UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

BEATRIZ CRISTIANE ZUIN MONTEIRO

Adesão de microrganismos sobre superfície de cerâmica de dissilicato de lítio exposta a diferentes soluções

ARAÇATUBA

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

BEATRIZ CRISTIANE ZUIN MONTEIRO

Adesão de microrganismo sobre superfície de cerâmica de dissilicato de lítio exposta a diferentes soluções

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profª. Ass. Drª. Daniela Micheline dos Santos

À Lauro e Fátima, meus pais, com amor, admiração, gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Profª. Adjunto Ana Maria Pires Soubhia e do vice-diretor Profº. Titular Wilson Roberto Poi.

À minha orientadora Daniela Micheline dos Santos, tenho muito orgulho de ser sua orientada. Muito obrigada pela oportunidade, dedicação, preocupação, confiança e paciência despendidos a mim. Com você aprendi o que é ser responsável. Obrigada por contribuir na minha formação acadêmica e como pessoa.

À minha co-orientadora, Ana Cláudia Okamoto, a realização desta pesquisa não poderia ser concluída sem sua ajuda. Me serviu como exemplo com tamanha calma e paciência, me ensinando passo a passo a microbiologia e ficando longos períodos no departamento para a realização dos experimentos.

Ao Robson Varlei Ranieri (técnico do laboratório de microbiologia) pela determinação, paciência e amor com o andamento da pesquisa. Muito obrigada pelas palavras, conselhos, ensinamentos e seu constante bom humor.

As minhas fiéis amigas e companheiras de convivência Isadora, Hayumi, Juliana, Michelle, Maria Luiza e Anelise, por sempre estarem ao meu lado nos dias de alegrias e tristezas, compartilhando momentos inesquecíveis e acontecimentos raros. Com vocês aprendi a ser uma pessoa melhor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

"Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte você pode bater, mas sim, quantos golpes você aguenta levar e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada."

Sylvester Stallone

MONTEIRO, B. C. Z. Adesão de microrganismos sobre superfície de cerâmica de dissilicato de lítio exposta a diferentes soluções. 2014 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba – 2014.

RESUMO

A extensão cervical e a influência de algumas soluções é uma preocupação em relação às restaurações cerâmicas. Sabe-se que para se obter sucesso e longevidade com restaurações estéticas é imprescindível que se tenha saúde periodontal. Términos cervicais que se localizam subgengivalmente podem causar danos a este. Além disso, algumas soluções usualmente utilizadas podem afetar as propriedades de alguns materiais restauradores. Porém, a literatura é escassa quando se trata da influência de tais soluções nas cerâmicas odontológicas. O aumento da rugosidade de superfície causada por estas pode facilitar a adesão de alguns microrganismos patogênicos, provocando inflamação gengival. Sendo assim, o presente estudo avaliou a influência de diferentes soluções na rugosidade de superfície de cerâmica de dissilicato de lítio e a adesão de microrganismo que está envolvido na patogênese da doença periodontal (*Fusobacterium nucleatum*). Foram confeccionados 54 corpos-de-prova cilíndricos de cerâmicas de dissilicato de lítio (5 x 1 mm). Os corpos-de-prova foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, de acordo com as soluções em que foram imersas: fluoreto de sódio a 0,2%, fluoreto fosfatado acidulado à 1,23%, saliva artificial, refrigerante de cola, colutório bucal e peróxido de hidrôgenio a 7,5%. As leituras de rugosidade foram realizadas no período inicial e após o processo de imersão. Após imersão foi realizado os ensaios microbiológicos. Para este, o microrganismo foi cultivado em ágar BHI acrescido de sangue desfibrinado de cavalo. Após a padronização do inócuo, a espécie foi inoculada em caldo BHI com o corpo-de-prova dentro. Após 72 horas, esta foi removida, lavada em um tubo com solução fisiológica para desprendimentos das células aderidas. Esses corpos-de-prova sofreram diluições seriadas sendo posteriormente plaqueadas, para avaliar a quantidade de células aderidas, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias. Como resultados, pode-se

observar que após o período de imersão nas soluções testadas, houve um aumento estatisticamente significativo para todas as soluções, com exceção da saliva. Os corpos-de-prova imersos na solução de fluoreto fosfatado acidulado a 1,23% foram as que apresentaram os maiores valores de rugosidade superficial estatisticamente significativo. Pode-se observar maior adesão de cepas de *Fusobacterium nucleatum* nos corpos-de-prova previamente imersos na solução de fluoreto fosfatado acidulado a 1,23%, sendo estatisticamente significativo em relação às demais soluções.

Palavras – chave: dissilicato de lítio, rugosidade, *Fusobacterium nucleatum.*

MONTEIRO, B. C. Z. Adherence of microorganisms on the surfasse of ceramic lithium disilicate exposed to different solutions. 2014 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba – 2014.

ABSTRACT

Cervical length and the influence of some solutions is a concern in relation to ceramic restorations. It is known that to obtain success and longevity with esthetic restorations it is essential to have periodontal health. Cervical endings that are located subgingivally can cause damage to it. In addition, some solutions commonly used can affect the properties of some restorative materials. However, the literature is sparse when it comes to the influence of such solutions in dental ceramics. The increase in surface roughness caused by these may facilitate adherence of some pathogens, causing gum inflammation. Thus, the present study evaluated the influence of different solutions on the surface roughness of ceramic lithium disilicate and adhesion of microorganism that is involved in the pathogenesis of periodontal disease (*Fusobacterium nucleatum*). 54 cylindrical ceramic samples of lithium disilicate (5x1mm) were prepared. The samples were randomly distributed into groups according to which the solutions were immersed: sodium fluoride 0,2%, acidulated phosphate fluoride 1,23%, artificial saliva, cola, buccal mouthwash and hydrogen peroxide 7,5%. The roughness readings were performed at the beginning and after the immersion process. After soaking the microbiological testing was performed. For this, the organism was grown on BHI agar plus defibrinated horse blood. After standardization of the inoculum, the species was inoculated into BHI broth with the sample inside. After 72 hours, it was removed, rinsed in a saline with a tube for detachment of adhered cells. These samples were then serially diluted and plated to assess the amount of adhered cells, by counting the colony forming units. As a result, it can be seen that after the period of immersion in the solutions, there was a statistically significant increase for all solutions, except for saliva. Immersed in the acidulated phosphate fluoride solution 1,23% samples showed the highest values of statistically significant surface roughness. It can be seen greater adherence of

Fusobacterium nucleatum strains in samples previously immersed in phosphate fluoride acidulate solution 1,23%, which was statistically significant compared to other solutions.

