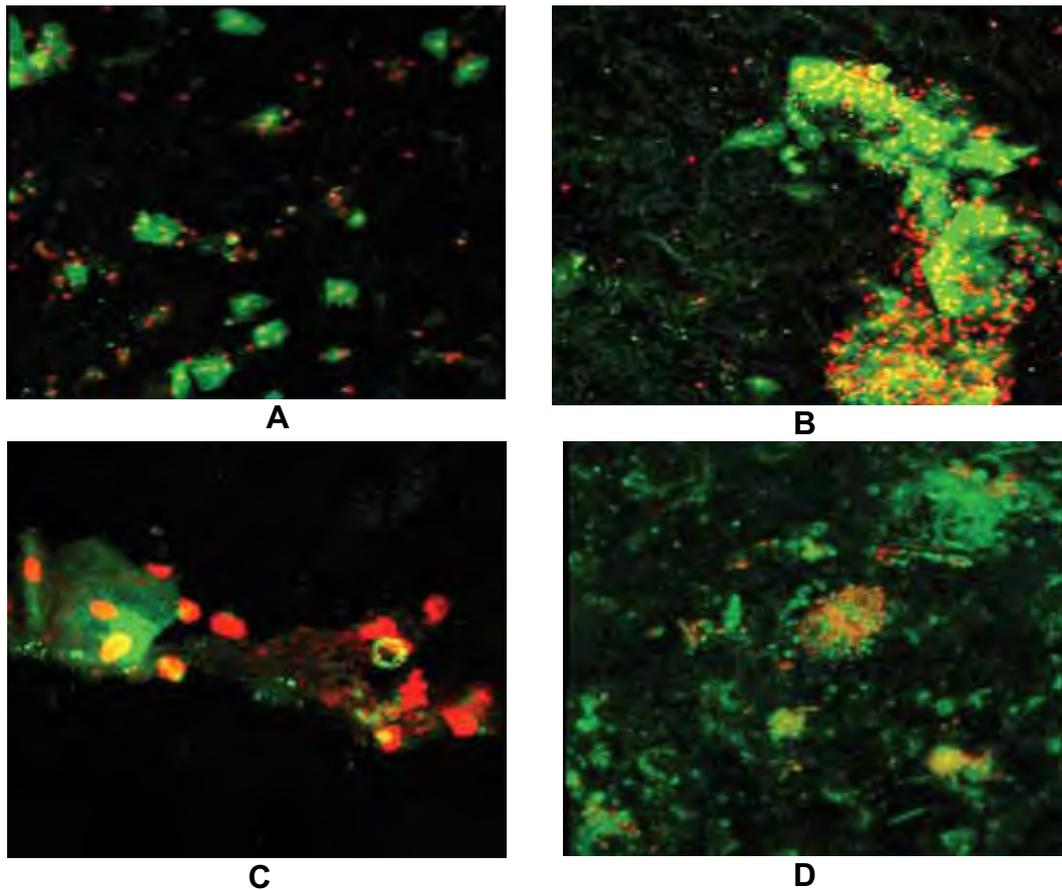


Figura 10– Imagem digital representativa da arquitetura do biofilme na cerâmica VM7: interação das bactérias coradas de vermelho com a matriz de polissacarídeo corada de verde. A) e B) Aumento de 10x; (C) Aumento de 40x e (D) Aumento de 63 x.

Os valores médios e desvio padrão da espessura média ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) do biofilme formado sobre as amostras nos diferentes grupos estão representados graficamente nas Figuras 11 e 12.

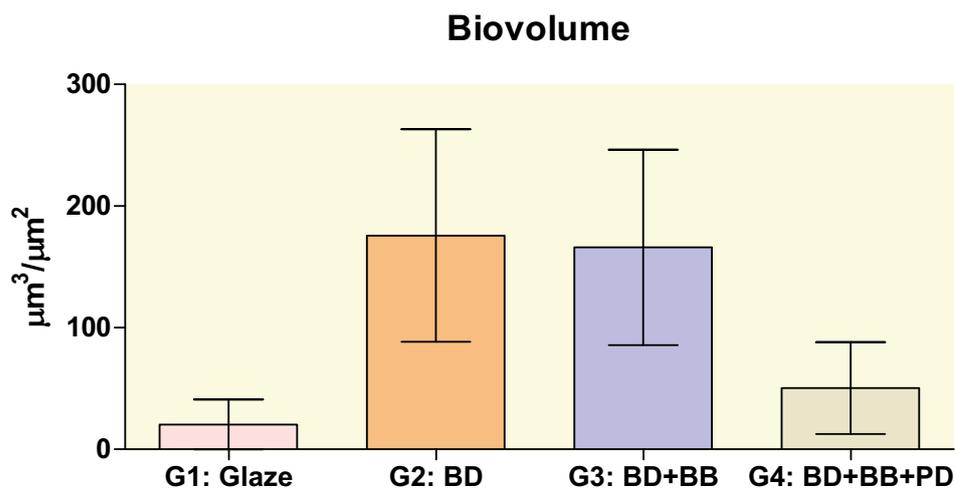


Figura 11 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão do biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) do biofilme nos grupos.

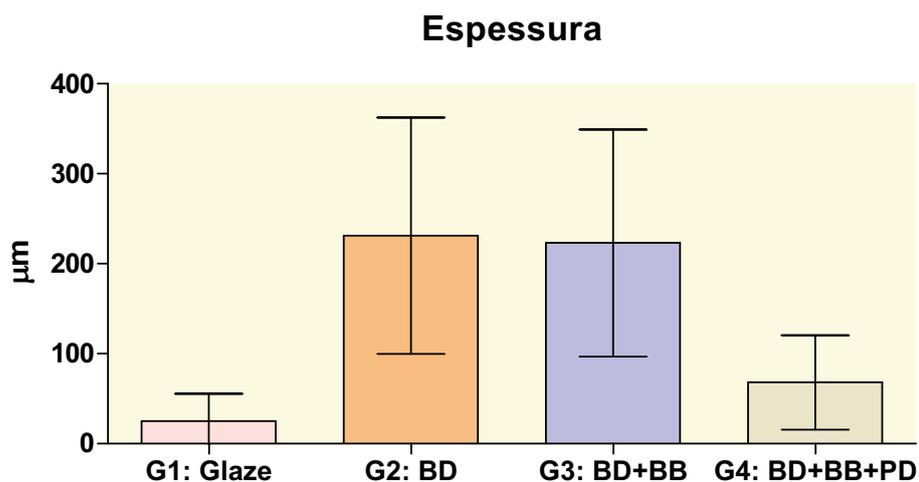


Figura 12 - Representação gráfica dos valores médios e desvio padrão da espessura média ( $\mu\text{m}$ ) do biofilme nos grupos.

Os valores médios do biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) e da espessura média ( $\mu\text{m}$ ) do biofilme foram submetidos à análise de variância RM ANOVA, sendo verificado que os procedimentos de acabamento e polimento influenciaram significativamente na espessura média ( $P < 0,0001$ ) e no biovolume ( $P < 0,0001$ ). O teste Tukey foi aplicado

para verificar as diferenças entre os grupos (Tabela 4). Os grupos 1 e 4 foram semelhantes, tanto para biovolume quanto para espessura média. Os grupos 2 e 3 foram semelhantes, tanto para biovolume quanto para espessura média, e diferiram significativamente dos grupos 1 e 4.

Tabela 4 – Médias, desvio padrão e coeficiente de variância dos valores de espessura média e biovolume nos grupos.

Grupos	Espessura média ( $\mu\text{m}$ )		Biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	
	Média $\pm$ dp	CV (%)	Média $\pm$ dp	CV (%)
<b>G1</b>	20,32 $\pm$ 20,62 <sup>A</sup>	101,52	25,09 $\pm$ 30,54 <sup>a</sup>	121,73
<b>G2</b>	175,7 $\pm$ 87,3 <sup>B</sup>	49,70	231,2 $\pm$ 131,2 <sup>b</sup>	56,76
<b>G3</b>	166,0 $\pm$ 80,3 <sup>B</sup>	48,39	223,1 $\pm$ 126,2 <sup>b</sup>	56,76
<b>G4</b>	50,5 $\pm$ 37,8 <sup>A</sup>	74,78	68,0 $\pm$ 52,5 <sup>a</sup>	77,21

Média  $\pm$  dp: média  $\pm$  desvio padrão; CV (%): coeficiente de variância.

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística.

#### 5.4 Correlação entre a rugosidade superficial versus biovolume e espessura média

A correlação linear de Pearson foi aplicada para avaliar a relação entre rugosidade superficial e biofilme (biovolume e espessura média) formado sobre as amostras nos grupos (Tabela 5). Correlação positiva significativa foi observada entre rugosidade superficial e biovolume do biofilme ( $P < 0,0001$ ), e entre rugosidade superficial e espessura média do biofilme ( $P < 0,0001$ ).

