



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

LISSETH PATRICIA CLAUDIO CONTRERAS

**CERÂMICAS FELDSPÁTICAS ESTRATIFICADAS E EM
BLOCOS PARA SISTEMA CAD/CAM: avaliação da
topografia superficial, formação de biofilme inicial e
viabilidade celular**

2017

LISSETH PATRICIA CLAUDIO CONTRERAS

**CERÂMICAS FELDSPÁTICAS ESTRATIFICADAS E EM BLOCOS
PARA SISTEMA CAD/CAM: avaliação da topografia superficial,
formação de biofilme inicial e viabilidade celular**

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

Orientador: Prof. Tit. Marco Antonio Bottino
Coorientadora: Profa. Dra. Lilian Costa Anami

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Contreras, Lisseth Patricia Claudio

Cerâmicas feldspáticas estratificadas e em blocos para sistema CAD/CAM: avaliação da topografia superficial, formação de biofilme inicial e viabilidade celular / Lisseth Patricia Claudio Contreras. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Marco Antonio Bottino

Coorientadora: Lilian Costa Anami

1. Propriedades de Superfície . 2. Técnicas de Cultura de Células . 3. Porcelana Dental . 4. Streptococcus mutans. 5. Candida albicans . I. Bottino, Marco Antonio, orient. II. Costa Anami, Lilian , coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Marco Antonio Bottino (Orientador)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Laís Regiane da Silva Concilio

Universidade de Taubaté - UNITAU

Faculdade de Odontologia

Campus de Taubaté

Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de janeiro de 2017.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS por estar presente todos os dias, proteger-me durante este caminho e dar-me forças para superar cada obstáculo e dificuldade ao longo de minha vida.

Aos meus pais, José Elias Claudio Arroyo e Paulina Nancy Contreras Palomino por serem minha inspiração, obrigada por todo o incentivo, amor e confiança que me dão.

Aos meus avôs Mamita Leonor, papito Honorato, Goyita e Martin pelo amor e exemplo de vida.

Às minhas irmãs Yamilka, yamileth, Juliana e Danili, as levo sempre no meu coração.

Às minhas tias, Ines, Carmen, Marisol, Sonia, Ruth, Liz, Carmen, Maria e Consuelo por serem parte da minha vida.

À minha tia Rosa, que foi uma segunda mãe que a vida me deu. Obrigada pelos cuidados, conselhos e amor.

À toda minha família, que me demonstra amor à distância, me deram princípios, valores e coragem para seguir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Tit. Marco Antonio Bottino, pela confiança e oportunidade que me concedeu.

À Profa. Dra. Lilian Costa Anami, por estar presente e total colaboração para solucionar as dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo deste trabalho. Obrigada pelo carinho e paciência.

Ao Tit. Prof. Antonio Olavo Cardoso Jorge pela colaboração no laboratório de microbiologia.

À Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo, pela disponibilidade e apoio nos testes no laboratório de patologia.

À minha colega de mestrado, Amanda Dal Piva pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Prof. João Paulo Barros pela ajuda no laboratório do INPE.

Ao Professores e funcionários de departamento de Materiais Odontologia e Prótese.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação que estiveram ao meu lado, pelo seu apoio e ajuda na superação dos obstáculos ao longo desta fase.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos.” Provérbios 16:9

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Cerâmicas feldspáticas e técnicas de confecção	16
2.1.1 Técnica de estratificação.....	16
2.1.2 Técnica de confecção por desenho assistido por computador (CAD) e fabricação assistida por computador (CAM)	18
2.2 Caracterização da superfície	19
2.3 Formação de biofilme nas cerâmicas.....	22
2.4 Viabilidade celular das cerâmicas feldspáticas	25
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Delineamento experimental.....	31
4.1.1 Unidades experimentais.....	31
4.1.2 Fatores em estudo.....	31
4.2 Confecção dos corpos-de-prova	33
4.2.1 Cerâmica para CAD CAM.....	34
4.2.2 Cerâmica estratificada.....	34
4.2.3 Aplicação do glaze (subgrupo “g”).....	36
4.2.4 Polimento das amostras (subgrupo “p”).....	36
4.3 Caracterizações da superfície dos materiais.....	37
4.3.1 Análise da rugosidade superficial.....	37
4.3.2 Análise da energia livre de superfície (ELS)	38
4.4 Formação de biofilme.....	39

4.4.1 Esterilização e contaminação dos espécimes	39
4.4.2 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)	41
4.5 Avaliação da viabilidade celular (teste MTT)	42
4.6 Análises qualitativas.....	44
4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.6.2 Perfilometria óptica.....	45
4.7 Análise dos resultados.....	45
5 RESULTADOS.....	47
5.1 Rugosidade superficial.....	47
5.2 Energia livre de superfície.....	48
5.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)	50
5.4 Teste MTT.....	52
5.5 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	54
5.6 Perfilometria óptica.....	58
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD/CAM	Desenho assistido por computador/Manufatura assistida por computador
FMM-1	Células fibroblásticas gengivais humanas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Teste de viabilidade celular
Ra	Rugosidade média aritmética
RSm	Largura média dos elementos do perfil de rugosidade
Rz	Rugosidade total
UFC	Unidades formadoras de colônias
VM9	Cerâmica feldspática estratificada
VMII	Cerâmica feldspática para o sistema CAD/CAM

Contreras LPC. Cerâmicas feldspáticas estratificadas e em blocos para sistema CAD/CAM: avaliação da topografia superficial, formação de biofilme e viabilidade celular [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a topografia e a formação de biofilme na superfície de cerâmicas feldspáticas obtidas através de duas técnicas de confecção e dois tratamentos de superfície, assim como avaliar a viabilidade do crescimento de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) sobre estes materiais. Foram confeccionados 52 blocos de cada tipo de cerâmica feldspática: VM9 obtida através da técnica da estratificação e cerâmica Vita Blocs Mark II (VMII) para o sistema CAD/CAM (ambas, Vita Zahnfabrik). As superfícies dos blocos foram padronizadas em politriz nas dimensões de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm e os blocos foram divididos em dois tratamentos de finalização de superfície: polimento com borrachas Ceramisté + pasta de polimento e aplicação de *glaze spray* + sinterização. Os parâmetros de rugosidade Ra e Rsm foram mensurados através de um rugosímetro de contato. As amostras foram esterilizadas e, em seguida contaminadas (n=10) para formação de biofilme heterotípico inicial de *S. mutans*, *S. sanguinis* e *C. albicans*, cuja aderência foi quantificada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). O teste MTT foi empregado para avaliação da viabilidade celular dos materiais ao crescimento de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) em 24 h e 7 dias (n=12). Foram realizadas análises qualitativas da superfície dos espécimes através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e perfilometria óptica 3D. A energia livre de superfície (ELS) foi calculada a partir de análises de goniometria com líquidos polar e apolar em 10 amostras de 15 x 15 x 1,5 mm. Os resultados de Ra, RSm e ELS foram submetidos à análise de variância ANOVA 2 fatores (material x tratamento de superfície) seguido por teste de Tukey (ambos, $\alpha=95\%$), e os dados de UFC 3 fatores (material x tratamento x micro-organismos) e MTT (material x tratamento x tempo) foram avaliados por ANOVA 3 fatores e teste Tukey ($\alpha=95\%$). As imagens de MEV e perfilometria foram descritas. As cerâmicas polidas apresentaram menor rugosidade (Ra p=0,015; RSm p=0,049) e maior ELS (p=0,00), sendo que a mais alta Ra foi verificada para VM9 glazeada. A aderência bacteriana foi influenciada pela interação de todos os fatores (p=0,018). Os *Streptococcus* formaram em maior número em todos os materiais, mas sobre VMII polida não houve aderência de *C. albicans*. Inicialmente, os materiais apresentaram ausência de citotoxicidade, mas a viabilidade celular de todos os grupos foi reduzida após 7 dias (p=0,00). As micrografias mostram que a

aderência de micro-organismos ocorreu independente de irregularidades na topografia dos materiais, e as imagens de perfilometria ressaltaram o padrão de ranhuras das amostras polidas e o acúmulo de *glaze* em “ilhas” nas amostras glazeadas. Foi possível concluir que ambas técnicas de obtenção resultam em cerâmicas feldspáticas biocompatíveis e que a finalização da superfície por polimento resultou em menor rugosidade média, maior ELS e menor aderência de *C. albicans*.

Palavras-chave: Propriedades de Superfície. Técnicas de Cultura de Células. Porcelana Dental. *Streptococcus mutans*. *Candida albicans*.

Contreras LPC. Ceramic feldspathic for stratification technique and blocks for system CAD /CAM: evaluation of surface topography, biofilm formation and cell viability [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the topography and surface biofilm formation of feldspathic ceramics obtained through two techniques of preparation and two surface treatments, as well as to evaluate the viability of human gingival fibroblasts (FMM-1) growth on these materials. A total of 52 blocks of each type of feldspathic ceramic were made: VM9 obtained by the stratification technique and Vita Blocs Mark II (VMII) for the CAD/CAM system (both, Vita Zahnfabrik). The blocks' surfaces were standardized in a polishing machine to the dimensions of 4.5 x 4.5 x 1.5 mm and blocks were divided into two surface finishing treatments: polishing with Ceramisté rubbers + polishing with paste; and glaze application + sintering. The Ra and RSm roughness parameters were measured through a contact rugosimeter. Samples were sterilized and then contaminated (n = 10) for initial heterotypic biofilm formation of *S. mutans*, *S. sanguinis* and *C. albicans*, whose adherence was quantified by counting colony forming units (CFU/mL). The MTT test was used to evaluate the cellular viability of the materials to the growth of human gingival fibroblasts (FMM-1) in 24 h and 7 days (n=12). Qualitative analyzes of the specimens' surface were performed using a scanning electron microscopy (SEM) and 3D optical profilometry. Surface free energy (SFE) was calculated from goniometry analyzes of polar and apolar liquids in 10 samples of 15 x 15 x 1.5 mm. The results of Ra, RSm and ELS were subjected to 2-way ANOVA (Material x surface treatment) followed by Tukey's test (both, $\alpha=95\%$), and UFC (material x surface treatment x microorganisms) and MTT (material x surfacetreatment x time) data were evaluated by 3-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha=95\%$). SEM and profilometry images were described. The polished ceramics presented lower roughness (Ra p=0.015; RSm p=0.049) and higher SFE (p=0.00), with the highest Ra being verified for glazed VM9. Bacterial adherence was influenced by the interaction of all factors (p=0.018). Streptococcus formed in greater number in all materials, but on polished VMII there was no adherence of *C. albicans*. Initially, the materials showed no cytotoxicity, but the cell viability of all groups was reduced after 7 days (p=0.00). Micrographs showed that microorganisms adherence occurred regardless of irregularities in the topography of the materials, and the profilometry images emphasized the grooved pattern of the polished samples and the glaze accumulation in "islands" in glazed samples. The surface treatments had

greater influence than the technique of making the feldspathic ceramics. It could be concluded that both obtaining techniques resulted in biocompatible feldspathic ceramics and that the surface finishing by polishing resulted in lower mean roughness, higher SFE and lower C. albicans adhesion.

Keywords: Surface Properties. Cell Culture Techniques. Dental Porcelain. Streptococcus mutans. Candida albicans .

1 INTRODUÇÃO

A partir de avanços tecnológicos foi introduzida na odontologia uma ampla variedade de materiais que possuem capacidade de mimetizar os tecidos dentários. A melhoria nas propriedades mecânicas destes materiais possibilitou o uso de restaurações livres de metal, que são cada vez mais preferidas pelos profissionais e pacientes.

A cerâmica feldspática é definida como um vidro composto por feldspato de potássio ($K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 6SiO_2$) e pequenas adições de quartzo (SiO_2), sendo que em altas temperaturas, o feldspato decompõe-se numa fase vítrea com estrutura amorfa e numa fase cristalina constituída de leucita ($KAlSi_2O_6$ ou $K_2O \cdot Al_2O_3 \cdot 4SiO_2$) (Sakaguchi, Powers, 2012).

Esta cerâmica pode ser utilizada para confecção de restaurações parciais ou totais, e para o recobrimento de estruturas metálicas ou outras cerâmicas. As cerâmicas feldspáticas podem ser confeccionadas por diversas técnicas. Sendo a técnica da estratificação convencional, a mais comum. Esta técnica permite a caracterização artesanal e, consiste na mistura de pó e líquido da cerâmica feldspática, que será aplicada em camadas e sinterizada (Valandro, Bottino, 2009).

Outra técnica de confecção é a fresagem que utiliza tecnologia CAD/CAM (*Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing*) na qual as restaurações são obtidas a partir da fresagem dos blocos cerâmicos (Valandro, Bottino, 2009). Apesar destas diferentes técnicas de confecção da cerâmica feldspática utilizar materiais de composição similar, o produto final pode apresentar propriedades diferentes, como a porosidade que tem influência na tenacidade e resistência (Nakamura et al., 2007).

As cerâmicas de cobertura estão em contato íntimo com o tecido

periodontal, tanto nos preparos intra-sulculares, como nas próteses sobre implantes. Para o sucesso em longo prazo do tratamento reabilitador é essencial conhecer o comportamento dos materiais restauradores com relação à microbiologia do meio bucal, além dos fatores específicos de cada paciente, como as características da saliva, higiene bucal e doenças sistêmicas. O acúmulo de biofilme favorece o desenvolvimento de doenças periodontais, como a periodontite e a peri-implantite (Rashid, 2014).

Estudos sobre as propriedades físicas e químicas dos materiais restauradores, demonstraram que a rugosidade da superfície também tem influência na quantidade de micro-organismos que compõem o biofilme dental (Teughels et al., 2006; Burgers et al., 2010; Anami et al., 2012).

A rugosidade e a energia livre de superfície possuem papéis importantes na aderência bacteriana (Bollen et al., 1997; Quirynen et al., 2002; Kantorski et al., 2008; Anami et al., 2012) e na consequente formação precoce do biofilme (Hannig, Hannig, 2009; Subramani et al, 2009).

A comunidade bacteriana no meio bucal é bastante ampla. *Streptococcus mutans* são muito comuns, considerados o principal agente etiológico da cárie de superfície lisa (Shen et al., 2004). Outras espécies, como *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* e *S. gordonii* aderem-se ao substrato e também são capazes de produzir polissacarídeos (Wessel et al., 2014).

Estudos *in vitro* revelaram a interação de *S. mutans* e *Candida albicans* na presença da sacarose, demonstrando uma relação de mutualismo. Esta relação favorece a formação do biofilme heterotípico (Pereira et al., 2011).

A biocompatibilidade das cerâmicas não é questionada pelos dentistas visto que estes materiais se encontram a longo tempo no mercado. Porém, cabe ressaltar que as instituições responsáveis por supervisionar os padrões de qualidade (American National Standard Institute - ANSI, American Dental Association - ADA, e International Standards Organization - ISO) não realizam

todos os testes biológicos e o fabricante é responsável pela apresentação de um caso convincente para a aprovação (Elshahawy et al., 2009). Logo, faz-se importante a realização de testes de citotoxicidade nos materiais dentários existentes.

Os testes de citotoxicidade in vitro utilizam diversos modelos celulares (como células não humanas imortalizadas) para materiais dentários. Porém, os mecanismos de sobrevivência estão alterados geneticamente neste tipo de células, podendo mascarar os resultados de citotoxicidade (Freshney, 2011).

Na literatura atual existe pouca informação sobre como as técnicas de confecção de cerâmicas podem influenciar na rugosidade superficial das cerâmicas e sobre como estas técnicas são capazes de atuar na aderência bacteriana e na viabilidade celular. Este estudo visa avaliar a formação do biofilme e a viabilidade de células fibroblásticas gengivais humanas (FMM-1) sobre a superfície das cerâmicas feldspáticas confeccionadas por duas técnicas diferentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar o entendimento dos estudos relatados a seguir, a revisão da literatura foi dividida em quatro partes: cerâmicas e técnicas de confecção, caracterização da superfície, formação de biofilme e viabilidade celular.