Key words: lithium disilicate, roughness, *Fusobacterium nucleatum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da matriz metálica. 19
Figura 2: Desenho esquemático dos discos. 20
Figura 3: Processo de fixação dos corpos-de-prova. 20
Figura 4: Material de revestimento sendo vertido no interior do anel de silicone. 21
Figura 5: Anel calibrador sendo inserido na superfície superior do anel de silicone. 21
Figura 6: Pastilha cerâmica sendo inserida no anel de revestimento. 22
Figura 7: Remoção do material de revestimento por meio do jateamento com pérolas de vidro. 23
Figura 8: Glazeamento dos corpos-de-prova. 24
Figura 9: Esquema com a distribuição dos grupos de acordo com cada solução e os ensaios microbiológicos. 26
Figura 10: Esquema do processo de imersão dos corpos-de-prova em cerâmica nas soluções correspondentes. 28
Figura 11: Corpo-de-prova sendo lavado com solução fisiológica. 29
Figura 12: Corpo-de-prova inserido em um tubo de ensaio com 10ml de solução fisiológica e levado ao agitador de tubos. 30
Figura 13: Solução com o microrganismo sendo plaqueado em ágar sangue. 31
Figura 14: Colônias encontradas em suas respectivas placas. 31
Figura 15: Contagem das colônias. 32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Soluções utilizadas no estudo. 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de Variância (ANOVA) das médias de rugosidade Rt em relação aos testes de adesão de *Fusobacterium nucleatum.* 34

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão de rugosidade (µm) Rt. 34

Tabela 3 – Valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *Fusobacterium nucleatum.* 35

Tabela 4 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os valores médios de rugosidade Rt e os valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) nos corpos-de-prova onde foram realizados os testes de adesão de *Fusobacterium nucleatum* por 3 dias e 6 dias. 35

.

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	17
3	HIPÓTESE DE ESTUDO	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Preparação dos corpos-de-prova	19
4.2	Soluções utilizadas e divisão dos grupos	24
4.3	Processo de imersão dos corpos-de-prova	27
4.4	Leitura de rugosidade dos corpos de-prova	28
4.5	Cultivo dos microrganismos	28
4.6	Adesão bacteriana	29
5	RESULTADOS	33
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	38

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a crescente valorização que a aparência possui na sociedade atual impulsiona o desenvolvimento de materiais restauradores com excelentes propriedades estéticas[1]. Desse modo, as restaurações cerâmicas odontológicas ganharam grande popularidade, pois se assemelham muito ao dente natural, principalmente quando existe integração e equilíbrio entre cor, formato e textura de superfície. [1,2,3]

A porcelana odontológica é bastante utilizada na confecção de restaurações indiretas como, por exemplo, coroas totais unitárias[4] ou múltiplas, próteses implantossuportadas[5] e fragmentos cerâmicos (facetas laminadas ou lentes de contato dentária).[6,7,8] Este último grupo é voltado para resolução de desarmonias estéticas de dentes anteriores, sendo que pode ser utilizado para redesenhar sorrisos, aumentar as dimensões do dente, alterar o contorno do mesmo e na redução de diastemas.[9]

Mas, seja pela excelente estética final, relativo curto tempo de tratamento ou o reduzido desgaste da estrutura dentária sadia, o profissional muitas vezes sobre-indica este tratamento, realizando-o em pacientes cada vez mais jovens, sendo que alternativas mais conservadoras poderiam ser indicadas.[10]

Um fato preocupante em relação a esse tipo de tratamento diz respeito à extensão cervical destas restaurações.[6] Em dentes anteriores, com o objetivo de esconder a junção entre a peça restauradora e a margem do preparo, o término cervical destas restaurações se localiza subgengivalmente, que em determinadas situações podem causar dano ao periodonto.[6,7]

Dentre as cerâmicas disponíveis no mercado, as de dissilicato de lítio destacaram-se das demais cerâmicas vítreas, pois sua composição (cristais de fluorapatita [Ca10(PO4)6F2] e leucita [K2O-Al2O3-4SiO2]) confere alta resistência e capacidade de reflexão da luz com bastante naturalidade. [8,11-13]

De acordo com a norma ISO 6872, as mesmas podem ser classificadas como ácido-sensíveis, pois os cristais de leucita reagem com soluções ácidas que movem

a matriz vítrea das mesmas, expondo os cristais de sílica, tornando a superfície mais rugosa. [14]

Por um lado, este aumento na rugosidade de superfície proporciona maior efetividade de adesão entre o agente cimentante e o material restaurador, [12,13,15] fato de suma importância, pois após a cimentação adesiva, o conjunto cerâmica e estrutura dentária comportam-se como um corpo único, melhorando a distribuição das forças oriundas da mastigação.[1,15,16,17]

Por outro lado, a superfície destas também pode estar suscetível a soluções erosivas ou mesmo àquelas que contenham flúor em sua composição, as quais podem danificar a superfície de tais restaurações promovendo aumento da rugosidade. [14,16,18]

Sabe-se que a integridade da superfície das mesmas está relacionada com o sucesso clínico do tratamento reabilitador.[12] Algumas pesquisas demonstram que o consumo de alimentos líquidos de baixo pH como, por exemplo, refrigerante de cola [12,14] contribuem para o aumento da rugosidade, pois, quando em contato com as cerâmicas, provocam lixiviação de íons alcalinos, degradando-as.[12,14,19]

Paralelo a isto, a crescente valorização que os meios de comunicação atribuem à beleza faz com que os pacientes busquem o tratamento clareador, na tentativa constante de melhorar a aparência do sorriso.[20] Porém, na literatura, os estudos que avaliam a influência de agentes clareadores nas porcelanas, são controversos [20-23]. Entretanto, nestas pesquisas, as concentrações predominantes são as de uso clínico, sendo pouco estudadas as de uso caseiro.

Além disso, algumas soluções utilizadas na higienização bucal podem afetar as propriedades de alguns materiais restauradores como, por exemplo, os colutórios bucais.

Este fato pode ser atribuído à presença em sua composição de álcool, detergentes, emulsificantes e ácidos orgânicos.[24,25] Entretanto, a literatura é escassa quando se trata da influência de tais soluções nas cerâmicas odontológicas.

Sabe-se que para se obter sucesso e longevidade com restaurações estéticas é imprescindível que se tenha saúde no periodonto que as circunda.[1,26,28] O aumento

da rugosidade de superfície causada por tais soluções pode facilitar a adesão de alguns microrganismos patogênicos, provocando inflamação gengival.[20,28]

Dentre os microrganismos que podem causar danos ao periodonto, destaca-se o *Fusobacterium nucleatum*. Essa espécie de bactéria esta relacionada à gengivite e a periodontite e encontra-se presente na placa bacteriana localizada subgengivalmente [29], no mesmo local de onde se encontra os términos para restaurações estéticas, dentre elas, as facetas laminadas e fragmentos cerâmicos.[27]

Sabe-se que as superfícies das restaurações são colonizadas e formam-se biofilmes sobre elas. Os colonizadores iniciais, como Streptococcus sanguis e Actinomyces viscosus estão presentes em biofilme associado à saúde, já F. nucleatum está associado à doença periodontal. Uma vez que as extensões cervicais estão no espaço biológico, torna-se interessante avaliar a adesão de F. nucleatum que consegue se aderir à película adquirida do esmalte e é o maior co-agregador em biofilmes, sendo relacionado com a gengivite e periodontite. Os microrganismos presentes nos diferentes nichos ecológicos bucais são determinados pelas condições ambientais como ausência de oxigênio.

Fusobacterium nucleatum é uma bactéria gram-negativa anaeróbica mais frequentemente detectada no biofilme subgengival, em áreas sadias e sítios com doença periodontal. [30,31,32] Durante a progressão da mesma, a proporção de *F. nucleatum* aumenta substancialmente [30,33,34,35,] pois esta tem a função de servir de ponte entre as espécies colonizadoras expostas na superfície dentária e espécies que requerem interações para facilitar a entrada na placa bacteriana (colonizadores tardios).[30,36]

Desse modo, como a longevidade dos materiais restauradores e a manutenção da saúde periodontal fazem parte da odontologia moderna, o consumo de alimentos líquidos, colutórios bucais e agentes clareadores devem ser considerados na compatibilidade com materiais restauradores, no caso, cerâmicas odontológicas, a fim de preservar ao máximo as propriedades das mesmas.

