



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

AMANDA MARIA DE OLIVEIRA DAL PIVA

**FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* E VIABILIDADE
DE FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS (FMM-1) EM
NOVOS MATERIAIS CERÂMICOS**

2017

AMANDA MARIA DE OLIVEIRA DAL PIVA

**FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* E VIABILIDADE DE
FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS (FMM-1) EM NOVOS
MATERIAIS CERÂMICOS**

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: Prof^a. Dr^a. 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).

Dal Piva, Amanda Maria de Oliveira

Formação de biofilme in vitro e viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) em novos materiais cerâmicos / Amanda Maria de Oliveira Dal Piva. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
85 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. Cerâmica. 2. Aderência bacteriana. 3. Microscopia. 4. Teste de materiais. I. Bottino, Marco Antonio, orient. II. Anami, Lilian Costa, 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

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Rodrigo Othávio de Assunção e Souza

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Adj. Rubens Nisie Tango

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de janeiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que me concedeu o dom da vida, condições para execução de todas as minhas obrigações e as oportunidades que me chegaram até hoje.

Também dedico o meu título de mestre à minha mãe querida que sempre me deseja o melhor, uma pessoa tão maravilhosa que a cada dia me inspira a ser uma mulher melhor. Ao meu pai, meu guia, que mais do que ninguém torce pelo meu sucesso e felicidade. Dedico também às minhas irmãs maravilhosas que cada uma de um jeito diferente surpreende as outras com suas vitórias. Este trabalho é dedicado a essas pessoas com muito amor e saudade. Por fim, dedico com muito carinho também à minha avó Avanda de Oliveira Evaristo, a primeira professora da família, e ao meu tio Roberto de Oliveira Evaristo, também mestre, que com muito carinho me inspirou, incentivou e orientou nesta escolha.

AGRADECIMENTOS

Início meus sinceros agradecimentos dizendo obrigada a Jesus, meu mestre e amigo. Obrigada por me ouvir, por me abençoar e proteger durante esta longa jornada. Obrigada pela minha saúde, paz e alegrias proporcionadas junto a este trabalho. Obrigada pela coragem e segurança que me ajudaram a crescer, pela proteção e paz espiritual.

Obrigada aos meus pais Vânia Maria de Oliveira e Clóvis Dal Piva. À mainha por todos os ensinamentos desde sempre. Mãe, sua paz e seu abraço foram importantíssimos para que eu chegasse até aqui. Obrigada pela confiança e por suas palavras cheias de amor. Obrigada paiinho por toda ajuda e apoio, pela confiança depositada em mim. Suas palavras de segurança sempre me fizeram sentir mais forte e decidida em relação ao meu sonho. Espero um dia conseguir retribuir todo o carinho que sinto dos senhores.

Maria Marchand Dal Piva, Alice Maria de Oliveira Dal Piva e Ana Eliza de Oliveira Dal Piva, irmãs maravilhosas, muito obrigada por todo o carinho, ajuda, conselhos, dicas e risadas. Nós somos um quarteto superpoderoso. Eu amo demais vocês e sequer consigo me imaginar sem um pouco da nossa amizade e cumplicidade.

Obrigada a todas minhas tias e meus tios, e um obrigada especial para minha avó, Avanda de Oliveira Evaristo, pela torcida, orações e amor.

Gostaria de agradecer aos colegas de graduação, pós-graduação e da vida pela ajuda, experiência e alegrias. Em especial, agradeço à Aline Barcellos, Karen Archangelo, Aline Firmino, Eliseo Chun, Patrícia Contreras, Larissa Marques, Aline Lins, Ronaldo Luís, Vinicius Anéas, Regina Villefort, pela parceria, dicas e boas risadas. A Felipe Ribeiro, por

toda ajuda, suporte e ensinamentos. E, à Thaís Paradella, Márcio Marques, Domingos Pontes, Sérgio Alves, Marco Alfredo, Fernando Fontes, Lilian Vilela, Bruno Tanaka, Ivan Oliveira e Sandra Cordeiro pelo suporte.

Gostaria de agradecer todos os trabalhos, amizades e frutos gerados pelo NEMOP sob orientação do professor Rodrigo Othávio de Assunção e Sousa, um grande professor, orientador e amigo.