2.1 Cerâmicas feldspáticas e técnicas de confecção

2.1.1 Técnica de estratificação

As cerâmicas feldspáticas possuem composição bastante similar, porém, pequenas modificações são realizadas de acordo com a indicação da cerâmica. A incorporação de leucita, por exemplo, aumenta o coeficiente de expansão térmica nas cerâmicas utilizadas para recobrimento de metais (Tsetsekou et al., 2002; Cesar et al., 2005). Já nas cerâmicas de ultra baixa e baixa fusão podem ser encontradas frações reduzidas de Al_2O_3 e maiores concentrações de CaO , K_2O , Li_2O e Na_2O (Anusavice, 2013).

A cerâmica Vita VM9 (Vita, 2014a) é uma cerâmica feldspática de granulação ultra fina ($4\text{ }\mu\text{m}$), desenvolvida para o recobrimento de estruturas de dióxido de zircônio (ZrO_2) e individualizações de cerâmicas como a Vita Block Mark II ou sobre a própria VM9 (Vita, 2014a). Esta cerâmica é composta por 4% de K_2O ; 0,4% de MgO ; 73% de SiO_2 ; 8% de Al_2O_3 ; 1,5% de CaO ; 5,5 % de Na_2 ; 7,5 % de B_2O_3 (Sinthuprasirt et al., 2015).

No caso do recobrimento de infra-estrutura à base de zircônia, as cerâmicas feldspáticas melhoram a qualidade estética da prótese, oferecendo

propriedades como a translucidez e resistência à corrosão (Barizon et al., 2014). Também apresentam aceitável durabilidade e resistência, porém podem produzir falhas como lascamento e fraturas prematuras em casos de pacientes com para funções, como o bruxismo (Rueda et al., 2015).

A técnica de estratificação é a técnica mais utilizada nos laboratórios para aplicação de cerâmicas de cobertura. O pó da cerâmica é a mistura dos componentes cerâmicos que foram fusionados em altas temperaturas, seguido de um rápido resfriamento. As tensões produzidas pelo resfriamento facilitam a moagem da massa para produzir partículas bastante reduzidas, de 2 a 75 μm (Lean, 1983). As partículas do pó têm distribuição e tamanho específico para produzir uma porcelana com maior densidade possível (Anusavice, 2013).

O pó da cerâmica deve ser mesclado com o líquido modelador cuidadosamente, evitando-se o excesso de líquido (Sinmazisik, Ovecoglu, 2006). Existem vários métodos para atingir a compactação das partículas, como as técnicas do pincel, espátula ou vibração que faz com que o excesso de água atinja a superfície para ser removida. A compactação produz uma massa de partículas densas com objetivo de que ocorra menor contração durante a queima e reduzida formação de porosidades (Anusavice, 2013).

A massa de cerâmica condensada pode ser aplicada sobre matriz refratária antes da sinterização. O pré-aquecimento dessa massa evita a rápida formação de vapor de água e consequente formação de porosidades nas cerâmicas. Na sinterização ocorrem reações termoquímicas entre os componentes do pó da cerâmica (Anusavice, 2013).

A sinterização em fornos a vácuo permite a redução da porosidade das cerâmicas, melhorando suas características estéticas e resultando em superfícies mais lisas (Della Bona, 1996). Para obtenção da anatomia e cor planejadas são aplicadas várias camadas de cerâmica e respectivos ciclos de sinterização. Por este motivo esta técnica é considerada a mais sensível à inclusão de defeitos, como

poros (Choi et al., 2012; Quinn et al., 2012).

2.1.2 Técnica de confecção por desenho assistido por computador (CAD) e fabricação assistida por computador (CAM)

Outra técnica para a confecção das cerâmicas que está sendo cada vez mais utilizada por odontólogos e técnicos é a utilização de tecnologia CAD/CAM. A técnica consiste na usinagem de blocos cerâmicos auxiliados por um *software*. Esta técnica utiliza três passos: digitalização do preparo dentário, desenho da restauração e sua usinagem (Conceição, 2007).

A Cerâmica VitaTM Mark II é uma cerâmica feldspática composta por 6-8 % de K₂O, 56-64 % de SiO₂, 20-23 % de Al₂O₃, 6-9 % de Na₂O, 0,3-0,6% de CaO, 0-0,1% de TiO₂ (Vita, 2014b). Esta cerâmica monolítica é fabricada através do processo conhecido como *extrusion moulding*, no qual a mistura de cerâmica numa fase plástica é injetada nos moldes e seca por vários dias antes de ser sintetizada (Della Bona, 2009). Apesar de se tratarem de blocos cerâmicos já compactados e sinterizados, estes também apresentam poros que podem originar fraturas (Donnelly, Burke, 2011).

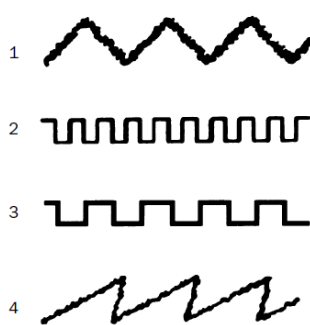
Os blocos de cerâmica Vita Mark II podem ser utilizados na forma monolítica. Assim, eles não são sujeitos a ciclos de queimas unidos a outros materiais de diferentes coeficientes de expansão térmica, reduzindo, em teoria, o risco do surgimento de falhas como o lascamento (Schmitter et al., 2012).

2.2 Caracterização da superfície

A rugosidade de uma superfície pode ser mensurada por diversas técnicas, como a, perfilometria de contato ou óptica, interferometria e microscopias, como a microscopia de força atômica (AFM). Cada equipamento possui suas limitações e indicações, e apresenta diferentes graus de precisão. Além disso, diferentes parâmetros (mais de 150) podem ser utilizados durante a análise (Wennerberg, Albrektsson, 2000; Tholt et al., 2006; Rashid, 2014).

Considerando-se o parâmetro R_a , comumente utilizado na literatura científica, observa-se que diferentes perfis podem resultar em uma mesma medida de amplitude média de perfil, ou seja, em um mesmo valor de R_a (Figura 1). Este parâmetro (ou qualquer parâmetro de amplitude) isolado não caracteriza fielmente uma superfície, e por isso é necessária a relação com outros parâmetros (Agra, Vieira, 2002).

Figura 1- Perfis resultantes de um mesmo valor de R_a



Fonte: Wennerberg, Albrektsson, 2000.

Para uma melhor caracterização da rugosidade superficial, outros parâmetros, além da amplitude, como de espaçamento e híbridos podem ser

utilizados. Entre os parâmetros de espaçamento, que caracterizam a distância entre os elementos de um perfil, existe o RS_m que descreve a largura média dos elementos do perfil. Já os parâmetros híbridos são aqueles que combinam parâmetros de amplitude e espaçamento, como: $P\Delta q$, $R\Delta q$ e $W\Delta q$. Um exemplo é o parâmetro $R\Delta q$ que corresponde a inclinação média quadrática do perfil e indica a superfície apropriada para reflexão da luz (Machado, 2009).

Os parâmetros são influenciados pela forma e as ondulações na da superfície. Para evitar estas interferências da ondulação e da forma na medição é importante a utilização de filtros (*cut-off*) que são usados para separar os comprimentos de onda de um componente de filtragem. O *cut-off* deve ser determinado pela natureza da superfície e não pelo seu comprimento. O valor de *cut-off* deve ser pelo menos 2,5 vezes o espaçamento de pico a pico (Wennerberg, Albrektsson, 2000).

Apesar disto, diversos estudos utilizaram somente um parâmetro de rugosidade. (Sarıkaya, Guler, 2010) compararam técnicas de polimento sobre três cerâmicas feldspáticas estratificadas (Vita VMK95, Ceramco III e Matchmaker II) e uma cerâmica monolítica (Vita Mark II) através da perfilometria com *cut-off* de 0,25 mm. Os autores concluíram que a cerâmica monolítica apresentou os menores valores de rugosidade (R_a) independentemente da técnica de polimento utilizada.

Já Flury et al. (2012) compararam dureza Vickers, módulo elástico e resistência à flexão de duas cerâmicas monolíticas (IPS Empress CAD e Vita Mark II) polidas em sequência de lixas de carbetto de silício até granulação 1000. A rugosidade foi medida com parâmetros de amplitude (R_a e R_z) em perfilômetro de contato com *cut-off* de 0,8 mm e velocidade de leitura de 0,5 mm/seg. Os autores observaram valores de rugosidade muito similares entre ambos parâmetros para as cerâmicas e concluíram que a rugosidade da superfície diminuía conforme as propriedades mecânicas das cerâmicas melhoravam.

No estudo de Vieira et al. (2013) foram avaliadas as rugosidades das cerâmicas VM7, VM9 e VM13 (Vita Zahnfabrik) confeccionadas com a técnica de estratificação e submetidas a três diferentes técnicas de polimento. A rugosidade foi analisada por rugosímetro utilizando-se o parâmetro Ra com *cut-off* de 0,25 mm. Os valores iniciais de rugosidade entre as cerâmicas foram significativamente diferentes, sendo que a cerâmica VM9 apresentou o maior valor de rugosidade. Nenhuma técnica de polimento foi superior ao grupo controle (espécimes glazeados). De acordo com os autores não existe um consenso sobre qual é a melhor técnica de polimento.

Lebon et al. (2015) testaram o desgaste de três brocas (Lyra conical Ø 1 mm, GACD SASU; Lyra. Conical 1,05 mm, GACD SASU; e ponta cilíndrica 12S, Sirona Dental) após a usinagem das cerâmicas monolíticas Lava Ultimate (3M ESPE), Vita Mark II (Vita Zahnfabrik); e Enamic (Vita Zahnfabrik). Foi realizada análise da rugosidade superficial por perfilometria de contato utilizando os parâmetros Ra, Rt (Rugosidade máxima) e Rz, além dos parâmetros 3D: As (baseado na média do desvio padrão dos picos e vales), Sq (desvio das alturas dos picos em relação ao plano médio) e Sz (altura de 10 pontos no plano). Foi realizada análise qualitativa por MEV. A dureza do material influenciou a rugosidade da superfície após a usinagem. De acordo com os autores, pode ser estabelecida uma relação quase linear entre a medida de rugosidade e a dimensão do grão de diamante das brocas. A rugosidade superficial de Lava Ultimate foi maior do que Enamic e Vita Mark II, mas a rugosidade de Enamic e Vita Mark II variou de acordo com os critérios de rugosidade escolhidos - os valores de Ra foram semelhantes, mas o valor de Sz da Vita Mark II foi maior.

2.3 Formação de biofilme nas cerâmicas

A rugosidade do substrato ajuda na formação de biofilme devido ao aumento da área de contato, aumentando a retenção de alimentos e a proteção física às bactérias (Teughels et al., 2006; Hahnel et al., 2009). De acordo com Bollen et al. (1997), valores de rugosidade média (Ra) inferiores ou iguais a 0,2 µm possuem menor capacidade de aderência bacteriana.

O biofilme formado sobre as cerâmicas é pouco espesso, porém altamente viável quando comparado a outros materiais restauradores, uma vez que biofilmes de maior espessura podem dificultar a obtenção de nutrientes (Busscher et al., 2010).

A formação do biofilme se divide em três fases: aderência, crescimento rápido e remodelação. A fase de acoplamento compreende um período de até 8 horas, que se caracteriza pela aderência dos microrganismos pioneiros à película aderida sobre o substrato. Na fase de crescimento rápido (de 4 a 48 horas) ocorre uma maior aderência inter-bacteriana, divisão e multiplicação celular. A fase de remodelação ocorre a partir de 48 horas e é onde o biofilme se torna mais complexo em termos de composição bacteriana (De Lorenzo, 2004).

De acordo com Wessel et al. (2014), as bactérias estão distribuídas de forma não uniforme. Os autores analisaram os microbiomas da saliva e do biofilme de voluntários saudáveis e não saudáveis e encontrou predominância de *Streptococcus* no meio planctônico (saliva), dos quais 50% foram encontrados na forma de biofilme. *S. sanguinis* foi encontrado em 30% na saliva e 85% nos biofilmes, enquanto *S. mitis* e *S. oralis* foram encontrados na mesma porcentagem na saliva e no biofilme.

S. sanguinis e *S. mutans* são antagonistas da formação da cárie, isto significa que são competitivas na colonização do biofilme cariogênico (Becker

et al., 2002). *S. Sanguinis* também está relacionada com a etiologia da doença periodontal (Caufield et al., 2000; Jarvensivu et al., 2004). Assim também foi relacionada com a endocardite bacteriana (Stinson et al., 2003).

Estas bactérias estão presentes na fase inicial de colonização bacteriana e são as primeiras bactérias a aderir à superfície do esmalte e materiais restauradores logo após a higiene oral (Hauser-Gerspach et al., 2007).

A interação da *C. albicans* com o biofilme bacteriano incrementa a homeostase e o potencial de infecção (Xu et al., 2014). Os *Streptococcus* produzem ácido láctico, que leva a queda do pH e modula o crescimento da *C. albicans* (Vylkova et al., 2011). Por outro lado, *C. albicans* pode modular o pH excretando amônia tornando o biofilme mais resistente (Calderone, 2004).

A aderência bacteriana é o primeiro passo para a formação de biofilme. Esta interação é inicialmente medida pela ação e combinação de diferentes forças de adesão entre as células e o substrato. A rugosidade e a energia livre de superfície foram identificadas como os fatores mais importantes que influenciam a formação de biofilmes (Teughels et al., 2006).

As superfícies hidrofílicas (com valores altos de energia de superfície) apresentam menor aderência bacteriana quando comparadas às superfícies hidrofóbicas (com valores baixos de energia de superfície) (Teughels et al., 2006; Nobbs et al., 2009; Busscher et al., 2010).

Takatsuka et al. (2000) investigaram a aderência *in vitro* de cepas padrão de *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *S. sobrinus* à cerâmica (Vitablocs Mark II), ao cimento resinoso e ao esmalte dentário humano. 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 1 h a 37 °C, e lavadas, a seguir, em água destilada. 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 energia livre de superfície (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 micro-organismos. 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. sanguinis*, menor aderência ocorreu no cimento resinoso seguido pelo esmalte e cerâmica. A aderência dos micro-organismos testados diminuiu na presença de saliva, exceto a aderência de *S. sanguinis* ao esmalte que não foi alterada.

Outro estudo semelhante por realizado por (Hahnel et al., 2009) que compararam a rugosidade de resina composta laboratorial (SR Adoro, Estenia), compósito universal (Tetric Evo Ceram) e cerâmica feldspática em bloco (Vita Mark II) por meio de perfilômetro de contato e a aderência bacteriana de *Streptococcus mutans* nos espécimes cultivados em saliva artificial após 24 h por microscopia confocal de varredura a laser. A cerâmica apresentou a menor aderência bacteriana independentemente da técnica de polimento. A resina laboratorial apresentou rugosidade superior, mas sua aderência bacteriana foi similar à da cerâmica.