2 OBJETIVO

Sendo assim, o presente estudo avaliou a influência de diferentes soluções na rugosidade de superfície de corpos-de-prova confeccionados com cerâmica de dissilicato de lítio de alta translucidez (IPS E.max Press HT) e como esta favoreceu a adesão do microrganismo gram-negativo, associados às doenças periodontais, *Fusobacterium nucleatum*, que faz parte da microbiota autóctone da cavidade oral e que está envolvido na patogênese da doença periodontal.

3 HIPÓTESE DE ESTUDO

A hipótese do estudo foi que as diferentes soluções testadas aumentariam a rugosidade de superfície, favorecendo a adesão do *Fusobacterium nucleatum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos corpos de prova

Para padronizar a confecção dos corpos-de-prova, foi utilizada uma matriz de aço inoxidável retangular com 2,5 mm de espessura, contendo perfurações com 5 mm de diâmetro (Figura 1).

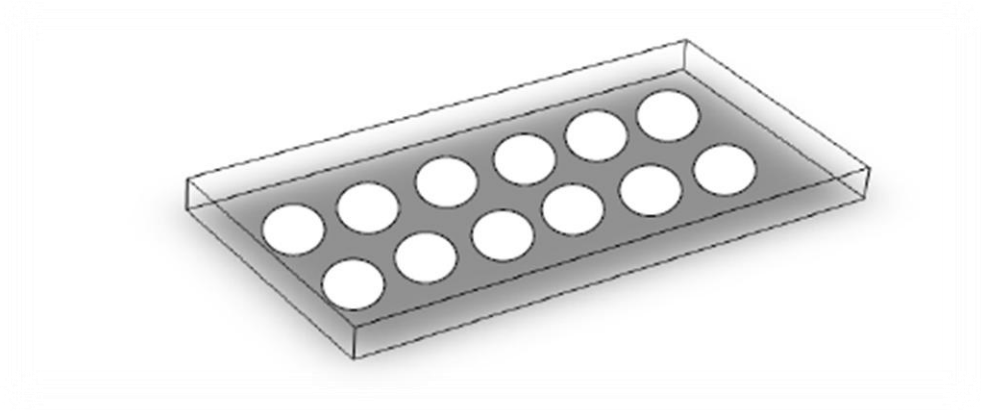


Figura 1: Desenho esquemático da matriz metálica.

Por meio dessa matriz, foram obtidos discos em resina acrílica (Dura Lay, Polidental, Cotia, São Paulo, Brasil). Para isso, essa matriz foi vaselinada e posicionada sobre uma placa de vidro. A resina acrílica foi proporcionada de acordo com as especificações do fabricante e, na sua fase plástica, foi acondicionada sobre as perfurações da matriz, e sobre esta, posicionada outra placa de vidro para regularização da superfície dos discos. Após a polimerização da resina, os discos foram removidos da matriz e, posteriormente, submetidos ao polimento, em politriz semiautomática (Arotec, Aropol – 2V, Cotia, SP, Brasil) com lixas metalográficas de granulação 240, 400, 800 e 1200 (Buehler, Illinois, EUA), sob irrigação constante em água, na velocidade de 300 rpm. O polimento dos discos em resina acrílica foi finalizado com solução diamantada em disco de feltro (Buehler, Illinois, EUA). Cada disco teve sua espessura aferida com o auxílio de um paquímetro digital (500-171-20B, Mitutoyo, Tóquio, Japão), de forma a obter as dimensões propostas verificadas pela figura 2.

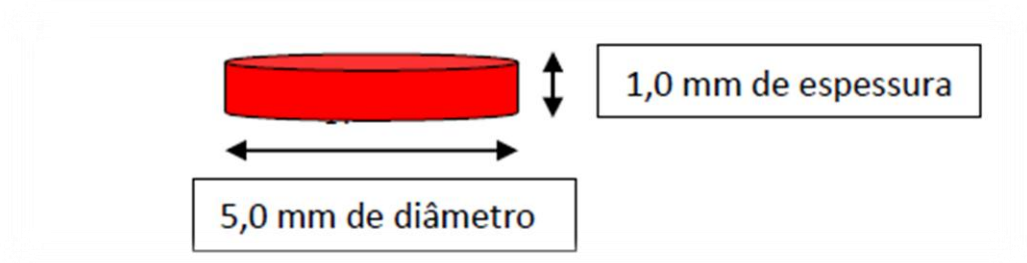


Figura 2: Desenho esquemático dos discos.

Após o polimento, os discos em resina acrílica foram fixados em anéis de revestimento (IPS PressVEST, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) através de canais de alimentação (*sprues*), por onde a pastilha cerâmica amolecida (IPS Emax, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) foi injetada a uma temperatura de 915-920ºC (Figura 3).

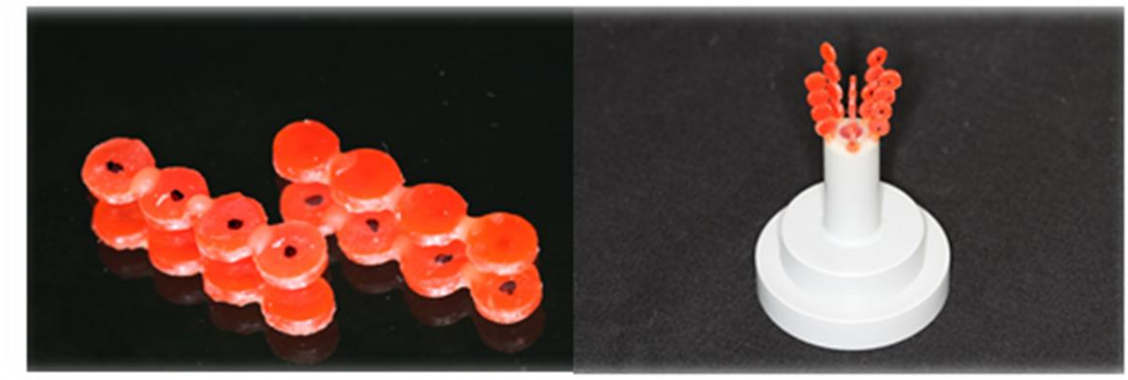


Figura 3: Processo de fixação dos corpos-de-prova.

Posteriormente, os discos fixados foram isolados em um anel de silicone (IPS Silicone Ring, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein). No interior deste anel, foi vertido o material de revestimento manipulado de acordo com as especificações do fabricante (Figura 4).