Aos professores que conheci na UNESP e colaboraram com meu crescimento pessoal e intelectual. Em especial à Profa Renata Melo, Prof. Alexandre Borges, Prof. João Paulo Machado, Prof. Rubens Tango, Profa. Fernanda Campos e a Profa. Lilian Costa Anami, cuja coorientação foi de suma importância para que eu conseguisse alcançar muito mais que meus objetivos.

Quero agradecer também ao Prof. Titular Marco Antonio Bottino, por me receber na pós-graduação, por ter me proporcionado excelentes oportunidades e por ter me orientado em um trabalho rico com o qual sem dúvidas aprendi bastante.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte oferecido através de uma bolsa de mestrado com processo número 2015/13322-1.

Por fim, não posso deixar de fazer um agradecimento especial a João Paulo Mendes Tribst, meu melhor amigo, meu parceiro e companheiro que desde sua primeira aula se tornou minha inspiração, minha fonte de paz, segurança e amor. Obrigada por todo o carinho, apoio, conselhos e, por me amar.

*“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas
qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Cerâmicas.....	16
2.2 Polimento ou vitrificação	19
2.3 Biofilme.....	22
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Confecção dos corpos-de-prova	32
4.2 Caracterização da superfície dos materiais	34
4.2.1 Análise da rugosidade	34
4.2.2 Perfilometria	36
4.2.3 Análise da energia livre de superfície.....	36
4.3 Formação do biofilme	38
4.3.1 Esterilização e contaminação dos espécimes	38
4.3.2 Contagem de unidades formadoras de colônia.....	40
4.4 Avaliação da viabilidade de células fibroblásticas gengivais humanas (FMM-1) através do teste MTT	41
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.6 Análise dos Resultados.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Caracterização da superfície dos materiais	46
5.1.1 Análise da rugosidade	46
5.1.2 Perfilometria	49
5.1.3 Análise da energia livre de superfície.....	51

5.1.4 Contagem de unidades formadoras de colônia.....	52
5.1.5 Avaliação da viabilidade de células fibroblásticas gengivais humanas (FMM-1) através do teste MTT.....	54
5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE	84

Dal Piva AMO. Formação de biofilme *in vitro* e viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) em novos materiais cerâmicos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

Este estudo avaliou a morfologia superficial de duas cerâmicas recentemente lançadas no mercado, o crescimento de biofilme heterotípico e a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) em contato com estes materiais após vitrificação ou polimento. Para isto, foram confeccionados 46 blocos (4,5x4,5x1,5 mm) de cada cerâmica: zircônia parcialmente estabilizada por ítria com alta translucidez (HT) e silicato de lítio reforçado por zircônia (SUP). Os blocos foram sinterizados/cristalizados e as superfícies dos espécimes padronizadas com aplicação de *glaze* (subgrupos “g”). A rugosidade superficial (Ra e RSm) foi mensurada por rugosímetro de contato (n=20) e qualitativamente por perfilometria óptica (n=2). Após esterilização, os espécimes foram contaminados para a formação de biofilme com a associação de *S. mutans*, *S. sanguinis* e *C. albicans* no período de 16 h (n=8) e o biofilme formado foi quantificado através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e analisado por microscopia eletrônica de varredura. A viabilidade celular a fibroblastos FMM-1 foi avaliada através do teste MTT. Cinco amostras (15x15x1,5 mm) foram confeccionadas de forma semelhante e utilizadas para determinação da energia livre de superfície (ELS) através de goniometria. Em seguida, os espécimes não-destruídos (n=26) foram resubmetidos ao protocolo de lixamento e então, polidos conforme recomendação do fabricante para avaliação das superfícies polidas (subgrupos “p”) sob todas análises em estudo. Os dados de rugosidade foram avaliados através dos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis, Dunn e Mann-Whitney. Os dados de ELS, MTT e UFC foram avaliados por análise de variância e teste de Tukey, e os dados de MTT também foram submetidos ao teste t. Para todos os testes, foi considerado o valor de alfa = 95%. A rugosidade foi influenciada pelos materiais e tratamentos de superfícies avaliados (Ra $p < 0,001$; RSm $p = 0,0002$), sendo que a cerâmica HTg apresentou ranhuras, em média, mais altas e menos espaçadas que as demais. Os fatores material e superfície influenciaram a ELS ($p = 0,001$), todos os materiais apresentam comportamento hidrofílico, mas HTp apresentou a maior ELS. A interação dos fatores superfície e micro-organismo influenciou a UFC ($p = 0,00$), sendo que *Streptococcus* aderiu mais sobre superfícies glazeadas e *C. albicans* apresentou menor aderência para superfícies polidas. O teste MTT demonstrou citotoxicidade inicial (24 h) para as superfícies polidas, o que não se repetiu