Hahnel et al. (2009) avaliaram as propriedades superficiais de 5 materiais: glaze GC Zirconia (Egrilmez, Palamar, Sipahi, & Yagci), IPS Empress 2 (Ivoclar Vivadent), In-Ceram Zirconia (Vita, Zahnfabrik), Cercon Base (Degudent), Dgizon-A HIP (Girrbach) e foram usadas como grupo controle placas vidro (Marienfeld, G). As cerâmicas foram padronizadas e polidas e a rugosidade foi medida com perfilometria de contato (*cut-off* de 0,25, parâmetro Ra). A energia de superfície (ELS) e aderência bacteriana foi mensurada antes e após de contato com a saliva artificial. Foi utilizada a técnica da gota séssil, utilizando três

líquidos com diferentes graus de hidrofobicidade (diodometano, etilenoglicol e água). As bactérias *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gorgoni* foram incubadas por 2,5 h a 37°C em saliva artificial, e sua aderência foi quantificada pelo teste redução de resazurin. Todas as cerâmicas apresentaram diferenças significativas de Ra. Após contato com a saliva artificial, todas as cerâmicas diminuíram a ELS, exceto o grupo controle e In-Ceram Zirconia. Para os materiais testados sem saliva artificial, a aderência bacteriana dos *Streptococcus* foi estatisticamente diferente em todas as cerâmicas antes do contato com a saliva. O glaze GC Zirconia apresentou o menor valor de aderência para *S. sanguinis* e *S. oralis*. Porém demonstrou altos valores para *S. gorgoni*. Após o contato com as proteínas da saliva, GC zircônia apresentou valores menores de aderência de *S. gorgoni*. Os menores valores de aderência foram para a GC zircônia. O Digizon-A HIP e o grupo controle apresentaram valores altos de aderência de *S. Sanguinis*. Este estudo não conseguiu correlacionar a adesão de *Streptococcus* com as propriedades da superfície.

2.4 Viabilidade celular das cerâmicas feldspáticas

Williams (2008) redefiniu a biocompatibilidade como a capacidade do material para desempenhar a função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem desencadear qualquer efeito local ou sistêmico indesejado no beneficiário, mas gerar uma resposta celular beneficiária ao tecido e aperfeiçoar o desempenho clínico relevante para a terapia.

Assim, a ausência de citotoxicidade é o principal elemento da biocompatibilidade. O método mais utilizado para a avaliação da citotoxicidade de materiais dentários é o método *in vitro* de cultivo de células por contato direto ou indireto, onde a viabilidade celular pode ser evidenciada com auxílio de

corantes. Porém os resultados deste método dependem dos tipos de células e dos meios de cultura (Freshney, 2011).

Assim, Bagambisa et al. (1994) avaliaram a reação de células osteoblásticas da linhagem MC3 T3-E1 em contato direto com hidroxiapatita, β -fosfato tricálcico, bioglass, In-Ceram (Vita, Zahnfabrik) cerâmica feldspática (Vitadur N dentina; Vita, Zahnfabrik), Glaze (Vitadur N esmalte; Vita, Zahnfabrik), aço e titânio comercial puro, polido e tratado com plasma e ataque ácido. Reações celulares foram observadas em MEV. Todos os materiais apresentaram aderência celular. Porém, no terceiro dia In-Ceram (Vita, Zahnfabrik) e a cerâmica feldspática com o glaze da mesma marca apresentaram indícios de danos nos cultivos celulares dos osteoblastos. A degeneração foi tornando-se mais grave até o décimo dia quando foi diagnosticada como necrose celular. Neste estudo a cerâmica feldspática e o glaze apresentaram-se mais tóxicos que a cerâmica In-Ceram. No entanto, os resultados presentes parecem sugerir que a natureza intrínseca e físico-química da superfície do substrato exerce influência direta sobre a viabilidade das células.

Diversos estudos avaliaram a viabilidade celular das cerâmicas utilizando fibroblastos através de diversas metodologias. Sjogren et al. (2000) analisaram a viabilidade celular de diferentes materiais dentários (metais, ligas metálicas e cerâmicas - Vitadur Alpha, Vita VMK 95, Empress dentin, Duracatin T. TC, Duracatin D.C4) através de testes de *Millipore filter*, *agar overlay* e teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). A citotoxicidade foi analisada em células fibroblásticas de rato. Os autores não encontraram citotoxicidade das cerâmicas, indicando boa biocompatibilidade *in vitro*.

Resultados similares foram encontrados por Uo et al. (2003) que testaram a citotoxicidade das cerâmicas Denzir, Empress, Vita VMK 95, Vita VMK 98, Duceratin T.TC, Duracatin D.C4, Vitadur Alfa e Vitadur N aos fibroblastos

gingivais humanos. As células foram cultivadas por 24 h e logo foram agregadas aos materiais para serem cultivadas por 48 h. Foi utilizado o teste de *Alamar blue assay* que revela a atividade e reações metabólicas das células e o teste de quantificação de DNA foi estimado com fluorometria. Todas as cerâmicas testadas mostraram ausência de citotoxicidade.

Não existe uma técnica específica para determinar a citotoxicidade celular dos materiais dentários. Elshahawy et al. (2009) testaram a citotoxicidade *in vitro* dos cátions liberados durante a simulação da corrosão dos materiais dentários (ligas metálicas e cerâmica feldspática monolítica - IPS Empress CAD). Obteve-se uma solução dos cátions presentes em cada material restaurador, a qual foi incubada com as células fibroblásticas de ratos L-929 por 7 dias. As células viáveis foram medidas com o teste de azul de trypan. Os autores observaram citotoxicidade decrescente de $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^+ > \text{Ni}^{2+} > \text{Be}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Fe}^{3+} > \text{Cr}^{+3} > \text{Mo}^{+5} > \text{Al}^{+3} > \text{Pd}^{+2} > \text{K}^+$. A cerâmica apresentou os íons menos tóxicos (Al^{+3} e K^+).

Kontonasaki et al. (2008) avaliaram a microestrutura e propriedades físicas, mecânicas e biológicas de três cerâmicas: duas cerâmicas feldspáticas (uma de baixa e outra de alta fusão) e uma cerâmica à base de fluorapatita de alta fusão (GC initial LF Dentine GC Corporation, Japão; IPS- d- Sign Dentine Ivoclar, Liechtenstein; IPS Classic Marigin Ivoclar, Liechtenstein). Para o teste biológico foi avaliado a proliferação celular de fibroblastos periodontais humanos nas cerâmicas. As células foram incubadas em contato com as cerâmicas durante 5 dias. O teste de MTT e o MEV foram utilizados para medir a viabilidade celular. Todas as cerâmicas apresentaram incremento da proliferação celular a partir do terceiro dia. Não foi registrada diferença estatística após o 7º dia. Também foi observado alinhamento celular nas cerâmicas de baixa fusão. O comportamento biológico foi similar nas três cerâmicas.

Os testes *in vitro* não resultam em resposta citotóxica similar para todas as cerâmicas classificadas como de excelente biocompatibilidade. (Raffaelli et al., 2008) avaliaram o crescimento e a viabilidade celular de fibroblastos e a expressão de fibronectina em cerâmicas feldspáticas (IPS Classic Dentin, Ivoclar Vivadent) e zircônia (Lava System, 3M ESPE). Foram utilizados fibroblastos da linhagem RAT-1, ensaio MTT e MEV para a análise da morfologia. A capacidade de adesão dos fibroblastos foi avaliada medindo os ácidos nucleicos de células aderidas com o ensaio fluorimétrico Cy Quant. Os autores concluíram que, apesar dos altos níveis de crescimento celular para ambas cerâmicas, os fibroblastos cultivados em zircônia apresentaram uma taxa de crescimento mais elevada do que as células cultivadas na cerâmica feldspática.

Sabaliauskas et al. (2011) testaram a citotoxicidade de diferentes materiais restauradores, incluindo a cerâmica feldspática Vita VMK 95. Para isto, utilizaram cultivos de células gengivais humanas em contato direto de acordo com a ISO 10993-5:1999 e encontraram níveis de citotoxicidade similares para as ligas de ouro e cerâmica feldspática nas primeiras 48 h., porém os dados foram não significativos em comparação ao grupo controle (células cultivadas no fundo de poços sem cerâmicas). A citotoxicidade diminuiu evidentemente após 120 h de cultivo.

(Tete et al., 2014) analisaram a citotoxicidade de diferentes materiais cerâmicos através da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos pelo ensaio de MTT com 72 h de cultura. Os autores observaram que o número de fibroblastos viáveis em contato com a cerâmica feldspática confeccionada com a técnica de injeção foi constante e inferior quando comparado à zircônia e ao dissilicato de lítio, confeccionados pelo sistema CAD/CAM e com o mesmo tratamento de superfície.

Assim, os estudos sobre a topografia dos materiais restauradores observaram relação entre rugosidade, aderência e proliferação de fibroblastos.

Estas células apresentam maior afinidade para superfícies lisas ou sulcadas do que para superfícies finamente rugosas (Chehroudi et al., 1991; Kononen et al., 1992). Essa afinidade tem influência na fase inicial de adaptação dos fibroblastos (Tete et al., 2014; Yamano et al., 2011; Zizzari et al., 2013) que é importante no desenvolvimento da saúde do tecido gengival peri-implantar (Zizzari et al., 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de duas técnicas de confecção das cerâmicas feldspáticas (estratificação e sistema CAD/CAM) e o tratamento da superfície (polimento e aplicação de *glaze*) em termos de rugosidade de superfície, energia livre de superfície, formação de biofilme inicial e viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) sobre estes materiais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Unidades experimentais

Foram confeccionadas 104 amostras de cerâmica feldspáticas.

4.1.2 Fatores em estudo:

a) técnica de confecção da cerâmica feldspática em dois níveis:

- estratificada,
- sistema CAD/CAM;

b) sistema de acabamento em dois níveis:

- polimento com borrachas + pasta diamantada,
- glaze spray*;

c) rugosidade superficial avaliação em dois níveis

- parâmetro Ra,
- parâmetros Rsm;

d) energia livre de superfície

e) microrganismos do biofilme heterotípico em 3 níveis:

- *Streptococcus mutans*,

-*Streptococcus sanguinis*,

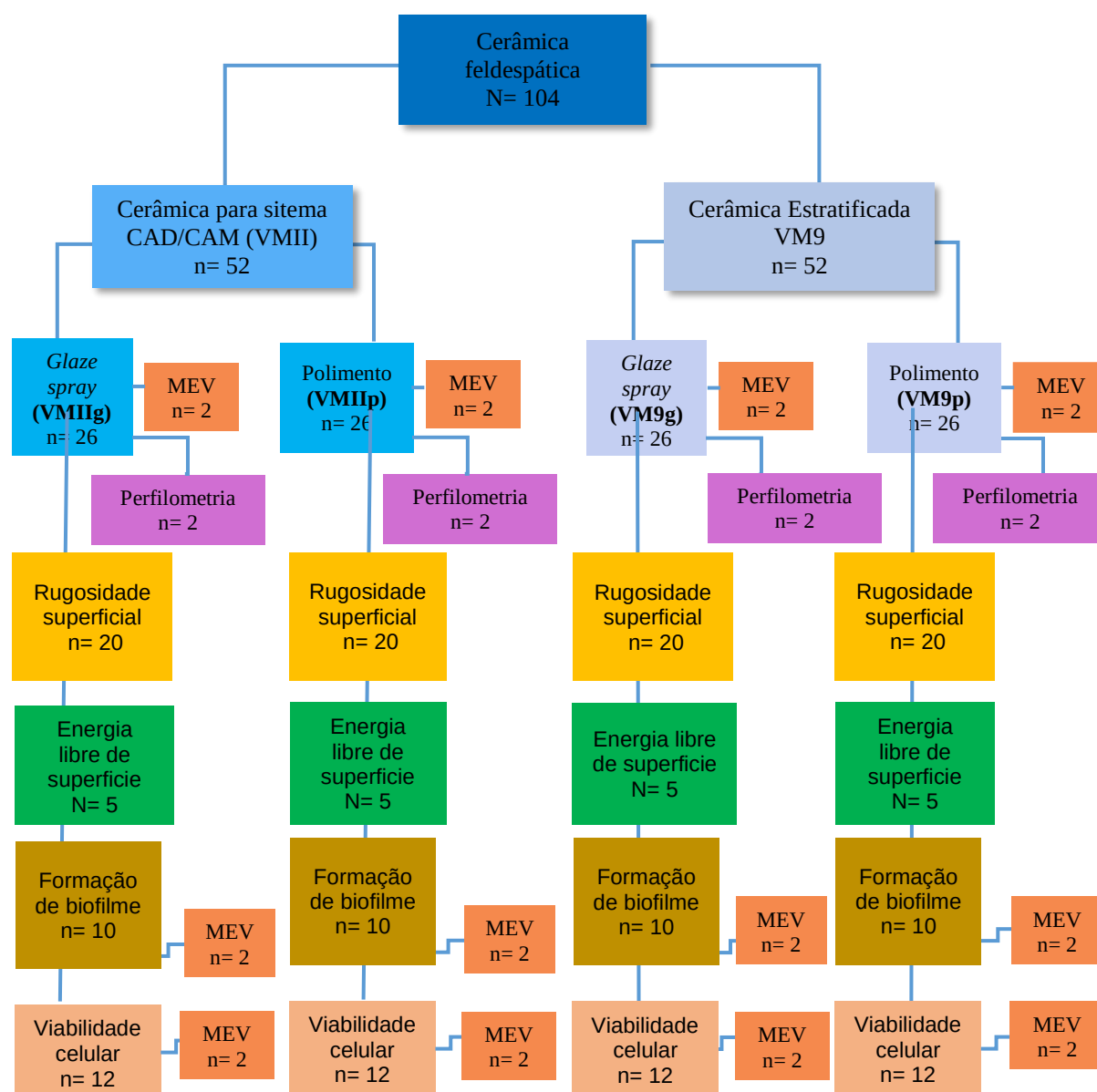
-*Candida albicans*;

f) tempo de viabilidade celular em 2 níveis:

-24 horas,

- 7 dias

Figura 2- Organograma ilustrando a divisão dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Confeção dos corpos-de-prova

A partir das cerâmicas feldspáticas descritas no Quadro 1 foram obtidos 46 espécimes de cada material, que foram lixados para padronização das dimensões finais (4,5 x 4,5 x 1,5 mm) e tiveram todas as superfícies polidas em politriz automática (EcoMet™/Auto Met™250, Buehler, Illinois, EUA) com lixas d'água de granulação decrescente até #1200 (30 s por lixa), sob refrigeração com água.

Quadro 1 - Marcas comerciais, fabricantes e indicações de uso das cerâmicas do presente estudo

Material	Marca comercial	Fabricante	Indicação	Lote
Cerâmica feldspática para CAD/CAM (VMII)	Vitablocs Mark II	Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha	<i>Inlays, onlays, coroas parciais</i>	34700
Cerâmica feldspática estratificada (VM9)	Vita VM9		Cobertura de Y-TZP e maquiagem de VMII e PM9	41810
Líquido modelador	Vita VM Modeling Liquid		Líquido de modelar para porcelanas	11040

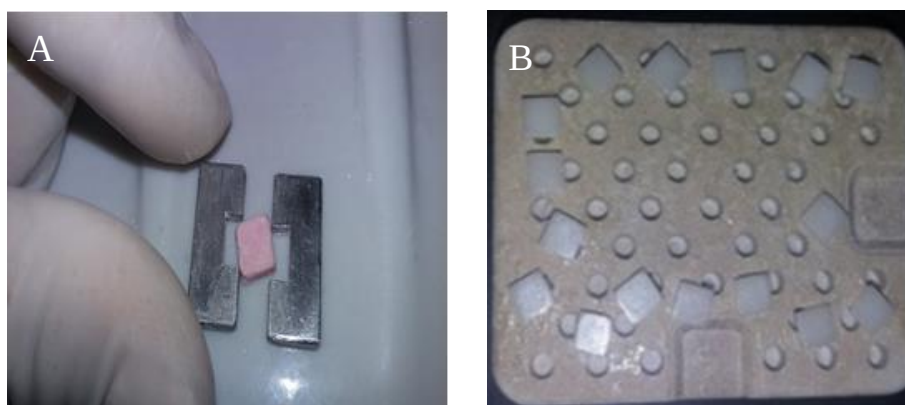
4.2.1 Cerâmica para CAD/CAM

Os blocos de Vita Mark II de medidas 12,1 x 13,9 x 17,6 foram cortados em blocos menores de 4,5 x 4,5 x 1,5 com disco diamantado em máquina de corte sob-refrigeração constante. Em seguida, foi realizada a limpeza em banho ultrassônico com álcool isopropílico com água destilada por 15 min e os espécimes foram secos a temperatura ambiente.