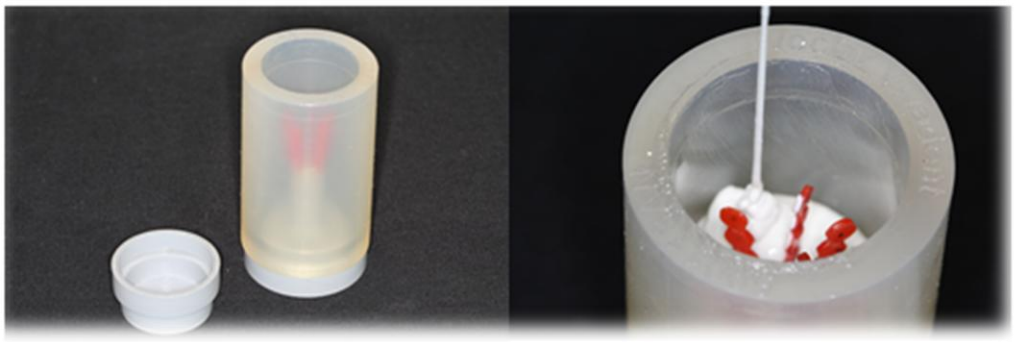


Figura 4: Material de revestimento sendo vertido no interior do anel de silicone.

Sobre o anel de silicone, um anel calibrador de inclusão (IPS Ring Gauge, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) foi inserido com movimentos giratórios (Figura 5).



Figura 5: Anel calibrador sendo inserido na superfície superior do anel de silicone.

Após a presa do material de revestimento, o calibrador e a base do anel foram removidos de modo cuidadoso, empurrando o anel de revestimento para fora do anel de silicone.

As irregularidades presentes na parte inferior do anel de revestimento foram removidas com uma faca de gesso. Esse anel de silicone, após a presa do revestimento foi inserido no forno pré-aquecido (EP 5000, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) a uma temperatura de 850ºC, com o intuito de volatizar a resina acrílica, durante 45 minutos.

As pastilhas de cerâmica de dissilicato de lítio (IPS e.max Alox Plunger, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) foram inseridas frias no interior da parte oca do anel de revestimento (Figura 6). Coloca-se então uma haste de êmbolo fria (IPS e.max Alox Plunger, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein), a qual realizou a injeção da cerâmica. Todo o conjunto foi levado ao forno para iniciar o ciclo de injeção, durante 60 minutos.

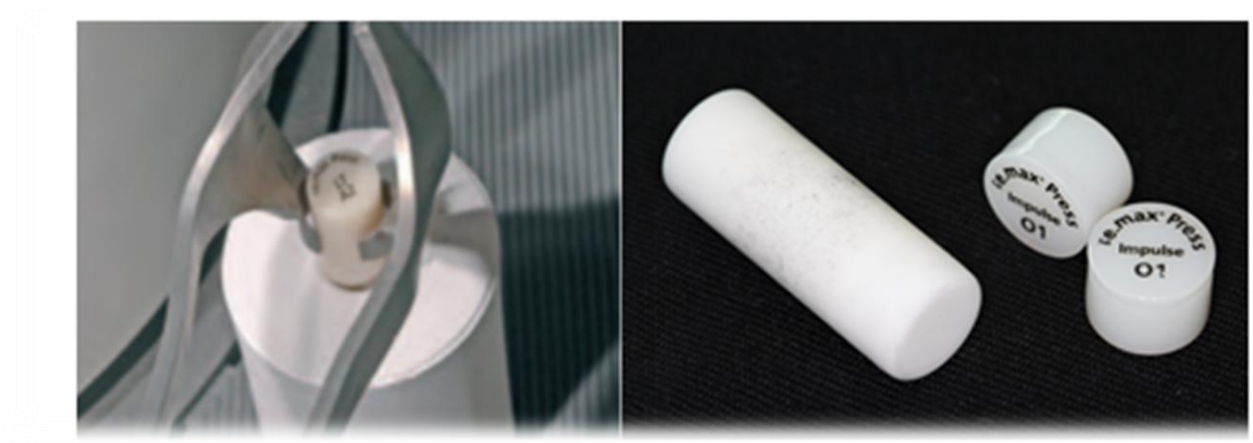


Figura 6: Pastilha cerâmica sendo inserida no anel de revestimento.

Após o resfriamento, a remoção final do material de revestimento é realizada com pérolas de vidro para polimento com 02 bar de pressão (trinta psi) (Figura 7).

.



Figura 7: Remoção do material de revestimento por meio do jateamento com pérolas de vidro.

Após a remoção do revestimento, os corpos-de-prova de cerâmica foram jateados cuidadosamente com óxido de alumínio (Al_2O_3) (Bio Art, São Carlos, São Paulo, Brasil), com 02 bar de pressão. Os *sprues* aderidos aos corpos-de-prova foram removidos com disco diamantado em baixa velocidade e leve pressão, para evitar superaquecimento.

As superfícies dos corpos-de-prova foram regularizados com lixas metalográficas de carbureto de silício de granulação 400 e 1200 (Buehler, Illinois, EUA) e, posteriormente polidas com tecido (Verdutex, Buehler, Illinois, EUA) e pano de polimento (G-Cloth, Buehler, Illinois, EUA) em politriz semiautomática, sob irrigação constante de água, na velocidade de 300 rpm.

Em seguida, realizou-se a queima de glazeamento (Figura 8), misturando uma pasta (IPS e.max Ceram Glaze Paste, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) com os líquidos (IPS e.max Ceram Glaze and Stain Liquids, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) até a consistência desejada. Aplicou-se o material de glazeamento de maneira uniforme e conduz-se a queima em bandeja alveolada de acordo com os parâmetros correspondentes e com o forno aquecido a uma temperatura de cerca de 400ºC.

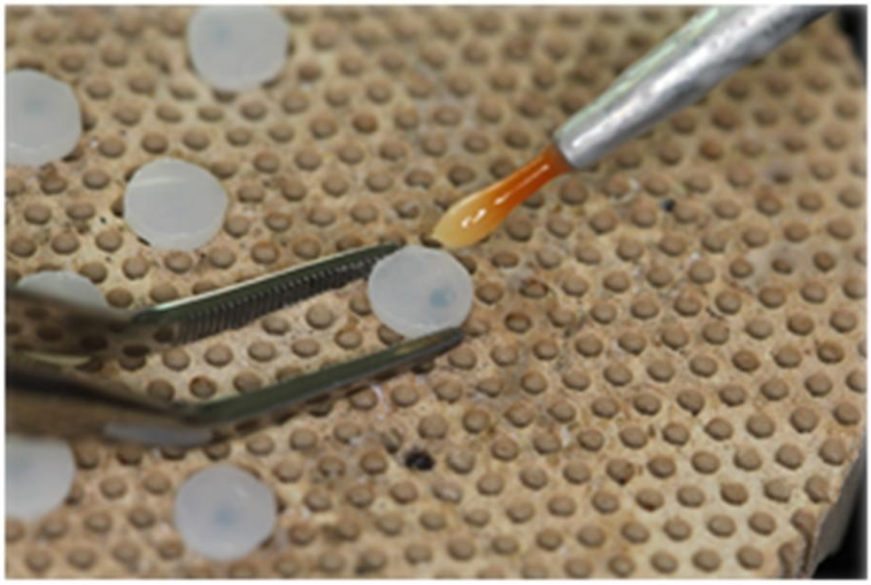


Figura 8: Glazeamento dos corpos-de-prova.

4.2 Soluções utilizadas e divisão dos grupos

As soluções que foram utilizadas no presente estudo, estão listadas no quadro 1.

Quadro 1: Soluções utilizadas no estudo.