após 7 dias de contato ($p=0,00$). A perfilometria evidenciou a morfologia superficial mais homogênea nas amostras polidas. Exceto para HTg, as imagens de MEV evidenciaram superfícies homogêneas e os espécimes contaminados apresentaram *Streptococcus* e *C. albicans*. Pode-se concluir que as superfícies glazeadas apresentam maior rugosidade e tendência a acumular biofilme. Superfícies polidas possuem elevada ELS, porém, citotoxicidade temporária.

Palavras-chave: Cerâmica. Aderência bacteriana. Microscopia. Teste de materiais.

Dal Piva AMO. In vitro biofilm formation and viability of human gingival fibroblasts (FMM-1) on new ceramic materials [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

*This study evaluated the morphology of two ceramic materials recently introduced on the market, as well as the formation of heterotypic biofilm and the viability of human gingival fibroblasts (FMM-1) in contact with these materials after glazing or polishing. For this, 46 blocks (4.5x4.5x1.5 mm) of each ceramic were made: high translucency zirconia partially stabilized by yttrium (HT) and lithium silicate reinforced by zirconium (SUP). The blocks were sintered/crystallized and surfaces were standardized with glaze application (subgroup “g”). The surface roughness (Ra and RSm) was evaluated through a contact rugosimeter (n=20) and qualitatively by profilometry (n=2). After sterilization, specimens were contaminated for heterotypic biofilm formation with association of *S. mutans*, *S. sanguinis* and *C. albicans* during 16 h of formation (n=8) and the biofilm was quantified by counting the colony forming units (CFU/mL) and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The viability of FMM-1 fibroblasts was evaluated by MTT assay. 5 samples (15x15x1.5 mm) were prepared in a similar way and used to determine the surface free energy (SFE) by goniometry. Then, the non-destroyed specimens (n=26) were resubmitted to the sandpaper polishing and finished as recommended by the manufacturer to evaluate the polished surfaces (subgroup “p”) under all analyzes in study. Roughness data was evaluated using the nonparametric Kruskal-Wallis, Dunn and Mann-Whitney tests. SFE, MTT and CFU results were evaluated by ANOVA and Tukey’s test, and MTT data was also submitted to t test. For all tests, it was considered an alfa value of 95%. Roughness was influenced by materials and surface treatments (Ra p=0,001; RSm p=0,0002). HTg ceramic presented, on average, higher and less spaced*

grooves than others. Both material and surface factors influenced the SFE ($p=0,001$), all materials presented hydrophilic behavior, however HTp presented higher SFE. The interaction of surface and micro-organism factors influenced the CFU ($p=0,00$), *Streptococcus* showed more adherence on glazed surfaces and *C. albicans* presented less adherence on polished surfaces. MTT assay demonstrated initial (24 h) cytotoxic behavior to polished surfaces, which was not repeated within the period of 7 days. The profilometry evidenced the more homogeneous surface morphology of polished samples. Except for HTg, the SEM images showed homogeneous surfaces, and on the contaminated specimens, it was observed the presence of *Streptococcus* and *C. albicans*. It could be concluded that glazed surfaces presented a greater roughness and tend to accumulate more biofilm. Polished surfaces present high SFE, however, are temporarily cytotoxic.

Keywords: Ceramics. Bacterial adhesion. Microscopy. Materials testing.

1 INTRODUÇÃO

As cerâmicas tornaram-se materiais de escolha para a confecção de próteses dentárias por apresentarem estética e resistência comprovadas em longo prazo. Devido a estes fatores, técnicas restauradoras tem evoluído bastante ao longo do tempo (Denry, Kelly, 2008).

As cerâmicas odontológicas apresentam excelentes propriedades mecânicas (Kosmac et al., 1999; Piconi, Maccauro, 1999; Kawai et al., 2011), estéticas (Denry, Kelly, 2008; Karataşlı et al., 2011), são biocompatíveis e apresentam estabilidade química (Piconi, Maccauro, 1999; Aboushelib et al., 2005; Teixeira et al., 2007) conferindo a este material, excelente desempenho clínico (Odman, Andersson, 2001; Layton, Walton, 2012).