4.2.2 Cerâmica estratificada

O pó da porcelana VM9 foi misturado com o líquido modelador recomendado pelo fabricante e aplicado em matriz bipartida de aço inoxidável com auxílio de pincel. Foram aplicadas camadas finas e o excesso de líquido foi absorvido por lenços de papel, que também se utilizou para compactar a mistura da porcelana. O conjunto foi levado ao forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik) para a queima tipo “BASE DENTIN wash” (Figura 3).

Figura 3- Confeção dos espécimes de VM9



Legenda: a) Matriz de inox para aplicação da cerâmica., b) Amostras sinterizadas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O Quadro 2 apresenta os materiais utilizados nas etapas 4.1.3 e 4.1.4.

Quadro 2 - Marcas comerciais, fabricantes e indicações de uso dos materiais restauradores que foram utilizados no presente estudo

Material	Marca comercial e fabricante	Indicação	Lote
Glaze cerâmico	Plus Glaze LT Spray, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha	Glaze de baixo ponto de fusão para cerâmica com temperatura de cozimento menor de 850 °C	36300
Borracha para polimento	Polidor de Cerâmica Ceramisté PM, Standard, Ultra e Ultra II, Shofu IN., Japão	Acabamento e polimento de porcelana antes da aplicação de glaze	0511125 0113203 0113203
Pasta diamantada	Diamond Excel, FGM, Joinville, SC, Brasil	Contém diamante micronizado (2 a 4µm), indicada para polimento e brilho final de porcelanas	130616
Disco de feltro	Disco de Feltro Diamond, FGM, Joinville, SC, Brasil	Utilizados para aplicação de pastas e abrasivos para polimento de materiais restauradores	231115

Foi realizada a limpeza de todos os espécimens em banho ultra-sônico com álcool isopropílico com água destilada por 15 min e os espécimes foram secos a temperatura ambiente.

4.2.3 Aplicação do glaze (subgrupo “g”)

Foi aplicada uma camada de spray Vita AKZENT® Plus – Glaze LT Spray (VITA Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha) a uma distância padronizada de 20 cm por 5 s sobre uma das superfícies de 4,5 x 4,5 mm de 26 espécimes de cada cerâmica. Em seguida as amostras foram levadas ao forno Vita Vacumant 6000P (Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen Germany) para o processo de queima do glaze (Figura 4).

Figura 4- Aplicação de glaze Spray na superfície da cerâmica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Polimento das amostras (subgrupo “p”)

As superfícies das demais 26 amostras de cada material foram polidas com as borrachas diamantadas montadas em peça reta, em três etapas: Standard para

acabamento, Ultra para polimento e Ultra II para superpolimento, utilizando-se velocidade lenta, por 20 s. Em seguida, realizou-se polimento com pasta diamantada em disco de feltro em velocidade baixa por 20 s. Todos os precedimentos foram feitos com o mesmo operador.

4.3 Caracterizações da superfície dos materiais

4.3.1 Análise da rugosidade superficial

Tendo em vista a influência da rugosidade superficial no acúmulo de biofilme observado por estudos anteriores (Aykent et al., 2010; Anami et al., 2012), foi realizada a análise através dos parâmetros Ra e RSm (Wennerberg, Albrektsson, 2000) por um rugosímetro de contato (Surftest SJ 400, Mitutoyo, Tóquio, Japão). Foram realizadas três leituras em 20 espécimes que posteriormente foram utilizados nos demais testes. As leituras foram realizadas no centro da área de trabalho de 4,5 x 4,5 mm de cada amostra com velocidade de 0,2 mm/s, seguindo a norma ISO 4287-1997, com filtro Gaussian e o valor *cut-off* de 0,8 mm. Foram calculados valores médios para cada amostra. No caso do parâmetro RSm, quando a leitura indicou a mensagem de L-P (número insuficiente de picos e vales para o cálculo de RSm) utilizou-se o maior valor de rugosidade RSm obtido pela amostra ou pelo grupo (Figura 5).

Figura 5- Amostras posicionada sobre placa de vidro para análise pelo rugosímetro de contato



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Análise da energia livre de superfície (ELS)

Especificamente para esta etapa, devido ao requisito de tamanho deste teste, foram obtidas 10 amostras de cada um dos materiais nas dimensões de 15 x 15 x 1,5 mm de forma semelhante descrita anteriormente, sendo que 5 receberam polimento e 5 receberam aplicação de glaze.

O tensiômetro óptico TL 1000 – Invoicedfreight, Theta Lite (Attension, Lichfield, Staffordshire, RU) foi utilizado para a medição do ângulo de contato em 5 áreas distintas por amostra com a técnica de gota séssil com dois líquidos de diferentes tensões superficiais: água destilada deionizada e diiodometano (Winkler et al., 2014) em temperatura ambiente. Uma seringa graduada (Gastight Syringes #1001 – 1ml, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) com agulha hidrofóbica depositou a gota e, após o tempo de espera de 5s, o ângulo de contato médio foi calculado (One Attension, BiolinScientific, Lichfield, Staffordshire, RU) a partir de 60 imagens adquiridas por segundo durante 30 s. Para a obtenção do valor da energia livre de superfície foram utilizadas as equações de Young-Dupré do

trabalho de adesão (1) e média harmônica da energia de superfície proposta por Wu (1972), (2). Para resolver as equações foram utilizados o cosseno do ângulo de contato interno da gota e os valores dos componentes dispersivos dos líquidos polar e apolar apresentados no Quadro 3. A energia de superfície total dos sólidos resulta da soma dos fatores de componentes dispersivo (γ^S_d) e polar (γ^S_p) (Grythe, Hansen, 2006).

$$W_A = \gamma^{LV} \cdot [\cos(\theta) + 1] \quad (1)$$

$$\gamma^{LV} \cdot [\cos(\theta) + 1] = \frac{4\gamma^S_d \cdot \gamma^{LV}_d}{\gamma^S_d + \gamma^{LV}_d} + \frac{4\gamma^S_p \cdot \gamma^{LV}_p}{\gamma^S_p + \gamma^{LV}_p} \quad (2)$$

Quadro 3 - Componentes dispersivo (γ^S_d) e polar (γ^S_p) e energia de superfície (γ^T), em mN/m, dos líquidos utilizados para a medida do ângulo de contato.

Líquido	γ^S_d (mN/m)	γ^S_p (mN/m)	γ^T (mN/m)
Água deionizada	21,8	51,0	72,8
Diiodometano	50,8	0	50,8

Legenda: mN/m=mj/m² (unidade de energia por área).

Fonte: Gryte, Hansen (2006)

4.4 Formação de biofilme

4.4.1 Esterilização e contaminação dos espécimes

Dez espécimes de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm de cada subgrupo receberam uma camada de esmalte para unhas (Colorama, São Paulo, Brasil), exceto em umas das faces de 4,5 x 4,5 mm, delimitando a área para aderência de biofilme. Em seguida,

os corpos-de-prova foram esterilizados por exposição à radiação UV na câmara de fluxo por 30 min, sendo 15 min de cada lado. Este procedimento teve sua eficácia avaliada durante estudo piloto.

Para avaliação da formação dos biofilmes sobre a superfície dos materiais restauradores foi utilizada a metodologia proposta por Pereira et al. (2011), com modificações. Os biofilmes foram compostos por cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Candida albicans* (ATCC 18804). Preparou-se suspensões padrão de cada cepa com densidade óptica relativa a 10^6 células/ml. Para isto, os estreptococos semeados em ágar BHI (infusão de cérebro coração) (Difco, Detroit, EUA) *C. albicans* será semeado em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA). *C. albicans* foram incubados por 24 h a 37 °C e os *Streptococcus* s foram incubados em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Decorrido o período de incubação, as colônias de micro-organismos foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl a 0,9%) e o número de células em suspensão foram calculadas em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Para isto, foram utilizados os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda de 0,620 e 398 nm para *S. mutans*, 0,560 e 398 nm para *S. sanguinis*, 0,284 e 530 nm densidade óptica para *C. albicans*. Estes parâmetros foram previamente estabelecidos por meio de uma curva padrão com as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) *versus* absorbância.

Os biofilmes foram formados em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar. Foram contaminadas 10 amostras de cada subgrupo com biofilme heterotípico, cada amostra foi posicionada na primeira cavidade da linha de uma placa de 96 poços de cultura (Costar Corning, NY, EUA) com 150 µL de caldo estéril de BHI suplementado com 1% de sacarose e 16,5 µL de suspensão padronizada de cada micro-organismo: *S. mutans*, *S. sanguinis* e *C. albicans*. A seguir foi obtido biofilme heterotípico com a associação de *S. mutans*, *S. sanguinis*

e *C. albicans*, inoculada na placa 16,5 µL da suspensão. Visando avaliar a influência da formação de biofilme precoce, as placas foram seladas e incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ durante 16 h.

4.4.2 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

Com objetivo de remover células bacterianas não aderidas, cada espécime foi lavado substituindo 200 µL do caldo de cada poço por solução fisiológica estéril e as placas foram agitadas por 5 min (agitador orbital, Solab, Piracicaba). 8 amostras foram individualmente transferidas para tubo falcon com 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%) e sonicadas (Sonoplus HD 2200, 50 W, Bandelin Eletronic) por 30 s para remoção dos biofilmes da superfície dos espécimes. Realizou-se uma série de diluições decimais e alíquotas de 0,1 ml das diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴. *Candida albicans* foi semeada na diluição de 10⁻³ e os *Streptococos* a 10⁻⁴. Foram semeadas, em duplicatas, em placas de Petri com meios seletivos para cada micro-organismo: ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) com 0,2 UI/mL de bacitracina (União Química, São Paulo) e sacarose (MSBS) para *S. mutans*, ágar *Mitis Salivarius* (Difco, Detroit, EUA) para *S. sanguinis* ágar Sabouraud dextrose com 50 mg/l de coranfenicol (União Química, São Paulo) para *C. albicans*.

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h e, então, as placas contendo colônias foram contadas e o número de UFC/mL foi determinado para logo ser transformado em log₁₀. Para análise dos resultados foram utilizados os dados isolados da formação dos biofilmes de cada micro-organismo sobre cada amostra e também a soma do total de micro-organismos por amostra.

4.5 Avaliação da viabilidade celular (teste MTT)

Para o teste MTT, toda manipulação foi realizada em fluxo laminar. O primeiro passo foi o cultivo das células nas condições de 5% de CO₂ a 37 °C (Sanya, Electric Co., Osaka, Japão). As culturas de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) foram estabilizadas através da técnica da expansão. Para isto, as células foram descongeladas e cultivadas em duas garrafas de cultura de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultura DMEM (DMEM high glucose, GlutaMAXTMSupplement, pyruvate, Gibco) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB, Gibco) e 1% de penicilina estreptomicina (LGC, Cotia, SP).

Para manutenção da cultura celular, o meio de cultura foi substituído cada 48 horas, e as células foram cultivadas durante 7 dias. Para a verificação das células viáveis para o teste foi utilizado o teste azul de Trypan (0,4%). As garrafas foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS, Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Para desprender as células das garrafas, 2 mL de tripsina 0,05% (Gibco) foram adicionados à solução e em seguida, as células foram armazenadas durante 5 min em estufa (5% de CO₂, 37 °C). Após esse período foi neutralizada a ação da tripsina agregando 4 mL de meio de cultura. O conteúdo das garrafas foi transferido para um tubo falcon de 15 mL. A suspensão foi centrifugada (2000 rpm por 5 min a 25 °C) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em 1 mL de meio. A suspensão de células foi transferida para um tubo falcon de 30 mL com 29 mL de meio. Foram obtidas 360.000 células, 20.000 células para cada poço da placa de 24 poços.

Doze amostras de cada material nas dimensões de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm foram utilizadas para avaliação da adesão de células fibroblásticas. As células FMM-1 foram plaqueadas sobre as respectivas amostras, dispostas no interior das placas

de 24 poços. Foram colocadas duas amostras por poço com 1 mL das suspensões contendo 20.000 células. As placas foram incubadas à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h ou 7 dias. No período de 7 dias o meio foi substituído a cada 48 h. Após estes períodos, a sobrevivência celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH), que é indicativa da função mitocondrial, e que é observada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio; Sigma, St Louis, EUA). A viabilidade celular foi quantificada pela dissolução do MTT em 0,1 N NaOH (6,25 v/v%) em DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*).

O grupo controle consistiu em poços sem material cerâmico. Para isto, após concluído o período de incubação de cada grupo o sobrenadante de cada poço foi descartado e as cerâmicas foram retiradas dos poços. As monocamadas celulares no fundo dos poços foram lavadas com 500 µml de PBS. Foi aplicado em cada poço a solução de 500 µml de solução de MTT, que foi preparada conforme recomendação do fabricante (0,5 mg/ml de PBS). As placas foram encubadas durante 1 h a 37 °C em ambiente sem luz.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com 500 µml de PBS. Foi acrescentado 500 µml de DMSO incluindo nos poços controles e as placas foram incubadas por 10 min e agitadas na mesa orbital durante 10 min. 100 µml do sobrenadante de cada poço foi removido e colocado em triplicata em uma placa com 96 poços para posterior leitura da densidade óptica em espectrofotômetro. A leitura resultante foi mensurada através de um comprimento de onda de 570 nm (EL808IU, Biotek, Vermont, EUA). A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (=100%) e classificada de acordo ao Quadro 4.

Quadro 4 - Classificação de citotoxicidade de materiais em relação aos níveis de viabilidade celular em porcentagem

Classificação	Viabilidade celular (%)
Não citotóxico	>90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	<50

Legenda: Porcentagem em relação ao controle negativo de citotoxicidade.

Fonte: International Organization for Standardization, 1999

4.6 Análises qualitativas

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica da superfície dos materiais foi realizada em espécimes antes do processo de esterilização (n=2), contaminados com micro-organismos (n=2) e com fibroblastos após cada período de avaliação (n=2). Os espécimes contaminados com micro-organismos e com crescimento de fibroblastos foram fixados utilizando o protocolo de imersão em solução de glutaraldeído 2,5% por 1 h em temperatura ambiente, e desidratadas subsequentemente por uma série de passagens em concentrações crescentes de álcool etílico (10%, 25%, 50%, 75%, 80% e 90% por 20 min cada e 100% durante 1 hora). As amostras foram fixadas em porta amostras com fita adesiva dupla-face de carbono (SPI, West Chester, PA, EUA), e foram metalizadas com liga de ouro (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Reino Unido) por 120 s, corrente de 10-15 mA, vácuo de 130 mTorr, taxa de metalização: 5 nm/min e camada de ouro de aproximadamente 15 nm. O MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República

Tcheca) foi operado entre 15 e 30 kV e spot de 5.

4.6.2 Perfilometria óptica

Para análise qualitativa da topografia e rugosidade, a superfície de duas amostras de cada subgrupo foi analisada em perfilômetro óptico digital (Wyko, NT 1100, Veeco, EUA) que é conectado a uma unidade computadorizada contendo o programa computacional Wyko Vision 32 (Veeco, EUA). As medições dos parâmetros de rugosidade (média aritmética de todos os picos e vales encontrados durante a leitura da amostra) foram realizadas com um aumento de 200 X em uma área representativa da amostra de 301,3 x 229,2 μm .