Tabela 5 - Valores de correlação linear de Pearson entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ ) e entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e espessura média ( $\mu\text{m}$ )

	Procedimento de acabamento e polimento			
	G1	G2	G3	G4
Rugosidade x Biovolume	0.383 (0,27)	-0.340 (0,33)	0.020 (0,95)	0.253 (0,48)
Rugosidade x Espessura média	0,306 (0,39)	-0.162 (0,65)	0.288(0,42)	-0,033 (0,92)

A correlação entre rugosidade superficial e biovolume, e entre rugosidade superficial e espessura média, está graficamente representada nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Os valores de rugosidade no intervalo de 1,75 a 2,25  $\mu\text{m}$  (referente ao G2) foram correlacionados com maior biovolume e maior espessura média do biofilme.

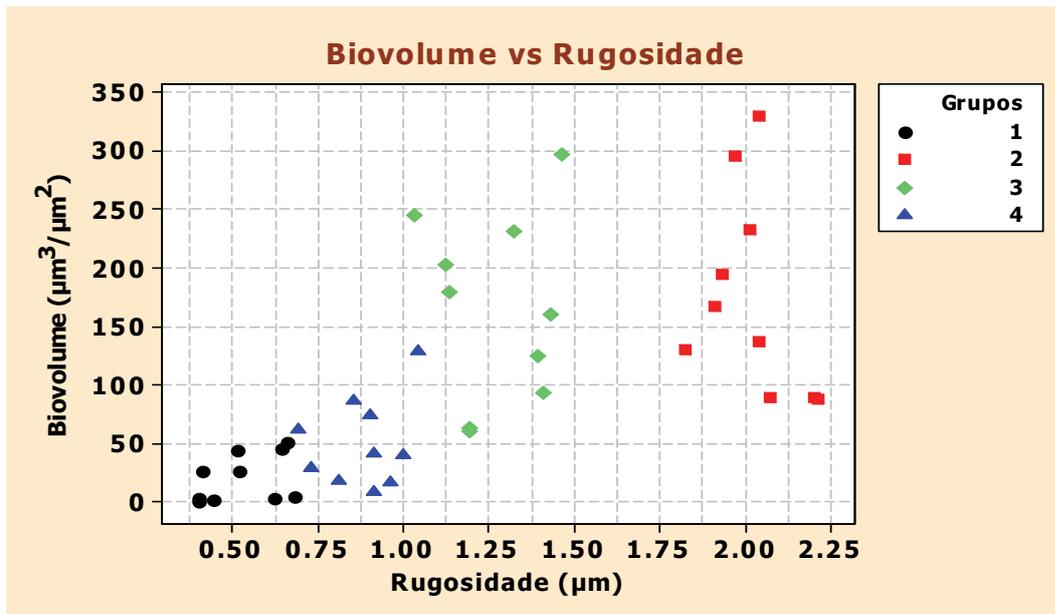


Figura 13 - Representação gráfica da correlação entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume do biofilme ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) nos grupos.

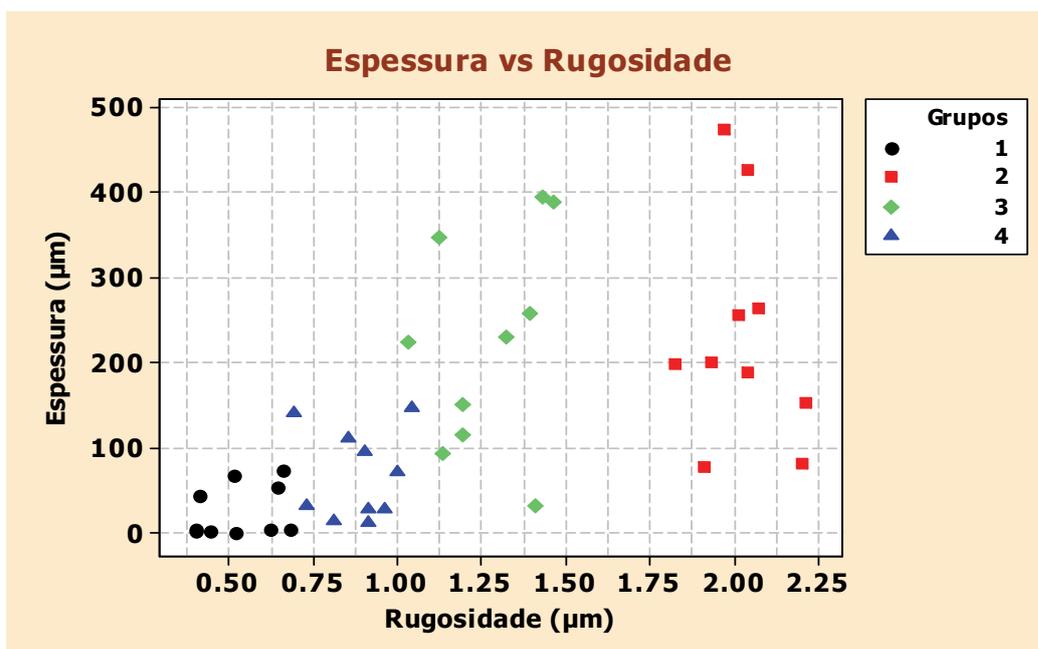


Figura 14 - Representação gráfica da correlação entre rugosidade superficial ( $\mu\text{m}$ ) e espessura média do biofilme ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos.

## 5.5 Vitalidade das bactérias no biofilme

O *t*-Student pareado foi usado para comparar os valores médios de fluorescência verde (células vivas) e fluorescência vermelha (células mortas) em cada grupo experimental (Tabela 6). Esses dados estão representados graficamente na Figura 14. Dentro de cada grupo não foram observadas diferenças significantes entre a proporção de células viáveis e não viáveis.

Tabela 6 - Teste *t*-Student pareado: médias e desvio padrão dos valores de viabilidade bacteriana nos diferentes grupos experimentais.

Avaliação	G1	G2	G3	G4
Células vivas	21,83 ± 7.63	32,36 ± 16,34	39,93 ± 15,04	35,36 ± 20,61
Células mortas	23,38 ± 5.18	27,85 ± 6,97	28,53 ± 22,08	29,07 ± 5,76
p-valor	0,523	0,329	0,196	0,349

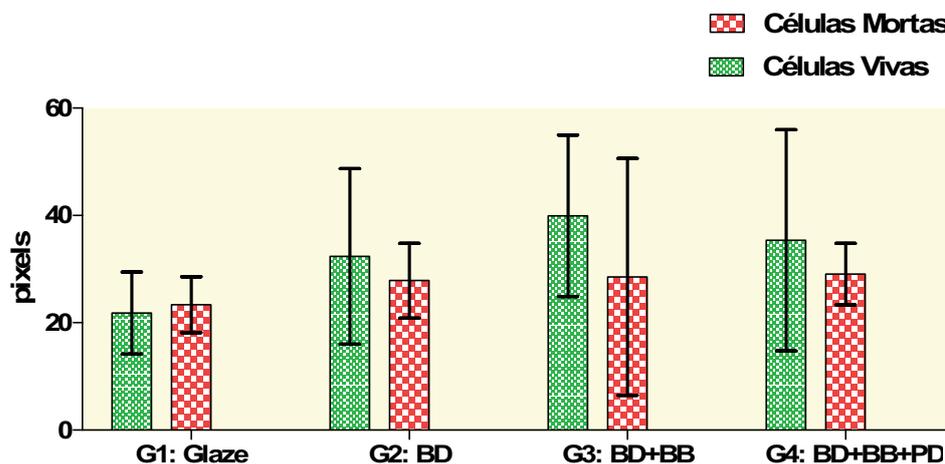


Figura 15 – Representação gráfica das médias e desvio padrão dos valores de pixels referentes à proporção de células viáveis e não viáveis.

## 5.6 Análise do biofilme dentário inicial *in situ* em microscopia eletrônica de varredura

Após 8 h no ambiente bucal, poucas células bacterianas aderidas sobre as amostras do grupo G1 com pouco material acelular foram observadas. As bactérias consistiram de cocos isolados e diplococos (Figura 16). No grupo G2, presença de maior número de bactérias aderidas às amostras foi verificada. Cocos e bastonetes curtos isolados e em cadeias foram observados (Figura 17). No grupo G3 foi verificado material fibrilar com cocos e bastonetes curtos constituindo colônias na superfície (Figura 18). No grupo G4, as amostras foram recobertas por material granular e cocos isolados aderindo à superfície (Figura 19).