As cerâmicas à base de zircônia (ZrO_2) estabilizadas por óxido de ítrio (Y_2O_3), também conhecidas por Y-TZP, possuem combinações de propriedades interessantes entre os materiais cerâmicos, tais como elevada tenacidade à fratura, alta dureza e resistência ao desgaste, estabilidade química e biocompatibilidade (De Aza et al., 2002; Guazzato et al., 2004). Dentre as indicações da zircônia, as próteses fixas têm tomado um lugar de destaque nos procedimentos restauradores. A cerâmica Y-TZP é um material policristalino tetragonal parcialmente estabilizado por ítria sem fase vítrea (Valandro, Bottino, 2009; Bispo, 2015). Devido à baixa translucidez da Y-TZP tradicional (Shenoy, Shenoy, 2010), trata-se de um material opaco à luz visível que pode necessitar de recobrimento das infraestruturas com cerâmicas estéticas (Baldissara et al., 2010; Eisenburger et al., 2011). Como vantagens, a camada de revestimento minimiza tanto o desgaste do antagonista quanto a degradação hidrotérmica da Y-TZP (Ren et al., 2011). No entanto, esta associação pode resultar em falhas coesivas ou adesivas da cerâmica de cobertura, como

lascamento (*chipping*) ou delaminação (Sailer et al., 2007; Christensen, Ploeger, 2010).

Deste modo, a Y-TZP para uso monolítico surgiu com o intuito de associar translucidez adequada com as já conhecidas excelentes propriedades mecânicas do material (Denry, Kelly, 2014), visando superar falhas da cerâmica de cobertura, diminuir tempo clínico e o custo das restaurações (Stawarczyk et al., 2013).

Nos últimos anos, foram introduzidas no mercado novas formulações de materiais cerâmicos à base de silicato de lítio reforçado por zircônia (Celtra Duo, Dentsply; Suprinity, Vita Zahnfabrik) que se juntaram às cerâmicas já existentes: feldspática, de fluorapatita, feldspática reforçada por leucita, dissilicato de lítio, à base de alumina, à base de alumina reforçada com zircônia e à base de zircônia policristalina tetragonal parcialmente estabilizada por ítria (Y-TZP) (Rosenblum, Schulman, 1997; Qualtrough, Piddock, 2002; Aboushelib et al., 2007). De acordo com as propriedades de cada material cerâmico, eles podem ser utilizados em diferentes situações clínicas na reabilitação oral.

A zircônia, por exemplo, pode ser exposta ao meio bucal quando utilizada como infraestrutura de próteses parciais fixas, pois se trata de um material biocompatível e com baixa tendência a acumular biofilme dental (Rimondini et al., 2002; Scotti et al., 2006, 2007). Este procedimento é confirmado por outro estudo (Guazzato et al., 2004) que afirma que, além de não afetar a estética, economiza-se aproximadamente 0,7 a 1,0 mm de espaço, já que não é necessária a aplicação da cerâmica de cobertura na região gengival de pânticos. Além disso, as restaurações de zircônia monolítica apresentam o benefício de possibilitar preparos mais conservadores (Amer et al., 2014). No entanto, a exposição de uma coroa monolítica, tanto de zircônia quanto de silicato de lítio reforçado com zircônia, à fluídos orais ainda é obscuro.

As cerâmicas monolíticas quando posicionadas sobre o preparo dental, estarão em contato com o tecido gengival quando o término estiver intra-sulcular. Nesta e em outras situações clínicas, onde a linha de cimentação pode causar danos ao tecido mole, é imprescindível a saúde periodontal para o sucesso clínico em longo prazo do tratamento restaurador.

Por se tratarem de novos materiais cerâmicos, não existem até o momento estudos que avaliem a interação entre a superfície destes materiais e a formação de biofilme dental, além da avaliação da viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) quando em contato com estes materiais monolíticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cerâmicas

As cerâmicas odontológicas podem ser classificadas quanto à sua microestrutura e técnica de processamento (Edward et al., 2009). Quanto à estrutura, são classificadas conforme a quantidade de fase vítrea e cristalina em sua composição.