4.7 Análise dos resultados

Inicialmente os dados de rugosidade (parâmetros R_a e R_{Sm} ; em μm), energia livre de superfície (mJ/m^2), UFC (UFC/mL) e a viabilidade celular (porcentagem em relação ao grupo controle) foram tabulados para análise descritiva e, em seguida, foram avaliados quanto aos pressupostos da normalidade de variâncias pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk (Minitab, versão 17.1.0, Champaign, Illinois, EUA; GraphPad Prism versão 5.00, San Diego, California, EUA).

Para os dados de rugosidade e energia livre de superfície, foi utilizado o teste ANOVA 2 fatores (material x tratamento de superfície) e as diferenças foram detectadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (ambos, $\alpha=95\%$). Os

dados de UFC foram analisados pelo teste ANOVA 3 fatores (material x tratamento x micro-organismos) seguido por teste de Tukey (ambos, $\alpha=95\%$). Os dados de viabilidade celular (teste MTT) foram submetidos ao teste t para detectar diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, e foram submetidos ao teste ANOVA 3 fatores (material x tratamento x tempo) e teste de Tukey (ambos, $\alpha=95\%$). As imagens de perfilometria e MEV foram analisadas qualitativamente e descritas.

5 RESULTADOS

5.1 Rugosidade superficial

A estatística descritiva dos dados de rugosidade encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão (dp), em (μm), e coeficiente de variância (CV), em %, e grupamentos homogêneos dos testes de Tukey dos dados de rugosidade de acordo com os parâmetros Ra e RSm

Material	Superfície	Ra		RSm	
		Média $\pm$ dp	CV	Média $\pm$ dp	CV
VMII	Polida	0,3 $\pm$ 0,1 ^C	43,3	108,9 $\pm$ 38,9 ^B	35,8
	Glazeada	1,6, $\pm$ 0,7 ^B	19,2	168,6 $\pm$ 44,0 ^A	26,1
VM9	Polida	0,3 $\pm$ 0,2 ^C	59,7	123,3 $\pm$ 64,5 ^B	52,3
	Glazeada	2,0 $\pm$ 0,7 ^A	35,6	135,8 $\pm$ 59,3 ^{AB}	43,7

Legenda: Letras maiúsculas distintas representam diferença estatisticamente significativa dentro de um mesmo parâmetro (coluna).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os testes ANOVA 2 fatores detectaram que a interação entre material e tratamento de superfície influenciou a rugosidade dos espécimes, tanto para o parâmetro Ra ($p=0,015$) quanto para o parâmetro RSm ($p=0,049$) (Tabelas 2 e 3).

As cerâmicas (VMII e VM9) polidas apresentaram os menores valores de Ra e RSm, sendo que a cerâmica estratificada (VM9) apresentou rugosidade RSm similar para os dois tratamentos de superfície avaliados.

Tabela 2- Tabela ANOVA 2 fatores para os dados de Ra

	GL	MS	QS	F	p-valor
Material	1	0,7	0,7	4,3	0,40
Tratamento	1	44,8	44,8	259,7	0,00
Interação	1	1,0	1,0	6,14	0,015*
Erro	76	13,1	0,17		
Total	79	59,6			

Legenda: *p<0,05 (interação estatisticamente significativa).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3- Tabela ANOVA 2 fatores para os dados de RS

	GL	MS	QS	F	p-valor
Material	1	1683	1683	0,6	0,439
Tratamento	1	26081	26081	9,36	0,003
Interação	1	11119	11119	3,99	0,049*
Erro	76	211684	2785		
Total	79	250567			

Legenda: *p<0,05 (interação estatisticamente significativa).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Energia livre de superfície

A estatística descritiva de ELS está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4- Valores de ângulo de contato médio ($\pm$ desvio padrão) para água e diiodometano, componentes dispersiva (γ_d , em mN/m) e polar (γ_p , em mN/m) e respectiva ELS (γ_T , em mN/m) dos grupos experimentais

Material	Superfície	Angle de contac		Componentes		
		Água	Diiodometano	γ_d	γ_p	γ_T
		Média $\pm$ dp (°)	Média $\pm$ dp (°)			
VMII	Polida	60,8 $\pm$ 6	43,1 $\pm$ 7	18,5 $\pm$ 1	46,6 $\pm$ 3	65,1 $\pm$ 6 ^A
	Glazeada	41,5 $\pm$ 6	37,5 $\pm$ 5	17,7 $\pm$ 3	38,6 $\pm$ 3	56,3 $\pm$ 4 ^B
VM9	Polida	66,0 $\pm$ 5	46,9 $\pm$ 5	26,8 $\pm$ 3	41,1 $\pm$ 2	67,9 $\pm$ 4 ^A
	Glazeada	33,8 $\pm$ 6	36,4 $\pm$ 3	15,6 $\pm$ 3	36,8 $\pm$ 3	52,4 $\pm$ 2 ^B

Legenda: Letras maiúsculas idênticas representam ausência de diferença estatística pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste ANOVA 2 fatores observou que o tratamento de superfície influenciou a energia livre de superfície dos materiais e superfícies analisadas ($p=0,00$; Tabela 5).

Tabela 5- ANOVA 2 fatores para os dados de energia livre de superfície

Fonte de variação	Gl	SM	SQ	F	p-valor
Tratamento de superfície	1	740,3	740,2	37,3	0,00*
Materiais	1	1,4	1,4	37,3	0,79
Interação	1	55,8	55,8	2,81	0,113
Erro	16	317,19	19,85		
Total	19	1115,1			

Legenda: * $p<0,05$ (interação estatisticamente significante).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de comparações múltiplas de Tukey verificou que as cerâmicas polidas apresentaram maior energia livre de superfície (ELS, γT) em comparação com as glazeadas (Tabela 4).

5.3 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

O teste ANOVA 3 fatores apontou que a interação dos fatores “Material*Superfície*Micro-organismos” influenciou estatisticamente a aderência de micro-organismos na superfície dos materiais ($p=0,018$; Tabela 6).

Tabela 6- Tabela ANOVA 3-fatores dos dados de UFC/mL ($\log_{10}$) do biofilme heterotípico

Fonte de variação	Gl	SQ	QM	F	p-valor
Superfície	1	77,978	77,978	160,54	0,000
Material	1	2,008	2,008	4,13	0,045
Micro-organismo	2	356,081	178,040	366,56	0,000
Superfície*Material	1	1,494	1,494	3,08	0,083
Superfície*Micro-organismo	2	55,263	27,632	56,89	0,000
Material*Micro-organismo	2	2,548	1,274	2,62	0,079
Superfície*Material*Micro-organismo	2	4,105	2,052	4,23	0,018*
Erro	84	40,800	0,48		
Total	95	540,27			

Legenda: * $p<0,05$ (interação estatisticamente significante).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de comparações múltiplas de Tukey apontou que a aderência de S.

mutans e *S. sanguinis* foi estatisticamente similar e superior nos materiais cerâmicos para ambos os tratamentos de superfície e que sobre os materiais glazeados ocorreu maior aderência de *C. albicans* em comparação com os polidos (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios dos dados de aderência de micro-organismos, em UFC/mL ($\log_{10}$), e grupamentos homogêneos do teste de Tukey

Material	Superfície	Micro-organismo	Média
VMII	Polido	<i>S. sanguinis</i>	6,38 ^A
		<i>S. mutans</i>	6,53 ^A
		<i>C. albicans</i>	0,0 ^D
	Glazeado	<i>S. sanguinis</i>	7,02 ^A
		<i>S. mutans</i>	7,26 ^A
		<i>C. albicans</i>	4,78 ^B
VM9	Polido	<i>S. sanginis</i>	6,50 ^A
		<i>S. mutans</i>	6,47 ^A
		<i>C. albicans</i>	1,55 ^C
	Glazeado	<i>S. sanginis</i>	7,29 ^A
		<i>S. mutans</i>	7,22 ^A
		<i>C. albicans</i>	4,67 ^B

Legenda: Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Teste MTT

As médias de absorvância resultantes do teste de MTT, em % em relação ao grupo controle considerado 100%, estão descritas na Tabela 8. A normalidade dos grupos foi comprovada segundo o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,150$ para todos os grupos). De acordo com a classificação proposta pela ISO 10993-5:1999, todas as cerâmicas e superfícies testadas apresentaram-se não citotóxicas ou levemente citotóxicas após 24 h de crescimento celular. Após 7 dias de crescimento celular, VM9 polida e ambas as cerâmicas glazeadas tornaram-se moderadamente citotóxicas.

O teste de t de Student apontou que as células FMM-I do controle diferiram da VM9 polida no período de 24 h e da VMII polida no período de 7 dias (Tabela 8).

Tabela 8- Médias de absorvância resultantes do teste de MTT, em %, e p valor da comparação dos testes t de Student em relação ao grupo controle considerado 100%

Material	Superfície	Tempo	Média	p-valor
VMII	Polida	24 h	85,91	0,023*
		7 dias	86,11	0,132
	Glazeada	24 h	152	0,0001*
		7 dias	69,11	0,0033*
VM9	Polida	24 h	95,26	0,5036
		7 dias	71,77	0,006*
	Glazeada	24 h	160,75	<0,0001*
		7 dias	75,69	0,0159*

Legenda: * $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de variância ANOVA 3 fatores apontou que a interação dos fatores tempo e tratamento de superfície influenciaram estatisticamente a viabilidade celular ($p=0,00$; Tabela 9).

Tabela 9- Tabela ANOVA 3 fatores para os dados de viabilidade celular

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	p-valor
Material	1	0,000108	0,000108	0,45	0,503
Tempo	1	0,038920	0,038920	164,05	0,00
Superfície	1	0,013339	0,013339	56,22	0,00
Material*Tempo	1	0,000612	0,000612	2,58	0,113
Material*Superfície	1	0,000356	0,000356	1,50	0,225
Tempo*Superfície	1	0,019536	0,019536	82,35	0,00*
Material*Tempo*Superfície	1	0,000401	0,000401	1,69	0,198
Erro	64	0,15185	0,000237		
Total	71	0,08845			

Legenda: * $p<0,05$ (efeito da interação estatisticamente significativa).

Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste de Tukey identificou que a maior média de viabilidade celular ocorreu para as cerâmicas glazeadas após 24 h de crescimento celular e que após 7 dias a viabilidade celular foi reduzida para ambos os tratamentos de superfície avaliados (Tabela 10).

Tabela 10- Médias de absorvância $\pm$ desvio padrão (dp), em densidade óptica, e agrupamentos homogêneos do teste de Tukey do efeito interação “Tempo*Superfície”

Tempo*Superfície	Média $\pm$ dp
24 h, polida	0,083 $\pm$ 0,01 ^B
24 h, glazeada	0,143 $\pm$ 0,02 ^A
7 dias, polida	0,069 $\pm$ 0,00 ^C
7 dias, glazeada	0,064 $\pm$ 0,00 ^C

Legenda: Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

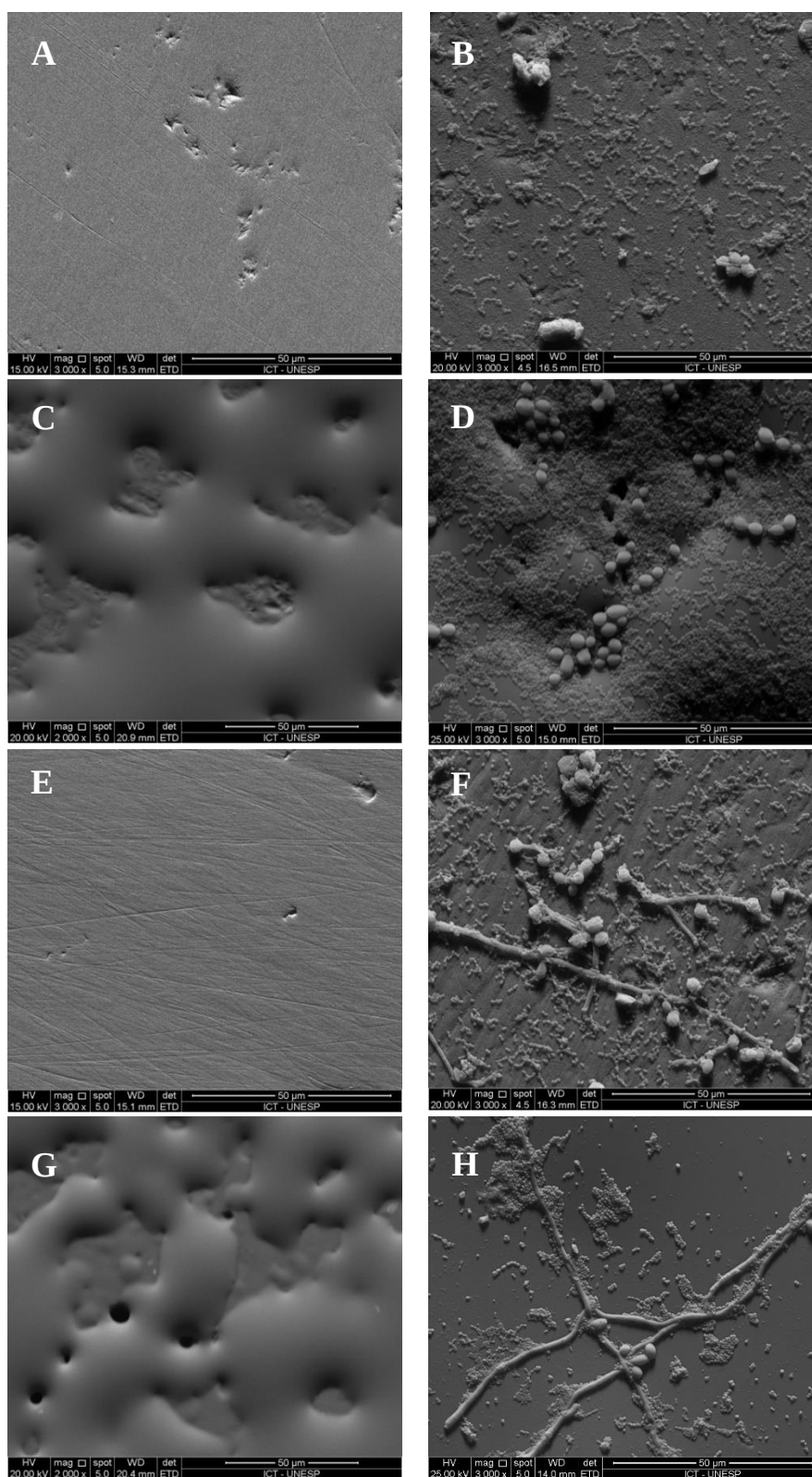
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 6 apresenta as micrografias representativas das superfícies das cerâmicas polidas e glazeadas, estéreis e com biofilme heterotípico composto por *S. mutans*, *S. sanguinis* e *C. albicans*.

Verifica-se a presença de ranhuras de polimento nas cerâmicas polidas (Figuras 6A e 6E) e do acúmulo de *glaze* em “ilhas” sobre a superfície das cerâmicas glazeadas (Figuras 6C e 6G).

Nas micrografias de biofilme (Figura 6, coluna direita) é possível identificar os *Streptococcus* pela sua forma de coco, mas não é possível diferenciar as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis*. A levedura, *C. albicans*, apresenta-se em tamanho maior que as bactérias e é possível identificar suas hifas, estrutura celular da levedura que é uma prolongação em forma de bastão (Figuras 6F e 6H).