Nome Comercial	Fabricante	Composição Química
Saliva Artificial	Farmácia de Manipulação Apothicário, Araçatuba, SP, Brasil.	Fosfato Potássio Dibásico, Fosfato Potássio Monobásico, Sorbitol 70%, Fluoreto de Sódio, Benzoato de Sódio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, Cloreto de Magnésio Anidro, Cloreto de Cálcio Anidro, Água purificada, Espessante QSP.
Coca-Cola	Coca-Cola, Cia de Bebidas Ipiranga, Indústria Brasileira de Bebida, Ribeirão Preto, SP, Brasil.	Água gaseificada, açúcar, extrato de noz de cola, corante amarelo IV, acidulante INS 338 e aroma natural.
Listerine Cool Mint (LI)	Johnson & Johnson Ind. Com. Prod. para Saúde Ltda, S. J. dos Campos, SP, Brasil.	Timol 0,064%, eucaliptol 0,092%, salicilato de metila 0,06% e mentol 0,042%. Excipiente: água, solução sorbitol, álcool 21,6%, poloxamer 407, ácido benzoico, essência de menta e hortelã, sacarina sódica, benzoato de sódio e corante verde #3.
Peróxido de Hidrogênio a 7,5% - White Class	FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil.	Peróxido de hidrogênio a 38%, Flúor a 1,1%, Nitrato de Potássio a 3%.
FluorGel	Dentsply Ceramco, Burlington, NJ, USA	Fluoreto Fosfato Acidulado a 1,23%
Fluoreto de Sódio a 0,2%	Farmácia de Manipulação Apothicário, Araçatuba, SP, Brasil	Fluoreto de Sódio a 0,2%

Para a realização deste estudo, foram confeccionados 54 corpos-de-prova cilíndricos (5 x 1 mm) em cerâmicas de dissilicato de lítio (IPS E.max Press HT,

Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein). Os corpos-de-prova foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (9 corpos-de-prova por grupo), de acordo com as soluções utilizadas, como mostra o esquema abaixo (Figura 9). Os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata (n=3) em três experimentos independentes, em dias distintos.

- G1: saliva artificial, constituindo o grupo controle.
- G2: Coca-cola
- G3: Listerine
- G4: Peróxido de hidrogênio 7,5%
- G5: Fluoreto fosfatado acidulado 1,23%
- G6: Fluoreto de sódio 0,2%

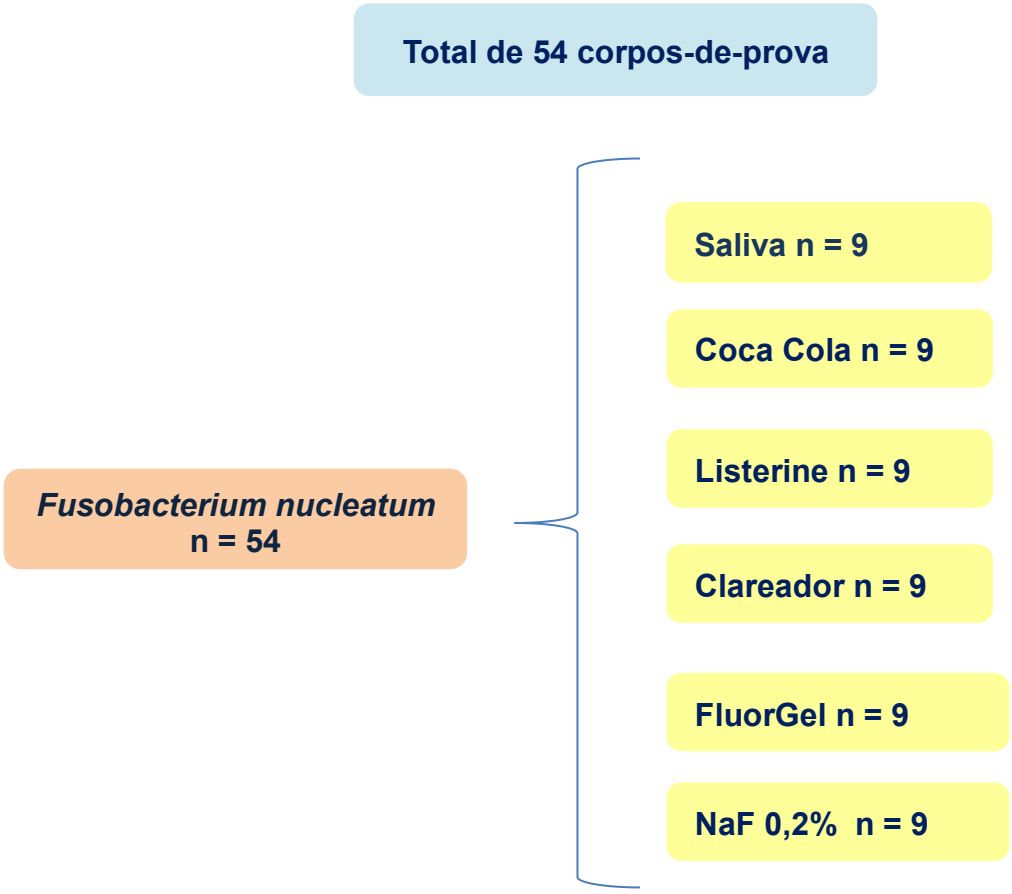


Figura 9: Esquema com a distribuição dos grupos de acordo com cada solução e os ensaios microbiológicos.

4.3 Processo de imersão dos corpos de prova

Os corpos de prova foram previamente imersos nas soluções propostas (Quadro 1). Nos grupos G1 e G2, os mesmos foram mantidos em saliva artificial e solução de refrigerante de cola, respectivamente. Para o segundo grupo, durante a imersão, os corpos-de-prova foram mantidos em estufa a 37±1°C por 2 horas/dia, durante 12 dias.[40]

Com relação aos corpos-de-prova do grupo G3, estes foram mantidos sob agitação contínua por meio de um agitador de soluções (CE-720/A, Cienlab Equipamentos Científicos Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil), durante 1 hora por 12 dias, simulando dois bochechos diários, com duração de um minuto cada. [41,42] Os corpos de prova do sexto grupo (G6) foram imersos por 36,5 horas, sendo que a troca da solução ocorreu de 12 em 12 horas para renovação da mesma.43

Quanto aos agentes clareadores, os corpos-de-prova do grupo G4 permaneceram armazenados em solução de peróxido de hidrogênio a 7,5%, em estufa a 37±1°C por 2 horas/dia, durante 14 dias.[44]

No grupo G5, os corpos-de-prova foram imersos em gel fluoreto fosfatado acidulado a 1,23% por 2 horas/dia, durante 12 dias.[14]

Para isso, cada corpo-de-prova foi colocado em um frasco de cor âmbar, preenchido com a solução específica, sendo posteriormente selado para prevenir evaporação das soluções, como mostra o esquema abaixo (Figura 10). As demais soluções foram manufaturadas pelos fabricantes. Os corpos-de-prova permaneceram imersos nas soluções propostas, sendo que, enquanto não estiverem nestas soluções, estarão armazenadas em saliva artificial.[43,45,46] As soluções foram substituídas diariamente, durante todo o período de armazenagem.



Figura 10: Esquema do processo de imersão dos corpos-de-prova em cerâmicas nas soluções correspondentes.