A zircônia consiste em uma cerâmica policristalina que se apresenta em três fases principais (monoclínica, tetragonal e cúbica) estáveis em diferentes faixas de temperatura (Piconi, Maccauro, 1999; Shenoy, Shenoy, 2010). Na fase monoclínica (m), a zircônia é estável em temperatura ambiente até 1.170 °C. Elevando-se essa temperatura, a zircônia transforma-se em tetragonal (t), e em seguida, a 2.370 °C entra na fase cúbica, onde se mantém até seu derretimento a cerca de 2.600 °C. Durante o resfriamento pós-sinterização, a transformação de fase reversa (t→m) é acompanhada de um aumento volumétrico cerca de 4%, que poderia resultar na fratura imediata deste material se utilizado na forma pura. Visando estabilizar a zircônia na fase tetragonal em temperatura ambiente, podem ser utilizados óxidos estabilizadores, como o óxido de ítrio (Denry, Kelly, 2014) que resulta na zircônia parcialmente estabilizada por óxido de ítrio, a Y-TZP.

A zircônia está inserida no grupo dos materiais com elevada resistência (Chevalier et al., 2007). No entanto, transformação de fase (t→m) da cerâmica à base de zircônia, induzida por tensões externas é acompanhada por uma expansão volumétrica que induz tensões de compressão (Chevalier et al, 1999). Por outro lado, o mecanismo de transformação de fase (t→m) também é

responsável pelo notável desempenho da zircônia (Kosmac et al., 1999). O consequente aumento de volume gera tensões compressivas superficiais capazes de limitar uma trinca. Este mecanismo de tenacificação é responsável pela elevada resistência à fratura da zircônia (Shenoy, Shenoy, 2010), o que permite a confecção de próteses parciais fixas posteriores e pilares protéticos para implantes, além de permitir uma substancial redução na espessura de subestruturas (Picconi, Maccauro, 1999). Ainda segundo os autores, a zircônia Y-TZP apresenta as seguintes propriedades: dureza (1.200 HV), resistência à flexão (900 – 1.200 MPa), resistência à compressão (2.000 MPa), tenacidade à fratura (7 – 10 MPa), módulo de Young (210 GPa), coeficiente de expansão térmica ($11 \times 10^{-6} \text{ 1/K}$) e, densidade ($6,05 \text{ g/cm}^3$).

As cerâmicas Y-TZP são disponibilizadas comercialmente em forma de discos ou blocos pré-fabricados que são fresados através de sistemas CAD/CAM (*Computer Aided Design/Computer Aided Machine*).

O dissilicato de lítio é um tipo de cerâmica que contém fase vítrea e óxido de lítio em sua composição, diferente das cerâmicas policristalinas cuja composição é formada por cristais sinterizados e ausência de matriz vítrea (Shenoy, Shenoy, 2010). Atualmente o dissilicato de lítio também é utilizado como material monolítico.

Shenoy e Shenoy, 2010 afirmam que embora o dissilicato de lítio apresente resistência à fratura (400 MPa) inferior à Y-TZP (700 MPa), é capaz de oferecer resultado estético mais adequado quando a resistência não é o fator mais relevante.

Mais recentemente, a VITA lançou no mercado uma nova cerâmica de silicato de lítio reforçada por zircônia. Sua composição consiste em 56–64% de SiO_2 , 15–21% de LiO_2 , 1–4% de K_2O , 3–8% de P_2O_5 , 1–4% de Al_2O_3 , 0–4% de CeO_2 e de 0–6% de pigmentos, associados ao acréscimo de 10% de zircônia, apresentando propriedades semelhantes as do dissilicato de lítio (Denry, Kelly,

2014).

Os grãos de zircônia se mantêm em uma matriz vítrea entre uma camada de grãos finos de metassilicato de lítio e uma camada de dissilicato de lítio (Kruger et al., 2013). Previamente à etapa da cristalização, existem os grãos de metassilicato. Após cristalização, o material passa a conter duas camadas de dissilicato de lítio (Denry, Kelly, 2014).

A cerâmica Suprinity da VITA* é um exemplo de cerâmica à base de silicato de lítio reforçada com zircônia, disponível para o sistema CAD/CAM, que surgiu com uma microestrutura de granulação fina e homogênea (Elsaka, Elnaghy, 2016), podendo ser utilizada como laminado e tanto em coroas anteriores quanto posteriores (da Cunha et al., 2015), além de, segundo informações do fabricante, *inlays*, *onlays*, coroas parciais e coroas unitárias sobre implantes, alcançando estética agradável devido à sua translucidez, fluorescência e opalescência.