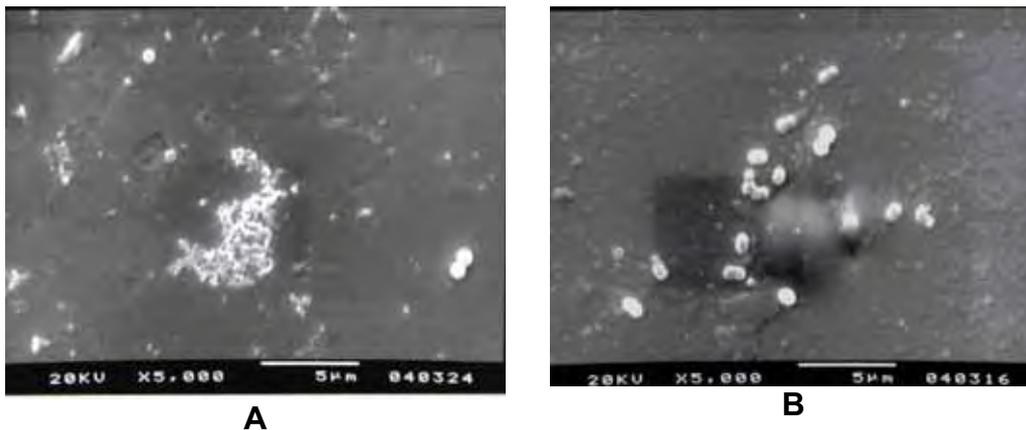


Figura 16 - Micrografias representativas do grupo G1: presença de cocos isolados e diplococos.

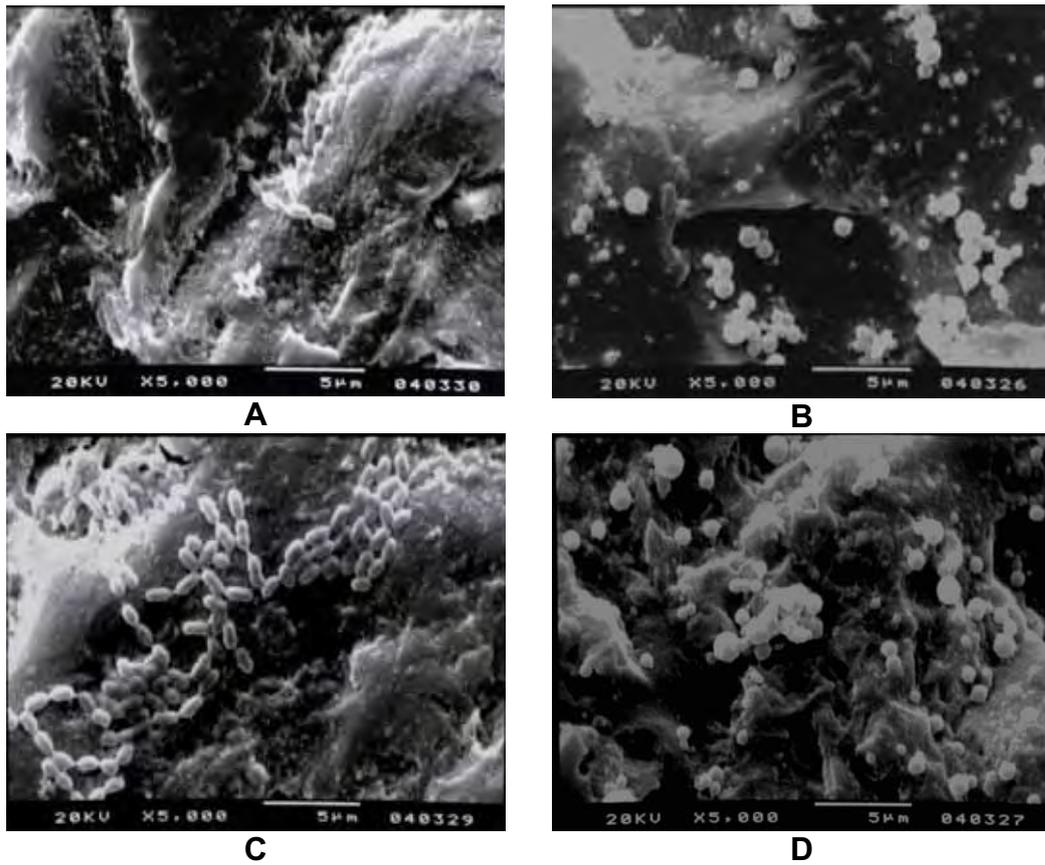


Figura 17 – Micrografias representativas do grupo G2: estreptococos (A e C) e cocos (B e D) colonizando a superfície cerâmica.

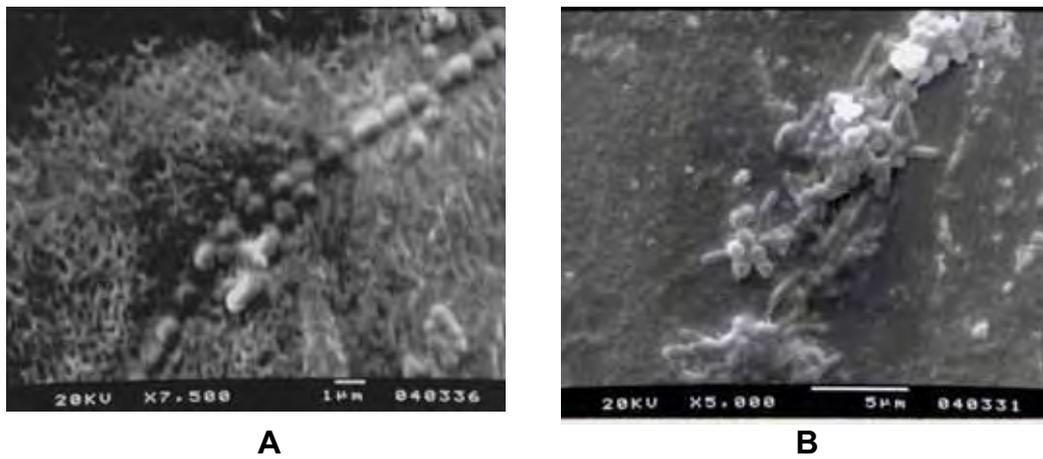


Figura 18 – Micrografias representativas do grupo G3: presença de material fibrilar (A), e colônias de cocos e bastonetes curtos (B).

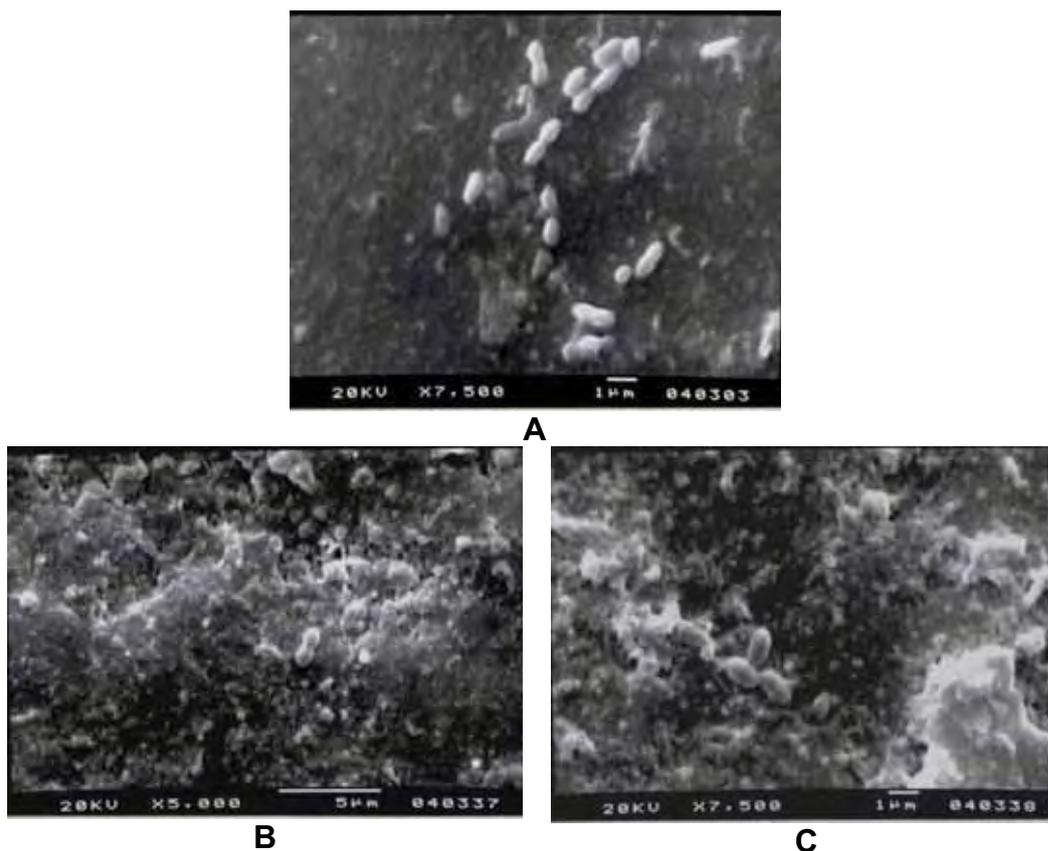


Figura 19 – Micrografias representativas do grupo G4: presença de material granular e bactérias isoladas.