4.4 Leitura de rugosidade dos corpos de prova

A leitura de rugosidade de superfície foi determinada por meio de um perfilômetro (Dektak d-150; Veeco, Plainview, Nova York, EUA). Cada corpo-de-prova foi individualmente posicionado no centro do equipamento e a ponta medidora do perfilômetro na superfície do mesmo. Os valores de Ra (média aritmética da rugosidade de superfície), Rq (média quadrática da rugosidade de superfície), Rz (altura máxima do perfil de rugosidade) e Rt (altura total do perfil de rugosidade) foram mensurados usando *cut off* de 500 µm, no tempo constante de 12 segundos. Três leituras foram realizadas sobre cada superfície e a média foi calculada. Aleatoriamente foi realizada a leitura no centro do corpo-de-prova, e duas leituras paralelas, à direita e à esquerda desse centro. Os valores originais foram dados em Angström (Å), e a partir de então foram transformados para a escala micrométrica (µm).

4.5 Cultivo dos microrganismos

Foi utilizada a cepa *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953.

Os microrganismos foram cultivados em ágar BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo, suplementado com hemina (10µg/mL), menadiona (10µg/mL) e extrato de leveduras 0,5% para verificação da cultura pura. As placas foram inseridas em dessecadores de vidro do tipo Pyrex, e foi realizada a anaerobiose pela troca mecânica dos gases com bomba a vácuo, sendo que os gases iniciais (em especial oxigênio) foram removidos pela bomba a vácuo e foi introduzido nitrogênio. Essa ação de troca de gases inicial é denominada de lavagem, pois vai diluindo e removendo o oxigênio, assim, foram realizadas 3 lavagens e finalmente, após a última lavagem, introduziu-se uma mistura de gases

(90% N2 + 10% CO2) para incubação em condições de anaerobiose, a 37°C, por 72 horas. Após o período de incubação os microrganismos foram cultivados em caldo BHI em condições de anaerobiose (90% N2 + 10% CO2), a 37°C, por 48 horas, para padronização do inócuo a ser utilizado nos testes de adesão.

4.6 Adesão Bacteriana

Os corpos-de-prova foram esterilizados previamente ao teste de adesão bacteriana para que não ocorresse contaminação dos meios de cultura, sendo que este processo foi realizado com óxido de etileno, para que o processo de esterilização não danifique o *glaze* da cerâmica.

Após este procedimento, a bactéria foi inoculada em 5mL de caldo BHI com o corpo-de-prova de cerâmica durante 72 horas, para permitir a adesão do microrganismo ao corpo-de-prova.

Finalizado este período, o corpo-de-prova foi lavado, suavemente, três vezes com 5mL de solução fisiológica para eliminar as bactérias que não estiverem aderidas ao corpo-de-prova.

Após a lavagem, o corpo-de-prova foi inserido em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica, que foi levado ao agitador de tubos (Vórtex Biomixer QL – 901, Curitiba, PR, Brasil), agitação máxima por 1 minuto para promover o desprendimento das células aderidas.



Figura 11: Corpo-de-prova sendo lavado com solução fisiológica.



Figura 12: Corpo-de-prova inserido em um tubo de ensaio com 10ml de solução fisiológica e levado ao agitador de tubos.

Esses corpos-de-prova sofreram diluições seriadas e foram plaqueadas em ágar sangue suplementado com hemina, menadiona e extrato de levedura, em condições de anaerobiose, a 37ºC por 72 horas para avaliar a quantidade de células aderidas, por meio da contagem das unidades formadoras de colônias (Colony Counter “Digital S”, JP Selecta S.A., Abrera, Barcelona, Espanha).



Figura 13: Solução com o microrganismo sendo plaqueado em ágar sangue.

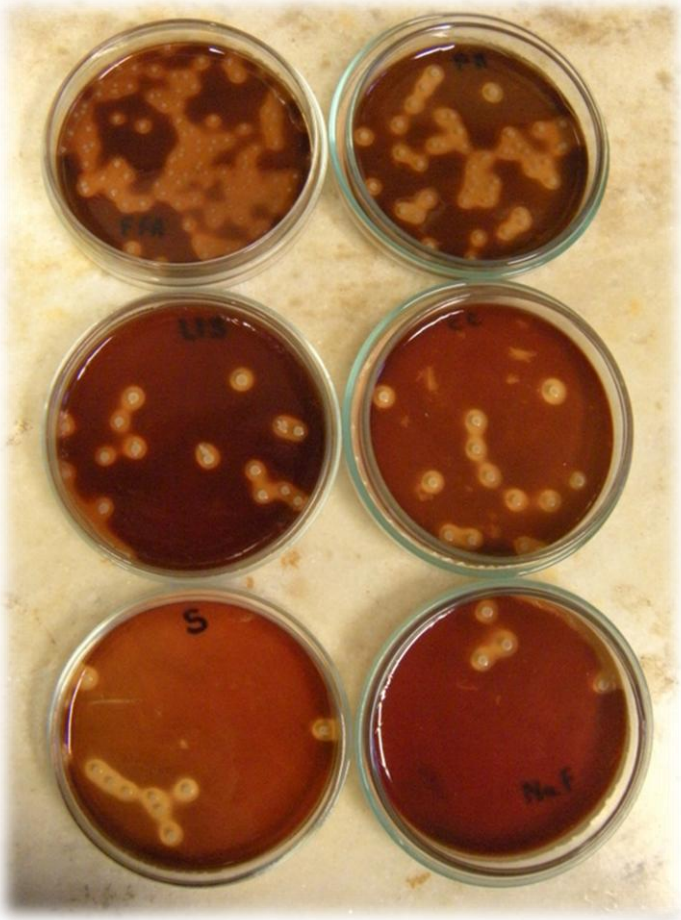


Figura 14: Colônias encontradas em suas respectivas placas.



Figura 15: Contagem das colônias.

5 RESULTADOS

Pode-se verificar, durante a análise dos valores de rugosidade superficial dos corpos-de-prova (Tabela 1), que ocorreu interação estatisticamente significativa entre os fatores Solução e Tempo ($p < 0,000$). Após o período de imersão nas soluções testadas pode-se observar aumento estatisticamente significativo para todas as soluções, com exceção da saliva (Grupo 1) (Tabela 2). Os corpos-de-prova imersos na solução de fluoreto fosfatado acidulado a 1,23% foram as que apresentaram os maiores valores de rugosidade superficial estatisticamente significativo (Tabela 2).

Maior adesão de cepas de *Fusobacterium nucleatum* foram observadas nos corpos-de-prova previamente imersos na solução de fluoreto fosfatado acidulado a 1,23%, sendo estatisticamente significativo em relação as demais soluções (Tabela 3).

Pode-se observar que existe correlação entre os valores médios de rugosidade (Rt) e os valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro nos corpos-de-prova onde foram realizados os testes de adesão de *Fusobacterium nucleatum* por 3 dias (Tabela 4).

Foi realizado o ensaio de adesão após 9 dias, mas não houve crescimento bacteriano.

Tabela 1. Análise de Variância (ANOVA) das médias de rugosidade Rt (µm) em relação aos testes de adesão de *Fusobacterium nucleatum.*

Fatores de Variação	**d*f***	**SS**	**MS**	**F**	***P***
Modelo Corrigido	11	2189,518	199,047	64,536	,000
Interceptação	1	10168,211	10168,211	3296,798	,000
Solução	5	440,090	88,018	28,538	,000
Tempo	1	1097,954	1097,954	355,985	,000
Solução*Tempo	5	651,475	130,295	42,245	,000
Erro	108	333,101	3,084		
Total	120	12690,832			
Total Corrigido	119	2522,619			

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de rugosidade (µm) Rt.