A cerâmica Suprinity da VITA** passa por duas etapas até estar pronta para uso. Na primeira etapa, o silicato está em estado de vidro sendo inadequado para o processamento devido sua fragilidade. Por isso, passa por um processo de pré-tratamento térmico onde o vidro passa a desenvolver características de cerâmica e então, pode ser submetido ao processamento. O material apresenta suas propriedades física e estética final após a cristalização em forno odontológico específico.

Um estudo recente que realizou caracterização mecânica da Suprinity observou que este material apresenta características mecânicas superiores em relação ao dissilicato de lítio (E.max CAD, Ivoclar/Vivadent), como: tenacidade à fratura ($2,31 \pm 0,17 \text{ MPa m}^{0.5}$), resistência à flexão ($443,63 \pm 38,90 \text{ MPa}$),

*VITA. Informações sobre o produto nº 1981 VITA YZ HT DISC. 2015a. Disponível em: <<https://www.vita-zahnfabrik.com/Products/Machinable-Materials-All-Ceramics/en/YZ-DISC-HT-16692,27568,75509.htm>>. Acesso em 01 de março de 2015.

**VITA. Nº 2001 VITA SUPRINITY Technical and scientific documentation. 2015c. Disponível em: <<https://www.vita-zahnfabrik.com/en/VITA-SUPRINITY-27559,27568,85238.html>>. Acesso em: 16 de junho de 2015.

módulo elástico ($70,44 \pm 1.97$ GPa). Como desvantagens, a SUP se mostrou mais dura ($6,53 \pm 0,49$ GPa) e friável ($2,84 \pm 0,26 \mu\text{m}^{-1/2}$) (Elsaka, Elnaghy, 2016).

A VITA YZ HT (VITA)* é uma cerâmica à base Y-TZP que apresenta alta translucidez associada as já conhecidas boas propriedades mecânicas da Y-TZP regular, e também é capaz de recuperar toda anatomia dental de forma monolítica, no entanto, ainda não está disponível no mercado brasileiro, assim como, a caracterização de sua superfície ainda não foi esclarecida na literatura.

Uma das mais reconhecidas características das cerâmicas monolíticas é sua translucidez. Apesar da opacidade da zircônia, as cerâmicas monolíticas de alta translucidez possibilitam a passagem de luz (Sulaiman et al., 2015). Os autores ainda sugerem que a translucidez pode estar relacionada com o tamanho dos grãos de zircônia, porcentagem de impurezas químicas, a espessura da restauração, porcentagem de alumina e a fase na qual o material se apresenta (Zhang, 2014; Sulaiman et al., 2015). Quanto menores os grãos de zircônia (Kim et al., 2013) e a espessura da restauração (Zhang, 2014), maior transmissão de luz. Além disso, o aumento do tempo e da temperatura de sinterização da zircônia monolítica resultam em melhor translucidez do material (Ebeid et al., 2014).

2.2 Polimento ou vitrificação

Durante o período de resfriamento após a sinterização da cerâmica, podem surgir micro-ranhas na superfície do material, diminuindo a resistência devido ao acúmulo de tensões, além de, aumentar a rugosidade da superfície (Aksoy et al., 2006).

*VITA. N° 2001 VITA SUPRINITY Technical and scientific documentation. 2015c. Disponível em: <<https://www.vita-zahnfabrik.com/en/VITA-SUPRINITY-27559,27568,85238.html>>. Acesso em: 16 de junho de 2015.

Logo, deve ser realizada a aplicação de uma camada de *glaze* ou procedimentos adequados de acabamento e polimento (Rashid, 2014), a fim de recobrir estes pequenos defeitos superficiais e prevenir desgastes indesejados do antagonista (Mehulic et al., 2010). O *glaze* consiste em pó vítreo que é misturado ao respectivo líquido modelador e pode ser sinterizado sobre a superfície cerâmica com o objetivo de promover uma superfície brilhante e lisa (Anusavice et al., 2013). A camada de *glaze* é defendida como o melhor método para a obtenção de uma superfície menos rugosa em cerâmicas vítreas (IPS Classic, Empress Esthetic e Empress) quando comparada ao polimento mecânico (Yilmaz, Ozkan, 2010). No entanto, existem trabalhos que encontraram protocolos de polimento que resultaram em morfologias superficiais próximas à promovida pelo *glaze* em diferentes cerâmicas odontológicas (Fuzzi et al., 1996; Boaventura et al., 2013; Odatsu et al., 2013; Hmaidouch et al., 2014; Lawaf et al., 2016) ou até mais lisas que a superfície glazeada (Manjuran, Sreelal, 2014).