### 5.7 Topografia da superfície

A característica da superfície cerâmica de acordo com os procedimentos de acabamento e polimento está representada nas Figuras 19. A superfície da cerâmica glazeada apresentou aspecto mais liso e uniforme. No grupo G2 (Glaze + Broca diamantada), nota-se uma superfície mais irregular caracterizada por picos e vales. O grupo G3 (Glaze + Broca diamantada + Ponta de borracha) resultou em uma superfície mais regular que o grupo G2 em função da ação da borracha especialmente nos picos. O grupo G4 (Glaze + Broca diamantada + Ponta de borracha + Disco de feltro com pasta diamantada) apresentou-se semelhante ao grupo G1 em algumas regiões, porém com permanência de algumas pequenas irregularidades.

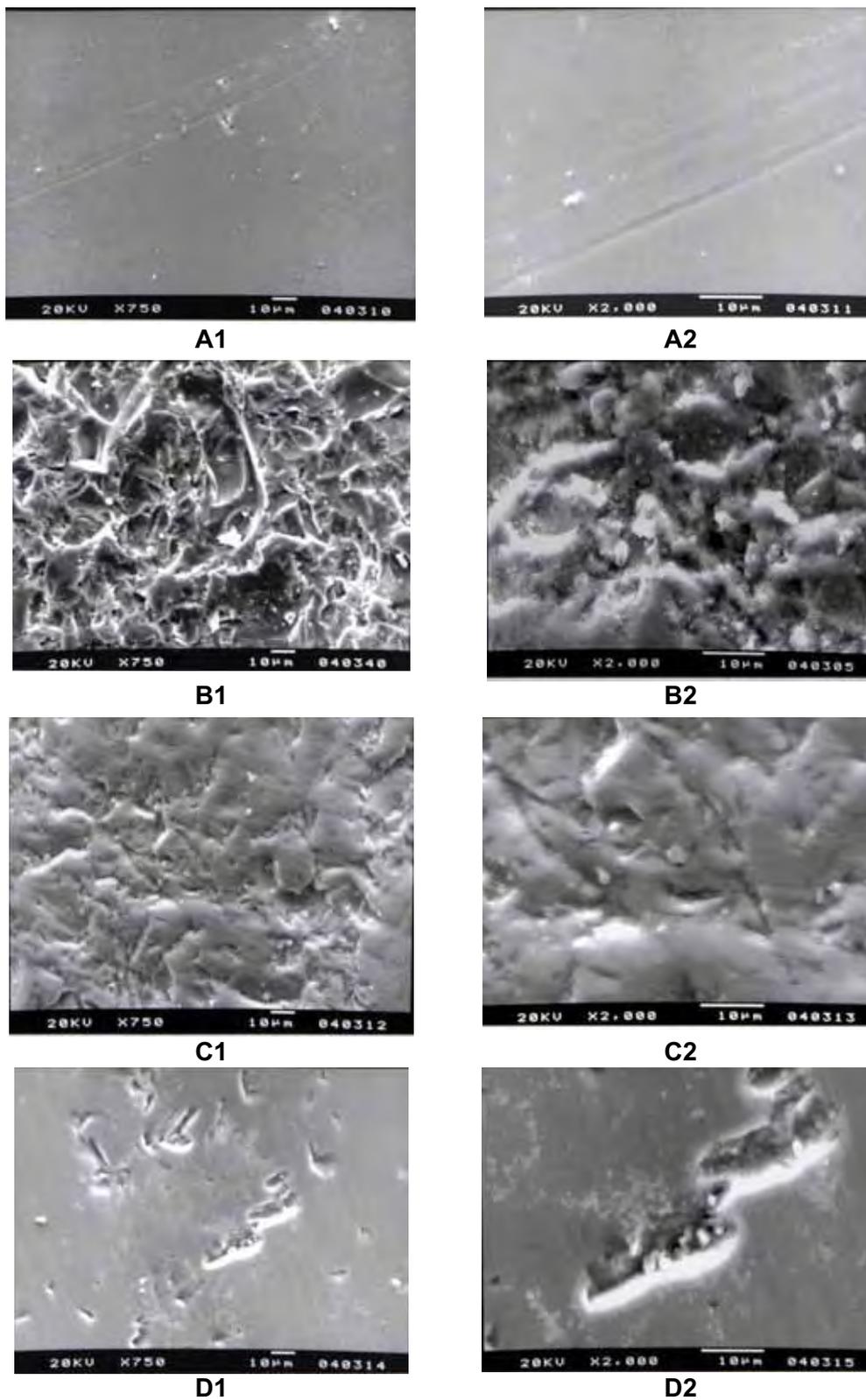


Figura 20 – Micrografias representativas das superfícies da cerâmica VM7 em 750x e 2000x: (A) G1, (B) G2, (C) G3, (D) G4

## 6 DISCUSSÃO

Ajuste intra-oral de restaurações cerâmicas após a cimentação faz-se necessário em algumas situações clínicas, a fim de corrigir interferências oclusais e realizar o acabamento das margens da porcelana. Porém, esses ajustes podem alterar a camada de glaze, resultando em maior rugosidade superficial, interferindo assim, nas propriedades da superfície<sup>22, 9</sup>.

O aumento na rugosidade superficial pode favorecer a formação e maturação do biofilme dentário<sup>57, 56</sup>, resultando em maior risco à ocorrência de cárie secundária e doença periodontal.

Pequenas irregularidades são pontos iniciais para a adesão e colonização bacteriana, pois funcionam como nichos onde bactérias permanecem protegidas de forças mecânicas de remoção do biofilme comumente presentes na cavidade bucal<sup>26,41,48</sup>. No presente estudo, a superfície cerâmica glazeada submetida ao acabamento com broca diamantada (G2) apresentou-se mais irregular (com a maior rugosidade superficial). As amostras de G3 (glaze, broca diamantada e ponta de borracha) apresentaram a segunda maior rugosidade. Essas irregularidades (em G2 e G3) possibilitaram nichos para adesão e colonização bacteriana (Figura19). Maior biovolume e espessura do biofilme foram verificadas em G2 e G3 por meio de MCL. Em MEV, a superfície da amostra cerâmica de G2 pareceu apresentar maior colonização bacteriana. Estes resultados confirmam estudos prévios que demonstraram associação entre quantidade de biofilme formado e rugosidade superficial em diferentes materiais odontológicos como cerâmica, titânio e resina acrílica<sup>20; 17, 61,35</sup>.

Correlação positiva significativa entre rugosidade superficial e propriedades quantitativas do biofilme como espessura

média e biovolume foi observada no presente estudo. As superfícies cerâmicas apenas glazeadas (G1) apresentaram o menor valor de rugosidade superficial seguidas pelas superfícies glazeadas, desgastadas com broca diamantada, e polidas com pontas de borracha e discos de feltro impregnados com pasta diamantada (G4). Consequentemente, menor biovolume e espessura média de biofilme foram verificadas nestes grupos.

A energia livre superficial do material restaurador é outra propriedade que influencia na formação do biofilme. Segundo Van Pelt et al.<sup>79</sup> a maioria dos microrganismos encontrados na cavidade oral apresentam alta energia livre de superfície, e se aderem preferencialmente a substratos também com alta energia livre superficial (hidrofílicos). Estudos *in vivo*, em humanos e em cães, demonstraram que, significativamente, menos biofilme foi formado sobre materiais com baixa ELS, ou seja, hidrofóbicos<sup>78, 55, 56</sup>. O mesmo foi observado *in vitro* sobre diferentes materiais cobertos com saliva<sup>54</sup>. Explicação para este fato seria a menor retenção do biofilme formado sobre superfícies com baixa ELS sob a ação das forças de remoção presentes na cavidade bucal. A ELS do material parece influenciar no tipo de proteína salivar adsorvida durante a formação da película adquirida, e/ou na conformação e quantidade de moléculas protéicas adsorvidas<sup>78, 55</sup>. Alguns autores sugeriram que a remoção de bactérias aderidas parece não ocorrer na interface proteína salivar / bactéria, mas na interface proteína salivar / superfície, ou na massa de proteínas salivares adsorvidas indicando resistência coesiva menor da película adquirida formada sobre materiais com baixa ELS<sup>13, 57</sup>. Esta hipótese foi formulada a partir do estudo de Busscher et al.<sup>13</sup>, que avaliaram a retenção de *S. mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus* sobre o vidro em sistema celular de fluxo. Os autores verificaram que, sem presença de saliva, os quatro tipos bacterianos apresentaram diferentes retenções, mas, na presença da saliva, a retenção bacteriana tornou-se similar.