Figura 6 - Micrografias representativas das cerâmicas glazeadas e polidas com e sem formação de biofilme (2000-3000 X)



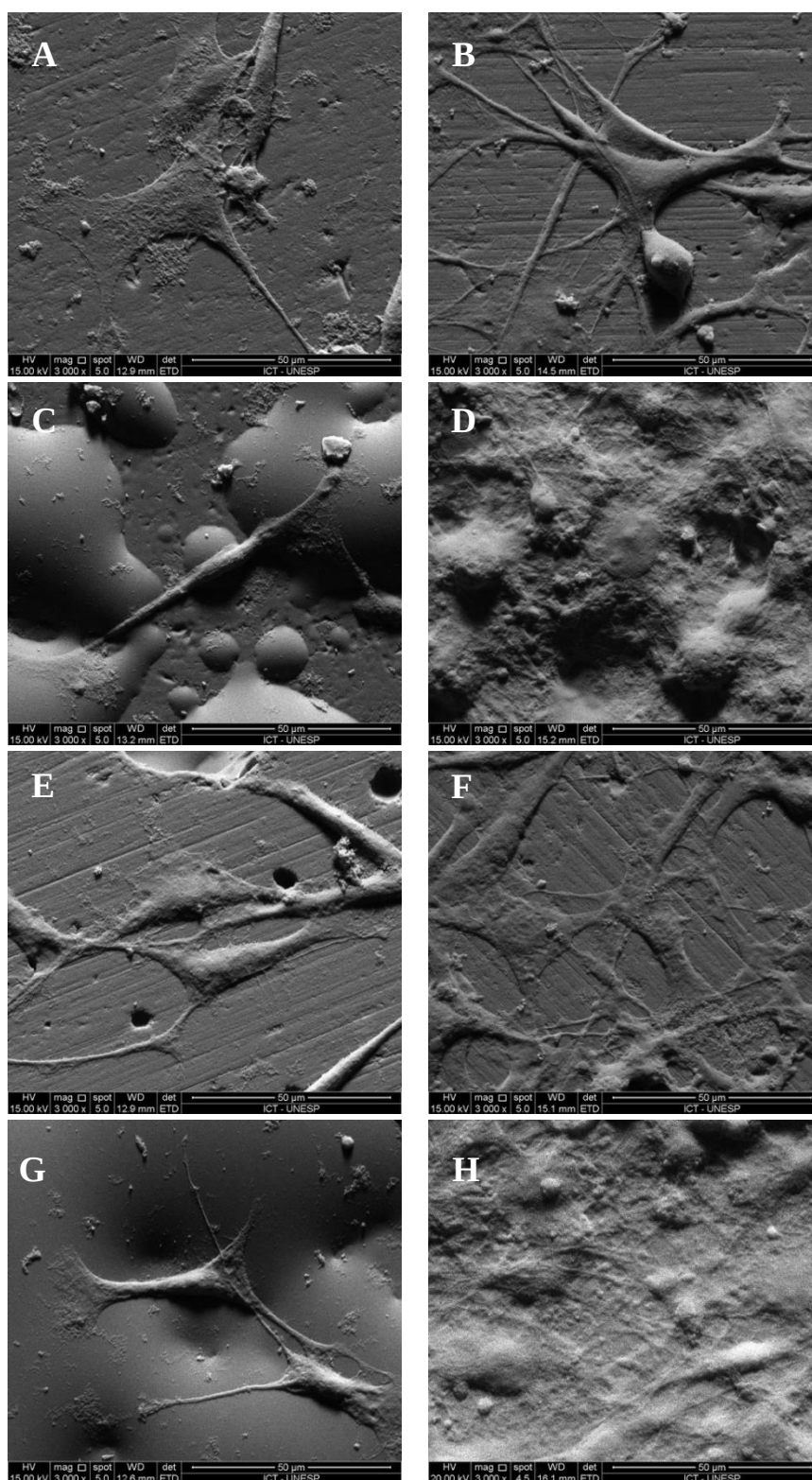
Legenda: Coluna esquerda: amostras estéreis; Coluna direita: amostras contaminadas com biofilme heterotípico. a-b) VMII polida; c-d) VMII glazeada; e-f) VM9 polida; g-h) VM9 glazeada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 7 apresenta micrografias das superfícies das cerâmicas polidas e glazeadas após 24 h ou 7 dias de contato com as células fibroblásticas FMM-1.

Observa-se as células fibroblásticas com prolongamentos citoplasmáticos irregulares que é característico de células em atividade. No período de 24 h (Figura 7, coluna esquerda), são observados fibroblastos em menor quantidade aderidos tanto nas cerâmicas polidas quanto nas glazeadas. A Figura 7B apresenta um fibroblasto produzindo fibrócito (forma arredondada). Nas imagens de 7 dias de crescimento celular (Figura 7, coluna direita), verifica-se maior número de células aderidas às superfícies das cerâmicas glazeadas dispostas em multicamadas que permitem pouca visualização da superfície do material devido a produção de matriz extracelular (Figuras 7D e 7G). Verifica-se que o crescimento de fibroblastos ocorreu independente de porosidades ou outras irregularidades superficial.

Figura 7 - Micrografias representativas das superfícies das cerâmicas polidas e glazadas após 24 h ou 7 dias de contato com as células fibroblásticas (3000X).



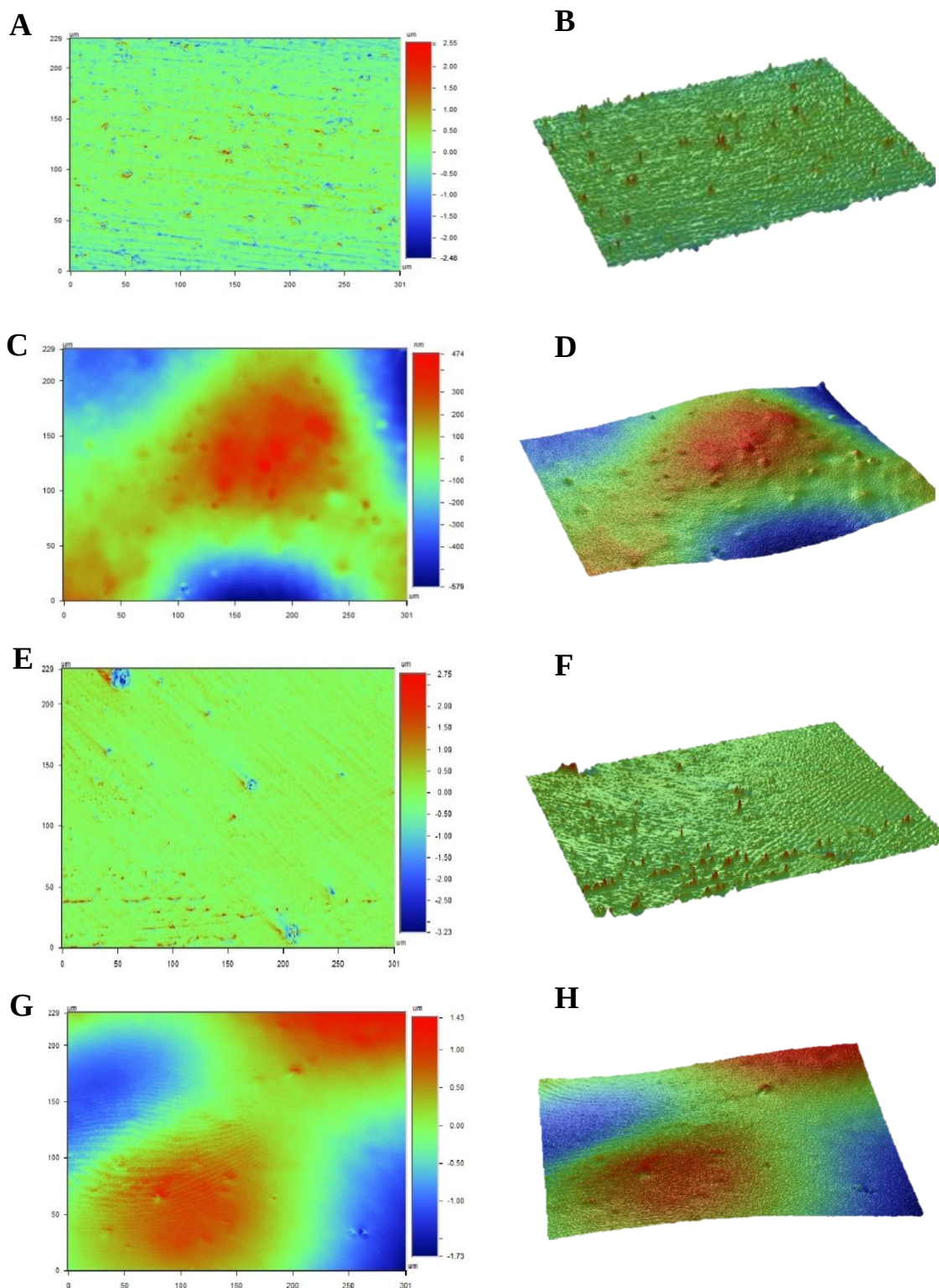
Legenda: Coluna esquerda: 24 h de crescimento celular; Coluna direita: 7 dias. a-b) VMII polida; c-d) VMII glazeada; e-f) VM9 polida; g-h) VM9 glazeada. Verifica-se a disposição das células em multicamadas nas amostras glazeadas após 7 dias.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Perfilometria óptica

As imagens 2D e 3D das superfícies cerâmicas polidas e glazeadas obtidas por perfilometria óptica digital encontram-se na Figura 8.

Nas imagens de perfilometria observam-se a presença e profundidade (ou altura) de vales em azul, e de picos em vermelho. Os dois materiais apresentaram a mesma aparência 2D e 3D para os diferentes tratamentos de superfície analisados. Ambas cerâmicas polidas apresentaram os padrões de sulcos e vales característicos das ranhuras resultantes do polimento (Figuras 8A, 8B, 8E e 8F). As imagens das cerâmicas glazeadas apresentaram as “ilhas” de acúmulo de *glaze* também verificadas em microscopia eletrônica de varredura (Figuras 8C, 8D, 8G e 8H).

Figura 7 - Imagens de perfilometria das cerâmicas polidas e glazeadas



Legenda: Coluna esquerda: imagem 2D; Coluna direita: imagem 3D. a-b) VMII polida; c-d) VMII glazeada; e-f) VM9 polida; g-h) VM9 glazeada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou avaliar a influência das técnicas de obtenção de cerâmicas feldspáticas, estratificação ou usinagem, e dos tratamentos de finalização da superfície deste material, polimento ou aplicação de *glaze*, na rugosidade e energia livre de superfície, formação de biofilme e viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos FMM-1. Visando melhorar as propriedades do material, as cerâmicas são submetidas a estes tratamentos para obtenção de superfícies mais lisas, uma vez que a baixa rugosidade superficial está associada a maior estética e conforto ao paciente e melhora de aspectos biológicos (Kawai et al., 2000; Yilmaz et al., 2008).

A rugosidade das cerâmicas feldspáticas avaliadas foi influenciada pela interação dos fatores tratamento de superfície e material, assim como observado por Han et al. (2014). No que diz respeito a amplitude média de perfil (parâmetro R_a), os menores valores foram obtidos para as superfícies que receberam polimento. Ao contrário do que foi observado por Sarikaya e Guler (2010), a rugosidade de amostras polidas não variou entre os materiais avaliados neste estudo. A aplicação de *glaze* resultou em perfil de amplitude média mais alta para a cerâmica estratificada (VM9) em comparação com a cerâmica em bloco para CAD/CAM (VMII). Sarikaya e Guler (2010) verificaram aumento da rugosidade média (diferença numérica) da aplicação de *glaze* sobre VMII em comparação com algumas técnicas de polimento para este material, e os autores concluíram que as técnicas de polimento avaliadas foram semelhantes entre si devido a alta dureza destes blocos.

A interação entre material e superfície também influenciou os dados de espaçamento médio entre os elementos do perfil. Para o parâmetro R_{Sm} , amostras polidas apresentaram menor distância média entre picos e vales, com valores

semelhantes às amostras de cerâmica estratificada (VM9) glazeada. Em comparação com o polimento, a aplicação de *glaze* resultou em uma superfície com maior espaçamento de detalhes para a cerâmica em blocos (VMII).

Alguns estudos verificaram que o glazeamento é a melhor alternativa para obtenção de superfícies lisas em porcelanas (Barghi, Draugh, 1976; Sulik, Plekavich, 1981; Raimondo et al., 1996; Partterson et al., 1992). Porém, não todos os estudos que relatam menor rugosidade para superfícies glazeadas e, na maioria dos casos, recomenda-se o uso do polimento utilizando pastas específicas com partículas abrasivas para obtenção de superfícies mais uniformes (Klausner et al., 1982, Newitter et al., 1982, Patterson et al., 1992; Jagger, Harrison, 1994; Kelly et al., 1996; Al-Wahadni, Martin, 1998; Jung, 2002; Sarac et al., 2006; Oliveira et al., 2006)

Assim, o sistema de brocas da Shofu (utilizado neste estudo) é um sistema de polimento de 3 passos com pontas de silicone de Carbetto de silício (SiC) impregnadas de abrasivos. A eficácia deste sistema deve-se ao formato arredondado do diamante impregnado sobre o SiC que é menos agressivo para as superfícies e mais eficientes para obtenção de superfícies lisas (Han et al., 2014). Nem todos os sistemas de polimento são tão efetivos como este, alguns sistemas de polimento apresentam partículas abrasivas, como Al_2O_3 , que possuem formato afilado, agredem mais as superfícies e podem resultar em ranhuras profundas e irregulares. Recomenda-se, ainda, o uso dos sistemas de polimento associados a pastas específicas de polimento para produzir superfícies ainda mais lisas (Jung, 2002; Bottino et al., 2006).

A utilização do glaze não é uma exigência dos fabricantes, mas sim uma alternativa ao polimento e acabamento manual. O glazeamento é realizado com a aplicação de uma fina camada da pasta de cerâmica de cobertura de baixa temperatura de fusão sobre a peça cerâmica, seguida por sinterização em

temperatura inferior à da queima da cerâmica (Aksoy et al., 2006; Pereira et al., 2008).

O glaze utilizado neste estudo, apresentado em *spray*, é composto por mistura do pó cerâmico líquido, gás metil-propano (25-100%) e etanol (2,5-10%) (VITA, 2015). Ao ser pulverizada, as micropartículas de pó cerâmico são depositadas sobre a superfície cerâmica, mas a distribuição do material depende da distância, da pressão e do tempo de aplicação. A camada de glaze é identificada como uma camada uniforme de pó branco sobre a superfície que deve ser sinterizada em seguida (VITA, 2015). Em teoria, a aplicação do *glaze* deveria preencher as irregularidades da superfície por se tratar de um material inicialmente líquido. Mas as superfícies glazeadas não resultaram em superfícies planas e lisas, e sim em superfícies onduladas e com numerosas irregularidades devido a não homogeneidade da aplicação e aos espaços vazios entre a superfície das cerâmicas (Kawai et al., 2000).

Neste estudo, a análise topográfica realizada com MEV apresentou correspondência aos resultados das imagens 2D e 3D do perfilômetro óptico. As superfícies polidas apresentaram finos riscos, resultantes do desgaste do polimento e as superfícies glazeadas apresentaram maiores irregularidades da distribuição do *glaze*, que se acumulou em “ilhas” sobre os materiais.

Existem poucos estudos sobre a técnica de aplicação de *glaze* em *spray* em cerâmicas feldspáticas e sobre a interação entre estes *glazes* e o material e seu consequente desempenho na cavidade oral. Um estudo anterior (Carrabba et al., 2016) verificou que o *glaze* em *spray* resultou em maior rugosidade que a versão em pasta, mas com brilho semelhante.