Grupos	**Rto**	**Rt1**
G1 (Saliva artificial)	6,500 (1,455) A, a	8,021 (1,204) A, a
G2 (Refrigerante de cola)	5,174 (1,013) A, a	11,011 (2,832) B, b
G3 (Colutório bucal)	7,558 (1,038) A, a	10,365 (1,621) B, b
G4 (Peróxido de hidrogênio 7,5%)	5,331 (1,825) A, a	11,460 (2,280) B, b
G5 (Fluoreto fosfatado acidulado 1,23%)	5,322 (1,270) A, a	21, 154 (2,531) C, b
G6 (Fluoreto de sódio 0,2%)	7,197 (0,781) A, a	11,369 (1,876) B, b

Tabela 3. Valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de *Fusobacterium nucleatum*.

Grupos	Períodos	UFC/mL
G1 (Saliva artificial)	3 dias	1050 A
	6 dias	150 A
G2 (Refrigerante de cola)	3 dias	1350 A
	6 dias	50 A
G3 (Colutório bucal)	3 dias	1200 A
	6 dias	1050 A
G4 (Peróxido de hidrogênio 7,5%)	3 dias	430 A
	6 dias	65 A
G5 (Fluoreto fosfatado acidulado 1,23%)	3 dias	11350 B
	6 dias	50 A
G6 (Fluoreto de sódio 0,2%)	3 dias	250 A
	6 dias	50 A

Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p<0.05$).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre os valores médios de rugosidade Rt e os valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) nos corpos-de-prova onde foram realizados os testes de adesão de *Fusobacterium Nucleatum* por 3 dias e 6 dias.

Correlação de Pearson	Adesão por 3 dias	Adesão por 6 dias
Rugosidade	0,354*	-,064

* Indica correlação entre os fatores.

6 DISCUSSÃO

A hipótese testada pelos autores de que todas as soluções promoveriam alterações nas propriedades superficiais da cerâmica de dissilicato de lítio foi aceita, visto que os valores de rugosidade superficial foram afetados significativamente, após as imersões, favorecendo assim a adesão de microrganismos gram-negativos anaeróbios.

O presente estudo mostrou que a superfície da cerâmica testada não se manteve quimicamente inerte frente à imersão nas soluções propostas, pois todos os valores de rugosidade superficial aumentaram, sendo os valores do grupo de fluoreto fosfatado acidulado 1,23%, estatisticamente diferentes em relação aos demais. Esse fato pode ser atribuído à dissolução de parte da fase vítrea da cerâmica, composta basicamente por dióxido de silício. Sabe-se que o fluoreto de sódio em contato com a superfície do corpo-de-prova dissocia-se em sódio (Na+) e flúor (F-). [48] A presença de íons sódio enfraquece as ligações de Si-O-Si que, apesar de serem ligações fortes (covalentes e unidirecionais), [49] tornam-se mais susceptíveis a quebra pelos íons flúor (F) presentes na composição da solução, resultando na formação de moléculas de tetrafluorsilano (SiF4).[48] Além disso, a dissolução da fase vítrea pode ter sido acentuada pela presença dos íons OH-, H30+ e moléculas de H2O os quais também quebram as ligações de Si-O-Si, conduzindo a uma dissolução generalizada.[50, 51, 52, 53] Além disso, o gel de fluoreto fosfatado acidulado 1,23% contém em sua composição 2% de fluoreto de sódio, aliado a 0,34% de ácido hidrofluorídrico e 0,98% de ácido fosfórico, o que confere ao gel pH de 3,6 a 3,9.[4] Esses ácidos foram capazes de produzir maior grau de degradação quando comparado aos demais grupos, dentre eles o de Fluoreto de sódio 0,2%.

Clinicamente, o aumento da rugosidade superficial pode trazer consequências indesejáveis para o tratamento, tais como desgaste ao dente ou à restauração antagonista devido ao maior atrito que ocorre entre os mesmos com material cerâmico.[10] Além disso, a literatura relata que quanto mais rugosa a superfície, mais propícia será a formação de biofilme, a qual pode provocar inflamações gengivais e cáries secundárias. Esse fato foi constato no presente estudo, no qual pode-se

observar correlação entre os valores médios de rugosidade (Rt) e os valores médios de unidades formadoras de colônia por mililitro; e maior adesão de cepas de *Fusobacterium nucleatum* nos corpos-de-prova previamente imersos na solução de fluoreto fosfatado acidulado a 1,23%, sendo estatisticamente significativo em relação as demais soluções.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

1- De modo geral, as soluções propostas afetaram a topografia de superfície da cerâmica de dissilicato de lítio testada, aumentando os valores de rugosidade superficial da mesma.

2- A solução de fluoreto fosfatado acidulado 1,23% produziu os maiores graus de degradação superficial dos corpos-de-prova, deixando a superfície das mesmas susceptíveis a adesão de cepas de *Fusobacterium nucleatum.*

REFERÊNCIAS

1. Barão VAR, Gennari-Filho H, Goiato MC, Dos Santos DM, Pesqueira AA. Factors to Achieve Aesthetics in All-Ceramic Restorations. *J Craniofac Surg*2010;7:2007-12.

2. Henriques ACG, Patrícia D, Da Costa TS, Barros KMA, Beatrice LCS, Filho PFM. Cerâmicas Odontológicas: aspectos atuais, propriedades e indicações.*Odontologia Clín-Científ* 2008;7: 289-94.

3. Samra APB, Pereira SK, Delgado LC, Borges CP. Color stability evaluation of aesthetic restorative materials. *Braz Oral Res* 2008; 22:205-10.

4. Edelhoff D., Brix O. All-ceramic restorations in different indications: a case series. J Am Dent Assoc. 2011 Apr;142 Suppl 2:14S-9S.

5. Ritter R.G., Multifunctional Uses of a Novel Ceramic-Lithium Disilicate. J Esthet Restor Dent. 2010 Oct;22(5):332-41.

6. Kina Sidney, Bruguera August. Invisível - restaurações estéticas cerâmicas. Dental Press, 2008.

7. Bottino Marco Antonio, Faria Renata, Valandro Luis Felipe. Percepção - Estética em próteses livres de metal em dentes naturais e implantes. Artes Médicas, 2009

8. Della Bona A, Anusavice KJ. Microstructer, composition and etching topography of dental ceramics. Int J Prosthodontic 2002;15:159-248.

9. Al-Zain A. No-preparation porcelain veneers. 2009. 24f. Dissertation. School of Dentistry, Indiana University, Iupui, 2009. Disponível em: http://www.iusd.iupui.edu/Depts/GO/Dental_Information.aspx. Acessado em: 16 de setembro de 2010.

10. Friedman MJ. Porcelain veneer restorations: a clinician's opinion about a disturbing trend. J Esthet Restor Dent. 2001;13(5):318-27.

11. Junpoom P, Kukiattrakoon B, Hengtrakool C. Flexural strength of fluorapatite-leucite and fluorapatite porcelains exposed to erosive agents in cyclic immersion. J Appl Oral Sci 2011;19:95-9.

12. Zogheib LV, Della Bona A, Kimpara ET, Mccabe JF. Effect of hydrofluoric acid etching duration on the roughness and flexural strength of a lithium disilicate-based glass ceramic. Braz Dent J 2011;22:45-50.