De acordo com Boaventura et al. (2013), uma restauração cerâmica (IPS Empress 2 - Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) finalizada idealmente deve possuir uma camada de *glaze*. Ao analisar diferentes condições da superfície de uma cerâmica vítrea (IPS Empress, Ivoclar/Vivadent), Boaventura et al. (2013) observaram que a superfície glazeada apresenta menor rugosidade comparada com a superfície submetida a acabamento e polimento por ponta diamantada seguida de pontas siliconadas (KG Sorensen) e pasta diamantada (Ultradent, South Jordan, UT) ou ponta diamantada, ponta siliconada (Shofu) e pasta Porcelize (Cosmedent).

No entanto, existem situações onde é necessário o ajuste da peça para a obtenção de um adequado assentamento (Aksoy et al., 2006). Nestes casos, os ajustes são realizados para corrigir inteferências oclusais ou para melhorar a estética. Em restaurações de zircônia monolítica, por exemplo, o ajuste pode ser

muito difícil demandando um grande tempo clínico dependendo da distribuição das partículas de zircônia e da quantidade de desgaste necessário, podendo resultar em uma superfície muito rugosa (Anusavice et al., 2013). Além disso, alguns profissionais preferem o polimento ao invés da camada de glaze.

Segundo Fuzzi et al. (1996), a superfície de uma porcelana polida pode assemelhar-se à superfície glazeada. Os autores observaram com auxílio de microscopia eletrônica de varredura no aumento de 2.500 x que tanto o *glaze* quanto diferentes técnicas de polimento resultaram em defeitos superficiais uniformemente distribuídos, sendo que a superfície glazeada apresentou-se menos rugosa em comparação com as demais, corroborando com os achados de Aksoy et al. (2006) através de análises de MEV e MFA.

Outro ponto que deve ser considerado é o fato de haver uma grande variedade de protocolos de polimentos no mercado, assim como, existem diversas técnicas de observação da rugosidade superficial de um material, como MEV, MFA, rugosímetro de contato, perfilometria e interferometria. E que esta heterogeneidade de fatores dificulta ainda mais a comparação de resultados entre os materiais.

Com relação à perda da camada de *glaze*, (Pereira PC, 2010) observaram que a deterioração da camada de *glaze* teve início apenas a partir de 160.000 ciclos de escovação, o que os autores relacionaram a cerca de 1 ano e 2 meses. Os autores avaliaram a influência da vitrificação e do polimento com pontas de silicone diamantadas na rugosidade superficial e formação *in situ* de biofilme oral inicial, após simulação da escovação (400.000 ciclos), em cerâmica policristalina de zircônia parcialmente estabilizada por ítrio (Cercon® Zirconia, Dentsply Ceramco). Como resultado, observaram maior rugosidade superficial assim como espessura média e biovolume de biofilme no grupo com superfície glazeada e escovação simulada. No entanto, a escovação não foi relevante no aumento da rugosidade. Através de MEV, observaram também uma superfície

mais irregular do grupo com glaze, apresentando picos e vales; já os grupos controle e polidos apresentaram superfície mais lisa e uniforme.

2.3 Biofilme

A cavidade oral é colonizada por micro-organismos que quando organizados formam o biofilme dental (Pereira CA et al., 2011; Zhou et al., 2015) composto por cerca de 750 espécies diferentes (Kolenbrander et al., 2010), envolvidas em uma matriz de polissacarídeo extracelular aderida a uma superfície sólida, como por exemplo, o elemento dentário (de Oliveira et al., 2014).