No presente estudo, avaliação do ângulo de contato da água deionizada foi realizada para determinar a hidrofobicidade da cerâmica, e para verificar se havia diferenças quanto a esta propriedade em um mesmo material submetido a diferentes procedimentos de acabamento e polimento. Os resultados demonstraram diferenças para ângulo de contato indicando que os procedimentos de acabamento e polimento influenciaram na hidrofobicidade da cerâmica. O grupo G1 apresentou superfície mais hidrofóbica que os demais grupos.

Como mencionado anteriormente, o biofilme parece formar-se em menor quantidade sobre superfícies menos rugosas e mais hidrofóbicas. Na corrente pesquisa, G1 foi a superfície mais lisa e a mais hidrofóbica. Todavia, G1 e G4 apresentaram similar espessura média e biovolume de biofilme. Quanto às diferenças na rugosidade superficial, G4 apresentou a segunda superfície mais lisa, sendo mais rugosa que G1, e diferindo dos demais grupos. Quanto a hidrofobicidade, G4 foi similar a G2 e G3 diferindo de G1.

Quando energia livre superficial e rugosidade superficial foram avaliadas conjuntamente, foi verificado que a influência da rugosidade superficial parece ser mais relevante na adesão bacteriana. Quirynen et al. <sup>56</sup>, avaliaram, *in vivo*, o biofilme formado sobre dois materiais com diferentes ELS. Amostras de cada material foram divididas em uma parte lisa ( $Ra = 0,1 \mu m$ ) e outra rugosa ( $Ra = 2.2 \mu m$ ). Os autores verificaram menor quantidade de biofilme sobre a parte lisa do material com baixa ELS, mas não encontraram diferenças na parte rugosa das amostras entre os dois materiais. Foi sugerido pelos autores, que rugosidade superficial é uma propriedade mais importante que ELS na formação e composição do biofilme.

As diferenças quanto ao biovolume e espessura média do biofilme formado *in situ* após 8 h no ambiente bucal entre os grupos do presente estudo, podem, portanto ser atribuídas as diferenças na rugosidade superficial e energia livre superficial entre os grupos.

Entretanto, não se pode determinar a intensidade na qual cada uma destas propriedades pode ter influenciado na formação ou retenção do biofilme.

Aksoy et al.<sup>3</sup>, avaliaram o efeito de diferentes procedimentos de acabamento e polimento sobre a rugosidade e a hidrofobicidade de uma cerâmica. O glaze resultou em superfície mais lisa e com baixo ângulo de contato, indicando uma superfície mais hidrofóbica quando comparada a superfícies que receberam outras técnicas de polimento, ratificando os resultados encontrados no presente estudo.

Com relação às técnicas de acabamento e polimento para restaurações cerâmicas, vários estudos têm demonstrado que o glaze resulta em menor rugosidade da superfície. Entretanto, algumas técnicas de acabamento e polimento podem ser usadas como alternativa ao glaze nos casos em que o ajuste intra-oral da cerâmica faz-se necessário<sup>22, 36</sup>.

O uso de pasta diamantada para polimento de superfícies cerâmicas não foi suficiente para restabelecer a lisura superficial obtida inicialmente com o glaze<sup>63, 50, 51</sup>. Raimondo et al.<sup>58</sup>, relataram, com base em MEV, que pastas de polimento não resultaram na mesma rugosidade superficial do glaze. Scurria; Powers<sup>67</sup>, relataram que com cerâmicas feldspáticas é possível obter menor rugosidade superficial, resultando de uma superfície mais lisa que o glaze, usando polimento com broca diamantada de 4 µm ou 1 µm seguido de pasta diamantada após simulação do ajuste oclusal com broca diamantada de 60 µm.

Em cerâmica feldspática reforçada por alumina o acabamento com broca diamantada e polimento com pontas de borracha e discos de feltro impregnados com pasta diamantada produziram rugosidade superficial similar à obtida com o glaze<sup>10</sup>. Entretanto, no presente estudo, superfícies de cerâmica feldspática micro-particulada que receberam acabamento com broca diamantada e polimento com pontas de borracha e discos de feltro impregnados com pasta diamantada apresentaram rugosidade superficial maior do que a obtida na cerâmica

glazeada. O fabricante da cerâmica feldspática micro-particulada avaliada no presente estudo ressaltou que sua micro-estrutura apresenta distribuição mais homogênea das fases vítreas possibilitando superfícies mais lisas e homogêneas. Essas características micro-estruturais como tamanho e forma dos cristais <sup>21</sup> poderiam explicar porque rugosidade similar foi obtida entre o glaze e a técnica de acabamento e polimento descrita acima na cerâmica feldspática reforçada por alumina <sup>10</sup>, sendo que o mesmo não ocorreu para cerâmica feldspática micro-particulada.

Na análise da topografia superficial em MEV no presente estudo, o polimento mecânico com ponta de borracha após o uso da broca diamantada não foi suficiente para obter uma característica superficial semelhante ao glaze. Porém a adição do disco de feltro impregnado com pasta diamantada trouxe benefício adicional, proporcionando uma superfície mais uniforme (Figura 19). Contudo, a adição do disco de feltro impregnado com pasta diamantada no polimento não alcançou a lisura superficial do glaze devido a permanência de algumas irregularidades causadas pelo uso broca diamantada.

O estudo dos mecanismos que envolvem adesão de microrganismos aos materiais restauradores é de fundamental importância devido ao papel destes na patogênese da cárie e doença periodontal. Estudos utilizando diferentes metodologias têm demonstrando diferenças no biofilme formado em diferentes materiais restauradores <sup>38,61</sup> Essas variações podem ocorrer devido às propriedades dos materiais como energia livre de superfície e rugosidade superficial <sup>54, 57</sup>.

Deve ser considerado que o comportamento de bactérias planctônicas é diferente do comportamento das mesmas bactérias em um biofilme multi-espécies <sup>19</sup>. Assim, o interesse pelos mecanismos que levam a formação do biofilme sobre materiais restauradores tem privilegiado as metodologias de estudo *in situ* <sup>27, 38, 61, 62</sup>.

A microscopia eletrônica de varredura tem sido usada de longa data para avaliar o biofilme formado sobre diferentes materiais<sup>65, 66, 61, 62, 41</sup>. Entretanto, o uso desta ferramenta de análise requer a fixação e desidratação do biofilme, o que pode alterar a sua característica original dificultando uma avaliação mais precisa. Com o advento da microscopia confocal laser, os biofilmes puderam ser avaliados sem necessidade de fixação e desidratação mantendo sua arquitetura original<sup>38, 6</sup>. Atualmente, a microscopia confocal laser deve ser a ferramenta de escolha para estudar os biofilmes *in situ*<sup>49,47</sup>, devido as suas características não invasivas e não destrutivas.

Devido a estes aspectos, o presente estudo avaliou a formação do biofilme *in situ* analisando-o com microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal laser.

Em microscopia eletrônica de varredura, o presente trabalho observou presença de cocos e bastonetes sobre as amostras, sendo que a colonização bacteriana pareceu maior nos grupos com maior rugosidade (Figuras 16, 17 e 18). A formação do biofilme inicia-se com a adesão de cocos e bastonetes curtos seguidos por microrganismos filamentosos e bastonetes<sup>43</sup>. Com a maturação do biofilme, microrganismos filamentosos e espiroquetas são visualizados<sup>48</sup>. Lie<sup>42</sup>, encontrou no biofilme formado sobre hidroxiapatita, em até 48 h no ambiente bucal, a presença de cocos Gram positivos e bastonetes curtos. Nyvad; Fejerskov<sup>48</sup>, verificaram, após 4 h, presença de cocos e bastonetes curtos no biofilme formado *in situ* sobre a superfície de esmalte e cimento. No biofilme formado *in situ* sobre diferentes materiais restauradores após 4 e 24 h, Siegrist et al.<sup>69</sup> e Hannig<sup>27</sup>, também observaram predomínio de cocos e bastonetes.

A microscopia confocal laser conjuntamente com o uso de corantes fluorescentes, como o kit LIVE \ DEAD (Bac light ®) utilizado na presente pesquisa e em outros trabalhos<sup>11, 29,32</sup> vem sendo usada para descrever a arquitetura do biofilme, quantificar a viabilidade dos

microrganismos, e avaliar a espessura média<sup>11, 32, 5, 38, 46, 70</sup> e o volume do biofilme bacteriano<sup>28,53</sup>.