13. Kukiattrakoon B, Junpoom P, Hengtrakool C. Vicker's microhardness and energy dispersive x-ray analysis of fluorapatite-leucite and fluoride ceramics cyclically immersed in acid agents. *J Oral Sci* 2009;51:443-50.

14. Della Bona Alvaro. Adesão às cerâmicas: evidências científicas para o uso clínico. São Paulo: Artes Médicas; 2009.

15. Meng XF, Yoshida K, Gu N. Chemical adhesion rather than mechanical retention enhances resin bond durability of a dental glass-ceramic with leucite crystallites. Biomed Mater 2010;5:04410.

16. Ccahuana VZ, Ozcan M, Mesquita AM, Nishioka RS, Kimpara ET, Bottino MA, Surface degradation of glass ceramics after exposure to acidulated phosphate fluoride . J Appl Oral Sci 2010;18:155-65.

17. Zortuk M, Kilic K, Gurbulak AG, Kesim B, Uctasli S. Tensile bond strength of a lithium-disilicate pressed glass ceramic to dentin of different surface treatments. Dent Mater J 2010;29:418-24.

18. Anusavice KJ, Kakar K, Ferre N. Which mechanical and physical testing methods are relevant for predicting the clinical performance of ceramic-based dental prostheses? Clin Oral Implants Res. 2007 Jun;18 Suppl 3:218-31.

19. Kukiattrakoon B, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U. Degradability of fluorapatite-leucite ceramics in naturally acidic agents. Dent Mater J 2010;29:502-11.

20. El-Murr J, Ruel D, St-Georges AJ. Effects of external bleaching on restorative materials: a review. J Can Dent Assoc. 2011;77:b59.

21. Zaki AA, Fahmy NZ. The effect of a bleaching system on properties related to different ceramic surface textures. J Prosthodont. 2009;18(3):223-9. Epub 2008 Feb 2.

22. Polydorou O, Mönting JS, Hellwig E, M. Auschill TM. Effect of in-office tooth bleaching on the microhardness of six dental esthetic restorative materials. Dent Mater. 2007;23(2):153-8. Epub 2006 Feb 10.

23. Polydorou O, Hellwig E, Auschill TM. The effect of athome bleaching on the microhardness of six esthetic restorative materials. J Am Dent Assoc. 2007;138(7):978-84.

24. Colucci V, dos Santos CD, do Amaral FL, Corona SA, Catirse AB. Influence od NaHCO3 powder on translucency of microfilled composite resin immersed in different mouthrinses. J Esthet Restor Dent. 2009 Aug; 21(4):242-50.

25. Gürgan S, Onen A, Köprülü H. *In vitro* effects of alcohol-containing and alcohol-free mouthrinses on microhardness of some restorative materials. J Oral ehabil. 1997 Mar;24(3):244-6.

26. Knoernschild KL, Campbell SD. Periodontal tissue responses after insertion of artificial crowns and fixed partial dentures. J Prosthet Dent. 2000 Nov;84(5):492-8.

27. Shenoy A, Shenoy N, Babannavar R. Periodontal considerations determining the design and location of margins in restorative dentistry. Journal of Interdisciplinary Dentistry / Jan-Apr 2012 / Vol-2 / Issue-1.

28. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion *in vitro.* Dent Mater. 2009 Aug;25(8):969-75. Epub 2009 Mar 10.

29. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. J Periodont Res 2011; 46: 252-260.

30. Merrit J, Niu G, Okinaga T, Qi F. Autoaggregation Response of Fusobacterium nucleatum. Appl Environ Microbiol. 2009 Dec;75(24):7725-33. Epub 2009 Oct 16.

31. Moore, W. E., and L. V. Moore. 1994. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 5:66–77.

32. Papapanou, P. N., A. Sellen, J. L. Wennstrom, and G. Dahlen. 1993. An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. Oral Microbiol. Immunol. 8:24–29.

33. Dzink, J. L., S. S. Socransky, and A. D. Haffajee. 1988. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J. Clin. Periodontol. 15:316–323.

34. Socransky, S. S., A. D. Haffajee, and J. L. Dzink. 1988. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J. Clin. Periodontol. 15:440–444.

35. Tanner, A., and H. Bouldin. 1989. The microbiota of early periodontitis lesions in adults. J. Clin. Periodontol. 16:467–471.

36. Kolenbrander, P. E., N. Ganeshkumar, F. J. Cassels, and C. V. Hughes. 1993. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. FASEB J. 7:406–413.

37. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol Lett. 2012 Aug;333(1):1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x. Epub 2012 May 28.

38. Yang HW, Huang YF & Chou MY (2004) Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. J Periodontol 75: 1077–1083.

39. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA & van der Velden U (2002) Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal

pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 29: 1023–1028.

40. Guler AU, Yilmaz F, Kulunk T, Guler E, Kurt S. Effects of different drinks on stainability of resin composite provisional restorative materials. J Prosthet Dent 2005; 94(2): 118-124.

41. Celik C, Yuzugullu B, Erkut S, Yamanel K. Effects of mouth rinses on color stability of resin composites. Eur J Dent 2008; 2: 247-253.

42. Cal E, Güneri P, Kose T. Digital analysis of mouthrinses' staining characteristics on provisional acrylic resins. J Oral Rehab 2007; 34(4):297–303.

43. Correa CB, Pires JR, Fernandes-Filho RB, Sartori R, Vaz LG. Fatigue and fluoride corrosion on Streptococcus mutans adherence to titanium-based implant/component surfaces. J Prosthodont 2009;18(5):382-7.

44. Barbosa CM, Sasaki RT, Flório FM, Basting RT. Influence of in situ postbleaching times on resin composite shear bond strength to enamel and dentin. Am J Dent 2009; 22(6):387-392.

45. Fontes ST, Fernández MR, Moura CM, Meireles SS. Color stability of a nanofill composite: effect of different immersion media. J Appl Oral Sci 2009;17(5):388-391.

46. Micali B, Basting RT. Effectiveness of composite resin polymerization using light-emitting diodes (LEDs) or halogen-based light-curing units. Braz Oral Res 2004; 18(3):266-270.

47. Anusavice KJ, SHEN C, RAWLS HR. Phillips materiais dentários. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.p. 463.

48. Fais LM, Fernandes-Filho RB, Pereira da Silva MA, Vaz LG, Adabo GL. Titanium surfasse topography after brushing with fluoride and fluoride free toothpaste simulating 10 years of use. J Dent. 2012, 40:265-75.

49. Della Bona A. Bonding to Ceramics: scientific evidences for clinical dentistry. São Paulo: Artes Médicas; 2009. p.91-132.

50. Esquivel-Upshaw JF, Dieng FY, Clark AE, Neal D, Anusavice KJ. Surface degradation of dental ceramics as a function of environmental pH. J Dent Res. 2013; 92:467-71.

51. Kukiattrakoon B, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U. The effect of acidic agents on surface ion leaching and surface characteristics of dental porcelains. J Prosthet Dent. 2010; 103:148-62.

52. Swain MV. Impact of oral fluids on dental ceramics: What is the clinical relevance? Dent Mater. 2014; 30:33-42.

53. White WB. Theory of corrosion of glass and ceramics. In: Clarke DE, Zoitos BK, editors. Corrosion of glass ceramics and superconductors. Park Ridge, NJ: Noyes; 1992. p. 2-28.