Assim como a rugosidade, a energia livre de superfície (ELS) é outro fator importante no processo de aderência bacteriana (Quirynen et al., 1995; Bolln et al., 1997; Brentel et al., 2011; Anami et al., 2012). A ELS permite avaliar as propriedades e interação termodinâmica da primeira camada de uma superfície

mediante o estudo das forças de adesão e coesão e a capacidade de molhamento dos materiais (Busscher, Van der Mei, 1997; Sipahi et al., 2001; Pereira-Cenci et al., 2008). Trata-se da somatória dos componentes polar e dispersivo (apolar) das análises da goniometria.

Apesar do material cerâmico não ter influenciado a ELS, o tratamento de superfície foi significativo e as cerâmicas polidas obtiveram maior energia livre de superfície. Porém, o componente polar foi maior que o componente dispersivo, o que em teoria significa uma maior interação imediata com as moléculas polares presentes nos fluidos biológicos.

Vários estudos relatam que a aderência bacteriana é menor em superfícies com baixa ELS, isto é, em superfícies hidrofóbicas (Quirynen, Bollen, 1995; Teughels et al., 2006; Akesso et al., 2009; Yoshinari et al., 2000). Assim, superfícies com alta ELS são mais favoráveis para a formação de biofilme devido a sua maior propriedade hidrofílica (Teughel et al., 2006; Subramani et al., 2009).

Mas resultados contraditórios têm sido obtidos, incluindo maior aderência de micro-organismos em superfícies hidrofóbicas (Klotz et al., 1985; Burgers et al., 2010) e resultados divergentes nos quais não se observou relação significativa entre ELS e aderência microbiana (Mabboux et al., 2004; Hahnel et al., 2009, Pereira-Cenci et al., 2007). Os estudos *in-vitro* contam com limitações que devem ser consideradas, como a formação da película adquirida na cavidade bucal que é composta por proteínas e glicoproteínas da saliva. Alguns investigadores sugerem que as propriedades de superfície dos materiais são transferidas mesmo através da película adquirida (Pratt-Terpstra et al., 1987; Sipahi et al., 2001).

De acordo com Minagi et al. (1985), quanto mais próximas as ELS do material e do micro-organismo, maior é a probabilidade de aderência. Indícios sugerem que a presença de lipossacarídeos na superfície celular de bactérias Gram-negativas como *mutans* e *sanguinis* tende a tornar a célula bacteriana mais hidrofílica (Araujo et al., 2010).

Outros estudos demonstraram que a ELS tem um importante papel nas fases iniciais de adesão da *C. albicans*, sendo que os substratos com níveis elevados de ELS induzem a uma maior aderência de *C. albicans* (Minagi et al., 1985; Sipahi et al., 2001). Assim, materiais restauradores de superfície hidrofílica podem reduzir a aderência de *C. albicans* uma vez que suas hifas (estrutura celular que tem função de aderência e penetração do fungo) são relativamente hidrofóbicas (Yoshijima et al., 2010).

O presente estudo não pode correlacionar aderência bacteriana com ELS, devido ao fato de que os grupos testados não apresentaram diferença significantes com relação a UFC dos *Streptococcus* mesmo entre as superfícies que apresentaram diferenças na ELS. Mas em relação a *C. albicans*, onde o fungo teve maior número de UFC em superfícies glazeadas, os resultados de rugosidade, ELS e UFC foram compatíveis: as superfícies com *glaze* apresentaram-se mais rugosas, com menor ELS e maior aderência de *C. albicans* em comparação com as superfícies polidas. Hahnel et al. (2009) não conseguiram correlacionar estes dados.

Al-Marzok e Azzawi (2009), Aykent et al. (2010) e Anami et al. (2012) encontraram correlação positiva entre a rugosidade do material e a quantidade de bactérias aderidas. Sabe-se que valores de Ra menores de 0,2 μm podem diminuir a capacidade de colonização bacteriana, uma vez que os micro-organismos são maiores e sua aderência não dependeria mais da rugosidade (Quirynen et al., 1996; Bollen et al., 1997; Borchers et al., 1999). Por outro lado, superfícies rugosas oferecem proteção física às bactérias, assim como área de contato aumentada para a aderência bacteriana (Bollen et al., 1997). Neste estudo a média de rugosidade das cerâmicas polidas foi de 0,3 μm , o que provavelmente dificultou a aderência da *C. albicans*, que mede entre 2 a 6 μm (Goldman, Schafer, 2012). Talvez isto tenha motivado o baixo número de UFC da *C. albicans* que se formou sobre as amostras polidas e provavelmente se desprende da superfície

dos espécimes durante a lavagem, uma vez que a presença de *C. albicans* pode ser verificada por MEV.

Além da interação dos micro-organismos com o material restaurador, as características de cada micro-organismo e a forma como se inter-relacionam são importantes para compreensão da constituição do biofilme. Pereira et al. (2011) verificou redução do crescimento em UFC/mL de *C. albicans* associada com *S. mutans*, demonstrando que a interação entre estas espécies pode ser desfavorável para a *C. albicans*. Porém outros estudos afirmam que esta combinação de biofilme heterotípico é favorável para ambos micro-organismos, incrementando o potencial de infecção e resistência do biofilme (Calderone, 2004; Vylkova et al., 2014; Xu et al., 2014).

A análise da viabilidade celular demonstrou que todos os grupos apresentaram ausência de citotoxicidade no período de 24 h, mas após 7 dias tornaram-se leve a moderadamente citotóxicos. Nas primeiras horas, após o período inicial de adaptação, os fibroblastos aumentam a proliferação celular sobre as cerâmicas dentárias (Kantonasaki et al., 2008; Tete et al., 2014).

O tratamento de superfície e o tempo tiveram influência sobre viabilidade celular dos fibroblastos. No período de 24 h as cerâmicas glazeadas apresentaram maior viabilidade celular *in-vitro* no teste de MTT em comparação com as polidas. A viabilidade celular das amostras glazeadas, superior ao controle neste período inicial, representa uma boa relação inicial entre material e células (Zizari et al., 2013; Tete et al., 2014). Após 7 dias, a viabilidade celular foi reduzida, mas semelhante independente do tratamento de superfície.

De acordo com o teste MTT, a quantidade de cristais de Formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis ao redor das amostras. Este teste MTT apresentou valores decrescentes de viabilidade na ordem 24 h glazeadas > 24 h polidas > 7 dias polida = 7 dias glazeada. As micrografias de MEV mostram maior crescimento celular sobre amostras glazeadas após 7 dias

(Figura 6 D, 6H) em comparação com as polidas (Figura 6 B, 6F), o que pode ser justificado pelo fato de que os fibroblastos apresentam boa afinidade às superfícies rugosas (amostras glazeadas, maior Ra e maior RSm), por se ancorarem melhor e proliferarem mais. No entanto, essa proliferação excessiva representada pela disposição destas células em multicamadas pode culminar na morte celular, não por citotoxicidade do material, mas por falta de nutrientes ou de espaço para crescimento.

Neste sentido, as imagens de MEV podem gerar alguma confusão de interpretação. Primeiramente é importante considerar que a área de avaliação do MEV em um aumento de 3000X é bastante restrita proporcionalmente ao tamanho da amostra e por este motivo as micrografias não devem ser utilizadas para quantificação, mas para análise da relação entre células e topografia do material. Ainda neste sentido, a metodologia de teste MTT utilizada realizou a quantificação de células viáveis presentes no líquido sobrenadante onde a amostra esteve em contato com os fibroblastos, enquanto o MEV apresenta células (viáveis ou não viáveis) sobre a superfície do material.

A integridade das células fibroblásticas é importante para a saúde do tecido peri-implantar ao redor de restaurações protéticas, já que estas células se encarregam da manutenção do tecido e oferecem uma vedação que serve como barreira protetora (Linkevicius, Apse, 2008; Furuhashi et al., 2012). A viabilidade celular reduzida no período de 7 dias pode não estar associada à liberação de produtos tóxicos das cerâmicas, pode se tratar de uma reação a topografia superficial destes materiais (Bagambisa et al., 1994; Sabailauskas et al., 2011). As reações sobre o alinhamento celular e orientação em resposta a superfície dos materiais não são totalmente entendidos. É evidente que a profundidade de ranhuras e a sua periodicidade influenciam no comportamento migratório e de proliferação das células (Chehroudi et al., 1991; Furuhashi et al., 2012).

A citotoxicidade das cerâmicas feldspáticas tende a ter baixa efeito de toxicidade inicial em fibroblastos (Takano et al., 2002; Sabailuskas et al., 2011) assim como ocorrido no presente estudo, visto que os íons Al^{+3} e K^{+} liberados na degradação das cerâmicas feldspáticas são os menos citotóxicos (Elshahawy et al., 2009).

Um estudo anterior sobre materiais implantáveis, sua ELS e interação com células fibroblásticas, concluiu que materiais com maior ELS e maior componente polar produziram maior densidade de células e mais baixa produção de citosinas inflamatórias, e que o contrário acontecia com o material de baixa ELS (Pesskova et al., 2007). No presente estudo, para o período de avaliação inicial, ocorreu o contrário; as cerâmicas com maior ELS e maior componente polar (polidas) apresentaram menor crescimento celular.

Ainda neste sentido, apesar de existir um patamar de rugosidade mais adequado para a obtenção de um tecido estável e boa vedação peri-implantar ($\text{Ra} = 0,2 \mu\text{m}$) (Quirynen et al., 1993; Bollen et al., 1997), as células fibroblásticas aparentemente apresentam maior proliferação sobre superfícies mais ásperas (Mustafa et al., 1998, 2008).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, concluiu-se que:

- a) O tratamento de superfície por polimento resultou nos menores valores Ra e RSm de rugosidade superficial para as cerâmicas VMII e VM9;
- b) A técnica de confecção da cerâmica não influenciou a energia livre de superfície (ELS); cerâmicas feldspáticas polidas apresentaram maior ELS;
- c) A aderência de *S. mutans* e *S. sanguinis* foi similar e superior entre as duas cerâmicas e os dois tratamentos de superfície avaliados. Sobre cerâmicas polidas aderiu menos *C. albicans*;
- d) A técnica de confecção da cerâmica não influenciou na viabilidade celular ao crescimento de fibroblastos gengivais humanos FMM-1. O maior crescimento celular foi observado para cerâmicas glazeadas no período de 24 h. Após 7 dias, aplicação de *glaze* e polimento reduziram significativamente o crescimento celular.

REFERÊNCIAS*

Agra CM, Vieira GF. Quantitative analysis of dental porcelain surfaces following different treatments: correlation between parameters obtained by a surface profiling instrument. *Dent Mater J*. 2002;21(1):44-52.

Akesso L, Pettitt ME, Callow JA, Callow ME, Stallard J, Teer D, et al. The potential of nano-structured silicon oxide type coatings deposited by PACVD for control of aquatic biofouling. *Biofouling*. 2009;25(1):55-67. doi:10.1080/08927010802444275

Aksoy G, Polat H, Polat M, Coskun G. Effect of various treatment and glazing (coating) techniques on the roughness and wettability of ceramic dental restorative surfaces. *Format: AbstractSend to Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;53(2):254-9.

Al-Marzok M I, Al-Azzawi H J. The effect of the surface roughness of porcelain on the adhesion of oral *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2009;10:1–7.

Al-Wahadni A, Martin DM. Glazing and finishing dental porcelain: a literature review. *J Can Dent Assoc*. 1998;64(8):580-3.

Anami LC, Pereira CA, Guerra E, Assuncao e Souza RO, Jorge AO, Bottino MA. Morphology and bacterial colonisation of tooth/ceramic restoration interface after different cement excess removal techniques. *J Dent* 2012;40(9):742-9.

Anusavice KJ. *Phillips Materiais Dentários*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2013. 572 p.

Araújo A, Andrade N, Carvalho A, Ramos A, Sá Silva C. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quim. Nova*. 2010;33(9):1940-8

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

Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994;52(1):52-6.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Barizon KT, Bergeron C, Vargas MA, Qian F, Cobb DS, Gratton DG, et al. Ceramic materials for porcelain veneers: part II. Effect of material, shade, and thickness on translucency. *J Prosthet Dent*. 2014;112(4):864-70. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.05.016.

Barghi AL, Draugh RA. When to glaze an electron microscope study. *J Prosthet Dent*. 1976;35(6):648-6.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1001-9.

Bollen CM, 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;13(4):258-69.

Borchers F, Tavassol H, schernitschek T. Surface quality achieved by polishing and by varnishing of temporary crown and fixed partial denture resins. *J Prosthet Dent*. 1999;82(5):550-6.

Brentel AS¹, Kantorski KZ, Valandro LF, Fúcio SB, Puppini-Rontani RM, Bottino MA. Confocal laser microscopic analysis of biofilm on newer feldspar ceramic. *Oper Dent*. 2011;36(1):43-51. doi: 10.2341/10-093-LR.

Bottino MC, Valandro LF, Kantorski KZ, Bressiani C, Bottino MA. Polishing methods of an alumina-reinforced feldspar ceramic. *Braz Dent J*. 2006;17(4):285-9.

Burgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(2):156-64.

Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res*. 2010 Jul;89(7):657-65. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01815.x.

Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):24-32.

Calderone R. The 7th Conference on Candida and Candidiasis, Austin, Texas,

USA, March 18-22, 2004. FEMS yeast research. 2004;4(8):885-6.

Carrabba M, Vichi A, Vultaggio G, Pallari S, Paravina R, Ferrari M. Effect of Finishing and Polishing on the Surface Roughness and Gloss of Feldspathic Ceramic for Chairside CAD/CAM Systems. *Oper Dent*. 2016 Oct 10. doi:10.2341/15-174-L[Epub ahead of print] PubMed PMID: 27723423.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000;68(7):4018-23.

Cesar PF, Yoshimura HN, Miranda Junior WG, Okada CY. Correlation between fracture toughness and leucite content in dental porcelains. *J Dent*. 2005;33(9):721-9.

Chehroudi B, Gould T R, Brunette D M. A light and electron microscopic study of the effects of surface topography on the behavior of cells attached to titanium-coated percutaneous implants. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(3):387-405.

Choi YS, Kim SH, Lee JB, Han JS, Yeo IS. In vitro evaluation of fracture strength of zirconia restoration veneered with various ceramic materials. *J Adv Prosthodont*. 2012;4(3):162-9. doi: 10.4047/jap.2012.4.3.162.

Conceição EN. *Dentística: saúde e estética*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2007.

De Lorenzo JL. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.

Della Bona A. *Adesão às cerâmicas: evidências científicas para o uso*. São Paulo: Artes Médicas; 2009.

Della Bona A. Ceramic: development and technology. *RFO UPF*. 1996;1(1):13-23.

Donnelly TJ, Burke FJ. In vitro failure of crowns produced by two CAD/CAM systems. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2011;19(3):111-6.

Elshahawy WM, Watanabe I, Kramer P. In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent Mater*. 2009;25(12):1551-5. doi: 10.1016/j.dental.2009.07.008.

Flury S, Peutzfeldt A, Lussi A. Influence of surface roughness on mechanical properties of two computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) ceramic materials. *Oper Dent*. 2012;37(6):617-24. doi: 10.2341/11-391-L.

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 5. ed. New Jersey: Wiley-Liss, Wiley; 2005.

Furuhashi A, Ayukawa Y, Atsuta I, Okawachi H, Koyano K. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. *Odontology*. 2012;100(2):199-205. doi:10.1007/s10266-011-0029-y

Goldman L, Schafer A, Goldman's Cecil medicine [internet] 24 ed. Philadelphia: Elsevier; 2012. [acesso em 2016 nov 18]. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=cc6GBAAQBAJ&pg=PT84&dq=Goldman,+L.,+Schafer,+A.+Goldman%27s+Cecil+medicine&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwj178iT0L_QAhVLEpQKHQzYBPQQ6AEISzAD#v=onepage&q=Goldman%2C%20L.%2C%20Schafer%2C%20A.%20Goldman's%20Cecil%20medicine&f=false

Gryte KF, Hansen F. Surface modification of EPDM rubber by plasma treatment. *Langmuir*. 2006;22(14):6109-24.

Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. *Dent Mater*. 2009;25(8):969-75. doi: 10.1016/j.dental.2009.02.003.

Han GJ, Kim JH, Lee M, Chae S Y, Lee YH, Cho BH. Performance of a novel polishing rubber wheel in improving surface roughness of feldspathic porcelain. *Dent Mater J*. 2014;33(6):739-48.

Hannig C, Hannig M. The oral cavity a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*. 2009 Jun;13(2):123-39. doi: 10.1007/s00784-008-0243-3.

Hauser-Gerspach I, Kulik EM, Weiger R, Decker EM, Von Ohle C, Meyer J. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials in vitro. *Dent Mater J*. 2007;26(3):361-6.

Internacional Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Genebra: Internacional Organization for Standardization;1999.

Jagger DC, Harrison A. An in vitro investigation into the wear effects of unglazed, glazed, and polished porcelain on human enamel. *J Prosthet Dent*. 1994;72(3):320-23.

Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral diseases*. 2004;10(2):106-12.

Jung M, Finishing and polishing of a hybrid composite and a heat-pressed glass ceramic. *Oper Dent*. 2002;27(2):175-83.

Kantorski KZ, Scotti R, Valandro LF, Bottino MA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Adherence of Streptococcus mutans to uncoated and saliva-coated glass-ceramics and composites. *Gen Dent*. 2008;56(7):740-7.

Kawai K, Urano M, Ebisu, S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent*. 2000;83(6):664-7.

Kelly JR, Nishimura I, Campbell SD. Ceramics in dentistry: historical roots and current perspectives. *J Prosthet Dent*. 1996;75(1):18-32.

Klausner LH, Cartwright CB, Charbeneau GT. Polished versus autoglazed porcelain surfaces. *J Prosthet Dent*. 1982; 47(2):157-62.

Klotz S, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of Candida species to plastic surfaces. *Infect Immun*. 1985;50(1):97-101.

Kontonasaki E, Kantiranis N, Papadopoulou L, Chatzistavrou X, Kavouras P, Zorba T, et al. Microstructural characterization and comparative evaluation of physical, mechanical and biological properties of three ceramics for metal-ceramic restorations. *Dent Mater*. 2008;24(10):1362-73. doi: 10.1016/j.dental.2008.03.002.

Kontonasaki E, Sivropoulou, PapadopoulouL, Garefis P, Paraskevopoulos K, Koidis P. Attachment and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts on bioactive glass modified ceramics. *J Oral Rehabil*. 2007;34(1):57-67. doi:10.1111/j.1365-2842.2006.01622.x.

Kononen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival

- fibroblasts on titanium. *Oral Health Prev Dent*. 1992;26(10):1325-41.
- Lebon N, Tapie L, Vennat E, Mawussi B. Influence of CAD/CAM tool and material on tool wear and roughness of dental prostheses after milling. *J Prosthet Dent*. 2015;114(2):236–47. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.12.021.
- Lean JW. *Dental Ceramics: Proceedings of the First International Symposium on Ceramics*: Quintessence Publishing Company; 1983.
- Linkevicius T, Aps P. Biologic width around implants. An evidence-based review. *Stomatologija*. 2008;10(1):27-35.
- Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier J-J, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials - an in vitro study. *Coll Surfs B: Biointerfaces*. 2004;39(4):199-205.
- Machado A. Avaliação da rugosidade em superfícies complexas [dissertação] Joinville: Sociedade Educacional De Santa Catarina Instituto Superior Tupy; 2009. [acesso em 2015 jun 02]. Disponível em: www.sociesc.org.br/download/?tipo=anx&count=1&id=12861.
- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun*. 1985;47(1):11-4.
- Wennerberg A, Arvidson K, Messelt EB, Haag P, Karlsson S. Influence of modifying and veneering the surface of ceramic abutments on cellular attachment and proliferation. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(11):1178-87. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01560.x.
- Mustafa K, Oden A, Wennerberg A, Hultenby K, Arvidson K. The influence of surface topography of ceramic abutments on the attachment and proliferation of human oral fibroblasts. *Biomaterials*. 2005;26(4):373-81. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.037
- Mustafa K, Silva Lopez B., Hultenby K, Wennerberg , Arvidson K. Attachment and proliferation of human oral fibroblasts to titanium surfaces blasted with TiO₂ particles. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*; 1998;9(3), 195-207.
- Nakamura T, Wakabayashi K, Kawamura Y, Kinuta S, Mutobe Y, Yatani H. Analysis of internal defects in all-ceramic crowns using micro-focus X-ray computed tomography. *Dent Mater J*. 2007;26(4):598-601.

Newitter DA, Schlissel ER, Wolff MS. An evaluation of adjustment and postadjustment finishing techniques on the surface of porcelain-bonded-to-metal crowns. *J Prosthet Dent*. 1982;48(4):388-95.

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and molecular biology reviews*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(3):407-50. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.

Olivera AB, Matson E, Marques M M. The effect of glazed and polished ceramics on human enamel wear. *Int J Prosthodont*. 2006;19(6):547-8.

Owens DK , Owens WR. Estimation of the surface free energy of polimers. *J Appl Polym Sci*. 1969;13(8):1741-7.

Patterson CJ, Lundie AC, Stirrups DR, Taylor W. Efficacy of a porcelain refinishing system in restoring surface finish after grinding with fine and extra-fine diamond burs. *J Prosthet Dent*. 1992;68(3):402-6.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):341-8. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3.

Pereira-Cenci T, Deng DM, Kraneveld EA, Manders EM, Del Bel Cury AA, Ten Cate JM, et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol*. 2008;53(8):755-64.

Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC, In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007;20(3):308-10.

Pereira SM, Kantorski K, Brentel A, Valandro LP, Bottino M. SEM analysis of the in situ early bacterial colonization on two novel feldspathic ceramics submitted to different types of glazing. *The J Contemp Dent Pract*. 2008;9(2):1-7.

Pesskova V, Kubies D, Hulejova H, Himmlova L. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(3):465-73. doi:10.1007/s10856-007-2006-0

Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *J Gen Microbiol.* 1987;133(11):3199-206. doi:10.1099/00221287-133-11-3199

Quinn GD, Hoffman K, Quinn JB. Strength and fracture origins of a feldspathic porcelain. *Dent Mater.* 2012;28(5):502-11. doi: 10.1016/j.dental.2011.12.005.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clinical oral implants research.* 2002 *Clin Oral Implants Res.*13(1):1-19.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ ,Weerkamp A H, Dariu P, et al. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodonto.* 1990;17(3):138–44

Quirynen M, Bollen, CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(1):1-14.

Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch I, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res.* 1993;72(9):1304-9.

Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.*1996; (11)169–78.

Raffaelli L, Rossi Iommetti P, Piccioni E, Toesca A, Serini S, Resci F, et al. Growth, viability, adhesion potential, and fibronectin expression in fibroblasts cultured on zirconia or feldspathic ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2008.15;86(4):959-68.

Raimondo RL, Richardson JT, Wiedner B. Polished versus autoglazed dental porcelain. *J Prosthet Dent.* 1990;64(5):553-7.

Rashid H. The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: A review of literature. *Eur J Dent.* 2014;8(4):571-9. doi: 10.4103/1305-7456.143646.

Rueda AO, Anglada M, Jimenez-Pique E. Contact fatigue of veneer feldspathic porcelain on dental zirconia. *Dent Mater.* 2015;31(3):217-24. doi: 10.1016/j.dental.2014.12.006.

Sabaliauskas V, Juciute R, Bukelskiene V, Rutkunas V, Trumpaite-Vanagiene R, Puriene A. In vitro evaluation of cytotoxicity of permanent prosthetic materials. *Stomatologija.* 2011;13(3):75-80.

Sakaguchi RL, Powers JM. *Craig`s materiais dentários restauradores*:13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 432 p.

Sarac D, Sarac YS, Yuzbasioglu E, Bal S. The effects of porcelain polishing systems on the color and surface texture of feldspathic porcelain. *J Prosthet Dent.* 2006;96(2):122-128. doi:10.1016/j.prosdent.2006.05.009

Sarikaya I, Guler AU. Effects of different polishing techniques on the surface roughness of dental porcelains. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(1):10-6. doi: 10.1016/j.dental.2014.12.006.

Schmitter M, Mueller D, Rues S. Chipping behaviour of all-ceramic crowns with zirconia framework and CAD/CAM manufactured veneer. *J Dent.* 2012;40(2):154-62. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.007.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent.* 2004;32(8):667-78.

Sinmazisik G, Ovecoglu ML. Physical properties and microstructural characterization of dental porcelains mixed with distilled water and modeling liquid. *Dent Mater.* 2006;22(8):735-45.

Sinthuprasirt P, van Noort R, Moorehead R, Pollington S. Evaluation of a novel multiple phase veneering ceramic. *Dent Mater.* 2015;31(4):443-52. doi: 10.1016/j.dental.2015.01.012.

Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent.* 2001;29(3):197-204.

Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent.* 2000;84(2):229-36.

Stinson MW, Alder S, Kumar S. Invasion and killing of human endothelial cells by viridans group streptococci. *Infect Immun*. 2003;71(5):2365-72.

Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24(4):616-26.

Sulik WD, Plekavich EJ. Surface finishing of dental porcelain. *J Prosthet Dent*. 1981;46(2):217-221.

Takano Y, Taguchi T, Suzuki I, Balis JU, Yuri K. Cytotoxicity of heavy metals on primary cultured alveolar type II cells. *Environ Res*. 2002; 89(2):138-145.

Takatsuka T, Konishi N, Nakabo N, Hashimoto T, Torii Y, Yoshiyama M. Adhesion in vitro of oral streptococci to porcelain, composite resin cement and human enamel. *Dent Mater J*. 2000; 19(4):363-72.

Tete S, Zizzari VL, Borelli B, De Colli M, Zara S, Sorrentino R, et al. Proliferation and adhesion capability of human gingival fibroblasts onto zirconia, lithium disilicate and feldspathic veneering ceramic in vitro. *Dent Mater J*. 2014;33(1):7-15.

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17 (Suppl 2):68-81.

Tholt B, Miranda-Júnior WG, Prioli R, Thompson J, Oda M. Surface Roughness in Ceramics with Different Finishing Techniques Using Atomic Force Microscope and Profilometer. *Oper Dent*. 2006;31(4):442-9.

Tsetsekou A, Papadopoulos T, Adamopoulos O. Microstructure effect on the properties of a commercial low-fusing dental porcelain. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(4):407-16.

Uo M, Sjogren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater*. 2003;19(6):487-92.

Valandro LF, Bottino MA. Cimentação adesiva de restaurações cerâmicas. In: Bottino MA, Faria R, Valandro LF. São Paulo: Artes Médicas; 2009 cap. 7.

Vieira A C, Oliveira MC, Lima EM Rambob I, Leite M. Evaluation of the

surface roughness in dental ceramics submitted to different finishing and polishing methods. *J Indian Prosthodont Soc.* 2013;13(3):290-5. doi: 10.1007/s13191-013-0261-y.

Vita. VM 9: instruções de processamento [internet]. Bad Säckingen · Germany: VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co.KG; 2014a. [acesso em 2016 mar 02]; [aproximadamente 35 p.] Disponível em: https://mam.vita-zahnfabrik.com/portal/ecms_mdb_download.php?id=37330&sprache=pt&fallback=de&cls_session_id=&neuste_version=1

Vita. VITABLOCS® for CEREC®/inLab [internet]. Bad Säckingen · Germany: VITA Zahnfabrik H. Rauter GmbH & Co.KG; 2014b. [acesso em 2016 mar 02]; [aproximadamente 60 p.] Disponível em: http://vitanorthamerica.com/wp-content/uploads/2012/06/VITABLOCS-for-CEREC_inLab-Working-Instructions_1455E.pdf

Vita. Ficha de dados de segurança [internet]. Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha: Vita; 2015. [acesso em 10 Nov 2016]; [aproximadamente 7 p.]. Disponível em: <https://www.vita-zahnfabrik.com/es/VITA-AKZENT-Plus-24673,27568.html>

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *M Bio.* 2011;2(3):55-11. doi: 10.1128/mBio.00055-11.

Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000;15(3):331-44.

Wessel SW, Chen Y, Maitra A, van den Heuvel ER, Slomp AM, Busscher HJ, et al. Adhesion forces and composition of planktonic and adhering oral microbiomes. *J Dent Res.* 2014;93(1):84-8. doi: 10.1177/0022034513511822.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(20):2941-53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

Winkler C, Schafer L, Felthaus O, Allerdings J, Hahnel S, Behr M, et al. The bacterial adhesion on and the cytotoxicity of various dental cements used for implant-supported fixed restorations. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(4):241-50. doi: 10.3109/00016357.2013.828320.

Wu S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. *J Polym Sci. Part*

C. 1972; 1(34):19–30.

Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of Streptococcus-Candida interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(3):99-116.

Yamano S, Ma AK, Shanti RM, Kim SW, Wada K, Sukotjo C. The influence of different implant materials on human gingival fibroblast morphology, proliferation, and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(6):1247-55.

Yilmaz C, Korkmaz T, Demirkoprulu H, Ergun G, Ozkan Y. Color stability of glazed and polished dental porcelains. *J Prosthodont*. 2008;17(1):20-4. doi:10.1111/j.1532-849X.2007.00237.x

Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal Candida. *Mycoses*. 2010; 53(3):221-6. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01694.x

Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K, Hirayama A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52(2): 388-94.

Zizzari V, Borelli B, De Colli M, Tumedei M, Di Iorio D, Zara S, et al. SEM evaluation of human gingival fibroblasts growth onto CAD/CAM zirconia and veneering ceramic for zirconia. *Ann Stomatol*. 2013;4(3-4):244-9.

APÊNDICE A - Valores de Viabilidade celular através do teste MTT no período de 24 horas e de 7 dias

Tabela 11 - Valores de viabilidade celular através do teste MTT no período de 24 horas

MTT 24h	VMII		VM9		Controle
	Polida	Glazeada	Polida	Glazeada	
Poço 1	0,087	0,145	0,096	0,155	0,093
Poço 2	0,085	0,143	0,098	0,161	0,093
Poço 3	0,069	0,097	0,092	0,101	0,090
Poço 4	0,081	0,179	0,099	0,172	0,105
Poço 5	0,081	0,179	0,098	0,170	0,107
Poço 6	0,080	0,091	0,063	0,140	0,096
Poço 7	0,074	0,152	0,079	0,147	0,090
Poço 8	0,076	0,156	0,080	0,15	0,092
Poço 9	0,074	0,109	0,079	0,127	0,057
Média	0,0785	0,139	0,087	0,147	0,0914
%	85,91%	152%	95,26%	160,75%	100%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 - Valores percentuais de viabilidade celular através do teste MTT no período de 7 dias

MTT 7 dias	VMII		VM9		Controle
	Polida	Glazeada	Polida	Glazeada	
Poço 1	0,075	0,058	0,059	0,064	0,113
Poço 2	0,076	0,057	0,059	0,063	0,110
Poço 3	0,072	0,056	0,052	0,060	0,104
Poço 4	0,070	0,058	0,067	0,071	0,095
Poço 5	0,076	0,056	0,067	0,078	0,100
Poço 6	0,081	0,058	0,060	0,075	0,092
Poço 7	0,080	0,072	0,067	0,063	0,061
Poço 8	0,072	0,070	0,069	0,062	0,059
Poço 9	0,078	0,061	0,067	0,062	0,056
Média	0,075	0,061	0,063	0,066	0,088
%	86,07%	69,11%	71,77%	75,69%	100%

Fonte: Elaborado pelo autor.