Os dados quantitativos experimentais calculados pelo programa COMSTAT representam um meio de obter informações numéricas do biofilme, e que podem ser comparados com a arquitetura formada a fim de melhor entendimento do desenvolvimento do biofilme<sup>28</sup>. Dentre as ferramentas que o programa COMSTAT oferece, o presente trabalho optou por aquelas mais comumente descritas na literatura como a espessura média e o volume do biofilme bacteriano<sup>28, 53</sup>.

Maior espessura média ( $\mu\text{m}$ ) e biovolume ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ) do biofilme foram observadas em G2 e G3, apresentando correlação positiva com rugosidade superficial. Estes resultados concordam com a análise descritiva das imagens digitais, onde nas condições experimentais G2 e G3, o biofilme formado pareceu apresentar maior quantidade de células bacterianas, sendo que no G2 o biofilme recobriu completamente a superfície da cerâmica (Figura 9).

No aumento de 40x (Figura 10 C) pôde-se observar a interação das bactérias coradas de vermelho com a matriz de polissacarídeo corada de verde. Observações semelhantes foram verificadas em estudos prévios<sup>40, 19</sup>.

Análise da viabilidade bacteriana foi possível devido ao corante empregado no corrente trabalho composto por dois ácidos nucléicos: Syto 9 e Iodeto isopropídeo<sup>30, 31, 32</sup>. Ambos os ácidos nucléicos apresentam fluoríforos, que possibilitam a liberação de energia após a passagem do laser. O syto 9 penetra em toda a membrana bacteriana e cora as células de verde, enquanto iodeto isopropídeo penetra em células bacterianas com membrana danificada. Pode ocorrer a combinação dos dois ácidos nucléicos produzindo células bacterianas com coloração alaranjadas, as quais não devem ser avaliadas quanto a viabilidade.

Embora, tenha sido verificada maior espessura e biovolume do biofilme formado nos grupos G2 e G3, quando comparados

a G1 e G4, não foram observadas diferenças quanto a proporção de células viáveis e não viáveis nos grupos. Isso provavelmente ocorreu devido a todos os grupos serem compostos pelo mesmo material, a cerâmica micro-particulada. No estudo de Auschill et al <sup>6</sup> , foi verificado maior vitalidade das bactérias do biofilme formado sobre cerâmicas quando comparadas às resinas compostas.

O presente estudo avaliou um único material, uma cerâmica feldspática micro-particulada submetida a diferentes procedimentos de acabamento e polimento. Este material foi eleito para a pesquisa por se tratar de um material inserido recentemente no mercado. Contudo, os resultados obtidos não podem ser inferidos a outras cerâmicas odontológicas com outras características estruturais. Assim, estudos são necessários para verificar qual o melhor sistema de acabamento e polimento para as demais cerâmicas no aspecto de formação do biofilme dentário.

## 7 CONCLUSÃO

Com a metodologia utilizada no presente estudo parece-nos lícito concluir que:

- a) a superfície cerâmica glazeada apresentou a menor rugosidade superficial, e a superfície cerâmica glazeada e submetida ao acabamento com broca diamantada apresentou a maior rugosidade superficial. Nenhum procedimento de acabamento e polimento testado produziu lisura superficial similar ao glaze.
- b) os procedimentos de acabamento e polimento testados influenciaram na hidrofobicidade da superfície cerâmica, sendo a cerâmica glazeada a mais hidrofóbica.
- c) a cerâmica glazeada e a cerâmica glazeada e submetida a acabamento com broca diamantada e polimento com pontas de borracha e discos de feltro impregnados com pasta diamantada apresentaram a menor espessura e o menor biovolume do biofilme formado após 8 hs no ambiente bucal.
- d) a proporção entre células viáveis e não viáveis, no biofilme formado após 8 hs no ambiente bucal, não diferiu dentro de cada procedimento de acabamento e polimento empregado na cerâmica.

- e) correlação positiva foi verificada na superfície cerâmica submetida a diferentes procedimentos de acabamento e polimento entre a rugosidade superficial e o biofilme dentário inicial formado *in situ* após 8 hs no ambiente bucal.
  
- f) em microscopia eletrônica de varredura o biofilme formado após 8 hs, caracterizou-se pela presença de cocos e bastonetes isolados sobre a cerâmica glazeada, mas em maior número sobre as superfícies cerâmicas mais rugosas.
  
- g) a característica da superfície cerâmica avaliada em MEV indicou que a cerâmica glazeada apresentou aspecto mais liso e uniforme. A cerâmica glazeada e submetida ao acabamento com broca diamantada foi mais irregular caracterizada por picos e vales. Nenhum procedimento de acabamento e polimento rendeu uma superfície com igual característica à superfície cerâmica glazeada.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Adamczyk E, Spiechowicz E. Plaque accumulation on crowns made of various materials. *Int J Prosthodont.* 1990 May./Jun.; 3 (3): 285-91.
2. Anusavice KJ. Degradability of dental ceramics. *Adv Dent Res.* 1992 Sept.; 6: 82-9.
3. Aksoy G, Polat H, Polat M, Coskun G. Effect of various treatments and glazing (coating) techniques on the roughness and wettability of ceramic dental restorative surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006; 53: 254- 9.
4. Al-Wahadni A. An in vitro investigation into the surface roughness of glazed, unglazed, and refinished ceramic materials. *Quintessence Int.* 2006; Apr.;37(4):311-7.
5. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biology.* 2001; 46: 471-6.
6. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 48-53.
7. Baier RE , Glantz POJ. Characterization of oral *in vivo* films for on different types of solid surfaces . *Acta Odontol Scand.*1978; 36: 289-300.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda:US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em:

8. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater.* 1997 Jul.;13: 258-69.
9. Bottino MA. *Estética em reabilitação oral metal-free.* São Paulo: Artes médicas, 2002. cap. 5 p. 213.
10. Bottino MC, Valandro LF, Kantorski K Z, Bressiani JC, Bottino MA- Polishing Methods of na Alumina –Reinforced Feldspar Ceramic- *Braz Dent J.* 2006; 17(4): 285-9.
11. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. LIVE/DEAD ® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods.* 1999 Jul; 37(1):77- 86.
12. Brex M, Theilade J, Attstron R. An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *J Periodontol Res.* 1983 Mar; 18 (2):177-86.
13. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J, Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance e for adhesion . *Appl Env Microbiol.* 1984;48: 980 -3.
14. Chan C, Weber H. Plaque retention on teeth restored with full-ceramic crowns: a comparative study. *J Prosthet Dent.*1986 Dec; 56(6): 666-71.
15. Camacho GB, Vinha D, Panzeri H, Nonaka T ,Gonçalves M. Surface roughness of a dental ceramic after polishing with different vehicles and diamond pastes. *Braz Dent J.* 2006; 17(3) 191-4.
16. Carlsson K , Liljeborg A. A confocal laser microscope scanner for digital recording of optical serial sections. *J. Micros.*1989 feb;

- 153: 171-80.
17. Castellani D, Bechelli C, Tiscione E, Lo Nostro A, Pierleoni PP *In vivo* plaque formation on cast ceramic (Dicor) and conventional ceramic. *Int J Prosthodont.* 1996 Sep/Oct;9; (5): 459-65.
  18. Chisterson CE, Duford RG, Glantz PJ, Baier RE. Effect of critical surface tension on retention of oral microorganisms. *Scand J Dent Res.* 1989 June; 97 (.3):.247-56.
  19. Costerton J.W, Lewandowski Z , de BeerD, Caldwell DE, Korber DR, Jamer GA. Biofilms the customized microniche *J. Bacteriol* .1994 ;176: 2137-42.
  20. de Wet FA, Ferreira MR. Dental glazes: surface roughness and plaque accumulation. *Quintessence Int.* 1980 Sep; 9:127-35.
  21. Della Bona A. Characterizing ceramics and the interfacial adhesion to resin: I- The relationship of microstructure, composition, properties and fractography. *J Appl Oral Sci.* 2005; 13(1): 1-9.
  22. Fuzzi M, Zaccheroni Z, Vllania G, Scaning. Electron microscopy and profilometer evaluation of glazed and polished dental porcelain. *Int J Prosthodont.* 1996; 9(5): 452-8.
  23. Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma – sprayed dental implant surfaces- *Clin Oral Implants Res.* 1993; 4: 53-64.
  24. Gomis MJ, Bizar J, Anglada JP, Samsó J, Peraire M. Comparative evaluation of four finishing systems on one ceramic surface. *Int J Prosthodont.* 2003;16: 74-7.
  25. Hahn R, Weiger R, Netuschil L, Brüch M. Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mat.* 1993;

- Sept.; 9(5):312-6.
26. Hanning M. Transmission electron microscopic study of *in vivo* pellicle formation on dental restorative materials. Eur J Oral Sci. 1997 Oct.; 105 (5): 422-33.
  27. Hanning M. Transmission electron microscopic of early plaque formation on dental materials *in vivo*. Eur J Oral Sci. 1999 Feb.; 107 (1): 55-64.
  28. Heydorn A, Nielsen AT, Hetzer M, Sternberg C, Kjaer B, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiol. 2000; 146: 2395-407.
  29. Hope CK, Clements D, Wilson M. Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. J Appl Microbiol. 2002; 93: 448-55.
  30. Hope CK, Wilson M. Measuring the thickness of an outer layer of viable bacteria in an oral biofilm by viability mapping. J Microbiol Methods. 2003 Sep; 54(3):403-10.
  31. Hope CK, Wilson M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. J Microbiol Methods. 2006 Sep; 66(3):390-8.
  32. Hu Z, Hidalgo G, Houston PL, Hay A.G., Shuler M.L, Abruña H.D, et al. Determination of spatial distributions of zinc and active biomass in microbial biofilms by two-photon laser scanning microscopy. Appl environmental microbiol. 2005 Jul.; 71(7): 4014-21.
  33. Jendresen M D, Glantz PO. Clinical adhesiveness of selected dental materials. An *in vivo* study. Acta Odontol Scand. 1981; 39: 39-45.

34. Jung M., Wehten O., Klimek J., Finish and polishing of indirect composite and ceramic inlays in vivo: occlusal surfaces- Oper dent. 2004; 29(2): 131-41.
35. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans, Prosthetic Dent. 2000; 83 (6):665-7.
- 36 Klausner LH, Cartwright CB, Charbeneau GT. Polished versus autoglaze porcelain surface . J Prosthet Dent .1982; 47: 157-62.
- 37 Kantorski KZ, Valandro LF, Scotti R, Della Bona A, Bottino AM. Surface roughness of glazed feldspar, alumina, e zirconia- based ceramics. Cienc Odontol Bras. 2006. out/dez; 9 (4): 12-17.
- 38 Konishi. N, Toril Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiama, . Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. J Oral Rehabil.2003 Aug; 30 (8): -790 -5.
- 39 Kou W, Moulin M, Sjögren G., Surface roughness of five different dental ceramic core materials after grinding and polishing . J of Oral Rehabil. 2006; 33: 117-24.
- 40 Lawrence, J R et al. Optical sectioning of microbial biofilms. J Bacteriol. 1991; 173: 6558-67.
- 41 Lie T. Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. Scand J Dent Res. 1977 May; 85 (4): 217-31.
- 42 Lie, T. Morphologic studies on dental plaque formation. Acta Odontol Scand.1979; 37(2): 73-85.
- 43 Loe, H. Theilade E, Jensen, S B. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965; 36: 177-187.
- 44 Molecular Probes. LIVE/DEAD ® BacLight™ bacterial viability kits: product information. Molecular Probes Inc. 2004; 1-8.

- 45 Nassar U, Meyer AE, Ogle RE, Baier RE. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. *Periodontology* 2000.1995 Jun.; 8: 114-24.
- 46 Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol.* 1998 Apr.; 43(4): 277-85.
- 47 Neu TR, Lawrence JR. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol.*1997; 24; 11-25.
- 48 Nyvad B, Fejerskov, O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res.*1987 Aug.; 95 (4): 287-96.
- 49 Palmer RJ; Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Environmental biotechnol.*1999; 10: 263-6.
- 50 Patterson CJW, Mc Lundie AC, Stirrups DR, Taylor WG. Refinishing of porcelain by using a refinishing kit. *J Prosthet Dent.* 1991; 65: 383-8.
- 51 Patterson CJW, Mc Lundie AC, Stirrups DR, Taylor WG. Efficacy of a porcelain refinishing system in restoring surface finish after grinding with fine and extra fine diamond burs. *J Prosthet Dent.* 1992; 68: 402-6.
- 52 Pereira SMB, Kantorski KZ, Brentel AS, Valandro LF, Bottino MA, SEM Analysis of in situ early bacterial colonization on two novel feldspathic ceramics submitted to different types of glazing. *Contemporary Dental Practice.* 2008 Feb.; 9(2):1-7.
- 53 Petrisor AI, Cuc A, Decho A W, Reconstruction and computation of microscale biovolumes using geographical information systems: potential difficulties. *Research microbiol.* .2004; 155: 447-54.

- 54 Pratt-Terpstra H, Weerkamp AH, Bussher HJ The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. J Dent Res. 1989 Mar.68; (3):463-7.
- 55 Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, et al. The influence of surface free on planimetric plaque growth in man. J Dent Res. 1989 May; 68(5):796-99.
- 56 Quirynen M, Marechal M., Bussher H J, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early formation . J Clin Periodontol 1990; 17: 138-144.
- 57 Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface- free energy on supra and subgingival plaque formation in man . A review of literature. J Clin Periodontol.1995:22: 1-14.
- 58 Raimondo RI, Richardson JT, Wiedner B. Polished versus autoglated dental porcelain. J Prosthet Dent 1990; 64: 553-7.
- 59 Ramp MH, Suzuki S, Cox CF. Evaluation of wear. Enamel opposing three ceramic materials and a gold alloy. J Prosthetic Dent 1997; 77; (5):523-30.
- 60 Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli PS, Simon M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. Clin Oral Impl Res 1998; 9: 357-64.
- 61 Rimondini L, Fare S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. J Periodontol. 1997 June; 68 (6): 556-62.
- 62 Rimondini L, Fare S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an *in vitro* and *in vivo* study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2002 Nov./Dec.; 17(6): 793-8.

- 63 Sarac D, Sarac S, Yuzbasionglu E, Bal S. The effects of porcelain polishing on color and surface texture of feldspathic porcelain. *The J. Prosthetic Dent* 2006; 96(2). 254-61.
- 64 Satou J, Fukunaga A, Morikama A, Matsumae I, Satou N, Shintani H. Streptococcal adherence to uncoated and saliva-coated restorative. *J Oral Rehabil.* 1991 Sep. ;18 (5) ;421-9.
- 65 Scott R, Kantorski KZ, Monaco C, Valandro LF, Ciocca L, Bottino MA. Early plaque colonization on polished and glazed- zirconium ceramic surface. 2006, v. 55 in press.
- 66 Scotti R., Kantorski KZ, Monaco C, Valandro LF, Ciocca L, Bottino MA. SEM Evaluation of in situ early colonization on a Y-TZP Ceramic: A pilot study. *Int J Prosthodont.* 2007; 20 (4); 151-4.
- 67 Scurria MS, Powers JM. Surface roughness of two polished ceramic materials. *J Prosthet Dent.* 1994; 71; 174-7.
- 68 Seghi RR, Rosenstiel SF, Bauer P. Abrasion of human enamel by different dental ceramic *in vitro*. *J Dental Res.* 1991; 70 (3): 221-5.
- 69 Siegrist BE., Brex MC, Gusbert FA, Joss A, Lang NP. *In vivo* early human dental plaque formation on different supporting substances. *Clin Oral Impl Res.* 1991 Jan. / Mar.; 2(1): 38-46.
- 70 Staudt C, Horn H, Hempel DC, Neu TR, Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilm. *Biotechnology and bioengineering.* 2004 dec.; 88 (5); 65-9.
- 71 Stenberg R, Matsson L. Clinical evaluation of glass ceramic inlays (DICOR). *Acta Odontol Scand.* 1993; 51(2): 91-7.
- 72 Suljak, J.P. et al. Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. *J Dent.* 1995 Jun.; 23 (3); 171-6.
- 73 Tanner J, Robinson C, Söderling E, Vallitu P. Early plaque formation on fibre- reinforced composites in vivo. *Clin Oral Invest.* 2005; 9 : 154- 60

- 74 Takatsuka T et al. Adhesion *in vitro* of oral Streptococci to porcelain composite resin cement and human enamel. Dent Mat J. 2000 dec.; 19 (4): 363-72
- 75 Takeuchi H, Yamamoto K, Ultrastructural analysis of structural framework in dental plaque developing on synthetic carbonate apatite to human tooth surfaces. Eur J Oral Sci.2001; 109: 249-59.
- 76 Tholt de Vasconcellos B, Miranda-Junior WG, Prioli R, Thompson J, Oda M. Surface roughness in ceramics with different finishing techniques using atomic force microscope and profilometer. Oper Dent. 2006 Jul.-Aug; 31(4): 442-9.
- 77 Togashi AY, Montanha TP, Tarzia O. Levantamento epidemiológico do fluxo salivar da população da cidade de Bauru. Rev de odontol Bauru. 1998; 6(2): 47.
- 78 Van Dijk, J., Herkstroter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J Surface-free energy and bacterial adhesion. An *in vivo* study in beagle dogs. J Clin Periodontol.1987; 14: 300-4.
- 79 Van Pelt AWJ, Mei HC, Bussher HJ, Arends J, Weerkamp AH. . Surface free energies of oral streptococcus sanguis. FEM microbiol. 1984; 25: 279-82.
- 80 Yamamoto, K, Noda, H, Kimura, K. Adherence of oral *streptococci* to composite resin restorative materials. J Dent Res. 1989 Oct; 17 (5); 225-9
- 81 Yerly J, Hu Y, Jones SM, Martinuzzi RJ. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm image. J. Microbiol Methods. 2007. in press.
- 82 Ward MT, Tate WH, Powers JM. Surface roughness of opalescent porcelains after polishing. Oper Dent. 1995; 20: 106-10.
- 83 Wise MD, Dykema RW. The plaque-retaining capacity of four dental materials. J Prosthet Dent. 1975 Feb; 33(2): 178-90.

- 84 Weerkamp AH, Van der Mei HC, Bussher HJ. The surface free energy of oral Streptococci after being coated with saliva and its relation to adhesion in the mouth J Dental Res 1985 Oct.; 64 (10); 164-72.
- 85 Woldringh, CLMA, de Jong, W, van den Berg e Koppes L., 1977 Morphological analysis of the division cycle of two Escherichia coli substrains during slow growth. J Bacteriol. 1977;131: 270-9, .
- 86 Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. J Dent Res. 2000; 79: 21-7.
- 87 Wright MD, Madri R, Driscoll CF, Romberg E, Geoffrey A, Tompson , Runyan DA. Comparison of three system for the polishing of an ultra –low fusing dental porcelain- J Prosthetic dent. 2004; 92 (5): 486-90.

## Apêndice A- Termo de Consentimento livre e esclarecido

Caro(a) Senhor(a)

Eu, ALINE SCALONE BRENTEL, Aluna de mestrado em Materiais Odontológicos –Especialidade Prótese Dentária portador do CPF 29716523866, estabelecido à Rua Particular A, 57– Jd.Santa Cruz , na cidade de São Paulo, telefone para contato 011-6331-2751, vou coordenar uma pesquisa cujo título é Efeito do sistema de acabamento e polimento na rugosidade superficial e formação IN SITU de biofilme dentário inicial em cerâmica feldspática micro-particulada. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de diferentes sistemas de acabamento e polimento na rugosidade superficial e formação, IN SITU, do biofilme dentário inicial avaliado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal laser (MCFL) ,em cerâmica feldspática micro-particulada. Amostras padronizadas de cerâmica serão confeccionadas e divididas em cinco grupos de acordo com o acabamento e polimento realizado. Amostras de cada grupo serão fixadas em dispositivos bucais confeccionados para 8 indivíduos selecionados com adequado padrão de higiene bucal. Após 4 hs no ambiente bucal, as amostras serão removidas do dispositivo, parte será avaliada em MEV e parte com MCFL. A análise com MEV será realizada por meio da seleção aleatória de cinco campos para cada amostra, nos quais escores serão atribuídos para verificar a colonização bacteriana. Para análise com MCFL, secções ópticas serão realizadas e a espessura do biofilme depositado sobre cada amostra será determinada pela contagem do número de secções ópticas em que bactérias podem ser encontradas. Nos dois tipos de microscopia será realizada análise descritiva do material

celular e acelular depositado. Os dados estatísticos serão submetidos a testes estatísticos adequados. O Sr. (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho, que terá a supervisão do Professor Titular Marco Antônio Bottino, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese Dentária e do Professor Titular Antônio Olavo Cardoso Jorge, do departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP-CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contacto com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail [suely@fosjc.unesp.br](mailto:suely@fosjc.unesp.br) e comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

#### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

NOME/RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

Rg \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_

Endereço completo:- \_\_\_\_\_

Assinat.Resp: \_\_\_\_\_

Assinat.Pesquisador: \_\_\_\_\_

Apêndice B- Ficha para seleção dos voluntários



*Unesp - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*

**Ficha para seleção dos Voluntários**

Declaração do Voluntário

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_ R.G. N° \_\_\_\_\_, declaro para todos os fins legais que prestarei todos os esclarecimentos corretos sobre meu estado de saúde, nada omitindo no questionário que se segue.

São José dos Campos,            de    de 2007

Assinatura \_\_\_\_\_

**1 - Anamnese***1- Dados do voluntário:*

Nome \_\_\_\_\_

Sexo \_\_\_\_\_

Data de Nascimento \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Nacionalidade \_\_\_\_\_

*2- Saúde Geral*

Quando foi ao médico pela última vez?

Está em tratamento médico?

Esteve em tratamento de quimioterapia nos últimos 6 meses?

Toma algum medicamento?

Se sim, Qual?

Fez uso de antibiótico nos últimos 3 meses?

Usuário de drogas?

Fumante?

Uso de bebidas alcoólicas?

Quando foi a última visita ao dentista?

As gengivas sangram durante a escovação?

Já fez algum tipo de extração dental?

Utiliza algum tipo de prótese dental?

## 2 - Exame clínico

Inicialmente avaliou-se a ausência de lesões cariosas e de restaurações ou próteses inadequadas. A seguir, o Índice Gengival de Løe & Silness 1963 foi aplicado para verificar a condição de inflamação gengival.

Índice Gengival de Løe & Silness, 1963.

Código	Critérios
0	Gengiva sadia
1	Leve inflamação: alteração de cor e textura, sem sangramento à sondagem.
2	Inflamação moderada: rubor e edema, brilhante, com sangramento à sondagem.
3	Inflamação severa: rubor intenso, edema, tendência à sangramento espontâneo.

Quatro faces por dente foram avaliadas, vestibular, lingual ou palatina, mesial e distal, sendo atribuído um escore para cada face. O escore do dente foi a soma dos escores de cada face.

	16	12	24	36	32	44
Vestibular						
Lingual						
Mesial						
Distal						

$$I L S = \frac{\text{soma dos códigos das faces dos dentes}}{6 \text{ dentes} \times 4 \text{ faces}} = \underline{\hspace{2cm}}$$

Escores referentes a soma do Índice gengival de Loe & Silness

Soma	Resultado
0-1	Higiene bucal satisfatória
1,1-2	Higiene bucal regular
2,1-3	Higiene bucal deficiente
3,1-....	Higiene bucal muito má

### 3 - Teste de sialometria

Fluxo de salivagem = \_\_\_\_\_

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia, Campus São José dos Campos , Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”.

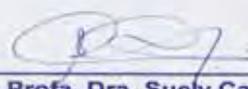
  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
Av. Eng. Finlândia José Longo, 777 - M. São Diniz  
Cidade de São José dos Campos - SP - F. (12) 3947-0028  
Fax: (12) 3947-0010 / suely@focjoc.unesp.br

---

 **CERTIFICADO**  
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **051/2006-PH/CEP**, sobre **“Efeito do sistema de acabamento e polimento na rugosidade superficial e formação In Situ de biofilme dentário em cerâmica feldspática microparticulada”**, sob a responsabilidade de **ALINE SCALONE BRENTTEL**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 17 de agosto de 2006.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

*Brentel AS. The effect system of finishing and polishing the surface roughness and formation in situ of biofilm in dental initial feldspática ceramic micro-particulate. [dissertation]. São José dos Campos School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP-São Paulo State University; 2008*

### **ABSTRACT**

*This study assessed the effect of different systems of finishing and polishing in a ceramic micro-particulate feldspatic, with respect, the surface roughness, hydrophobicity, topography and morphology analysis using SEM and analysis of biofilms, with respect to its thickness and its average biovolume using MCVL. Specimens (5mmX2mm), were distributed into four groups (n = 10) as, finishing and polishing used: G1: glaze; G2 - drill diamantada (KG Sorensen); G3 - diamantada drill and polishing with rubber tip (KG Sorensen); G4 - diamantada drill and polishing with rubber tip followed by pulp diamantada with disc of felt. Rugosidade was evaluated in rugosímetro (Surftest SJ-301, Mitutoyo) before and after applying the glaze. The hydrophobicity was evaluated by a goniometer (Ramé-Hart - DROPimage, Advanced, USA) Ten patients used a device with the samples for 8h, then they were tested in MCVL. Topography and the morphology were evaluated in SEM. The roughness Ra ( $\mu\text{m}$ ), biovolume and thickness of the biofilm and were analyzed using ANOVA and Tukey. There was no significant difference with respect to the amount of biovolume factor and the average thickness of biofilm between G2 and G3 and between G1 and G4. G1 and G4, were more hydrophobicity, with respect to G2, G3. There are correlated with roughness and formation of biofilms. There is the possibility of hydrophobicity is linked to lower bacterial adherence.*

**KEYWORDS:** *Ceramics, Biofilms, Confocal laser microscopy, Contact angle.*