O biofilme oral é um dos sistemas microbianos melhor descritos (Kolenbrander et al., 2010), mas ainda existem micro-organismos a serem cultivados e caracterizados metabolicamente. Os micro-organismos que não conseguem se aderir a um substrato são eliminados para o meio externo pela boca ou levados para o trato digestório (Kolenbrander et al., 2010). Desta forma, é sabido que existe um mecanismo para as bactérias conseguirem se aderir e formar biofilmes tanto em superfícies sólidas quanto sobre os tecidos moles. Quando os microrganismos e as superfícies estão expostos à saliva, eles são imediatamente recobertos por uma camada de moléculas orgânicas, a película adquirida (Li et al., 2004), constituída por proteínas e glicoproteínas (Kolenbrander et al., 2010), além de moléculas receptoras para a adesão bacteriana (Teughels et al., 2006; Metwalli et al., 2013).

Dois termos devem ser observados no campo da aderência bacteriana: coadesão e coagregação. O primeiro refere-se à união entre um micro-organismo na forma planctônica (inativa) e um micro-organismo distinto fixo

sob uma superfície. Já a coagregação consiste na interação específica entre componentes da superfície dos diferentes micro-organismos quando dispersos na saliva (Kolenbrander et al., 2010). Desta forma, em uma superfície dura como o esmalte dental, a capacidade de agregar, a ordem de surgimento dos micro-organismos (Kolenbrander, London, 1993) e o ambiente (Kolenbrander et al., 2010) são importantes fatores na formação de um biofilme dental. Os primeiros colonizadores do biofilme oral são rapidamente revestidos por moléculas distintas que facilitam a glutinação e a formação de uma microcolônia (Teughels et al., 2006). Em uma superfície áspera, as bactérias estão mais bem protegidas contra as forças de cisalhamento de modo que uma mudança da ligação reversível para uma irreversível com o substrato, ocorre mais facilmente. A aderência bacteriana a um substrato se dá pela propriedade superficial (ELS) semelhante (Teughels et al., 2006). De forma que, um micro-organismo hidrofóbico apresentará afinidade por uma superfície também hidrofóbica (Meier et al., 2008). Caso a superfície apresente característica hidrofílica, uma película de água estará presente entre o substrato e o microorganismo, dificultando o contato direto entre micro-organismo hidrofóbico e o substrato. Segundo Almaguer-Flores et al. (2012), a composição do biofilme inicial é afetada pela topografia e hidrofobicidade da superfície e comunicação entre os organismos presentes.

Segundo March (2005) o biofilme nada mais é do que uma comunidade benéfica para todos os organismos participantes, pois o metabolismo dos primeiros colonizadores altera o ambiente proporcionando condições adequadas para a fixação e crescimento de outras espécies. Esta cooperação promove uma maior resistência aos agentes antimicrobianos e a defesa do hospedeiro. *Streptococcus* são um dos primeiros colonizadores (Dige et al., 2009) presentes no biofilme supragengival inicial nas primeiras 8 h. Segundo Kolenbrander e Palmer (1993), *Streptococcus* são os micro-organismos que estão presentes em

maior quantidade no biofilme oral. Sendo *S. mutans* a espécie predominante, seguida por *sanguinis*, *mitis* e *salivaris* (Metwalli et al., 2013). *Streptococcus* reconhecem receptores na película adquirida imediatamente após a superfície ter sido limpa e, crescem a partir da fermentação de açúcares em ácidos orgânicos, por exemplo, o ácido láctico (Palmer et al., 2006). A produção de ácido tende a abaixar o pH para 5, desta forma apenas micro-organismos ácido-resistentes como *S. mutans* tendem a crescer e a continuar a produção de ácidos, conferindo vantagem a estes micro-organismos sobre as espécies comensais.

Na presença de açúcar, os colonizadores iniciais e secundários produzem uma matriz extracelular, a partir de onde as células irão formar colônias e crescer formando o biofilme dental (Kidd, Fejerskov, 2004; Meier et al., 2008). Esta produção constante de ácidos em meio de baixo pH é o ambiente ideal para desenvolvimento de cáries (de Soet et al., 2000). Logo, *S. mutans* é considerado um organismo altamente cariogênico, pois, sua patogenicidade se dá pela capacidade de sobreviver em ambiente ácido e metabolizar açúcar, promovendo pontes irreversíveis com a estrutura dental. *S. mutans* coadere ou se coagrega com outros micro-organismos, seguidos pela proliferação e migração para outros sítios da boca (Metwalli et al., 2013). Ao mesmo tempo, alguns *Streptococcus* sintetizam amônia, elevando o pH do biofilme (Kolenbrander et al., 2010) e é neste meio que aparecem micro-organismos como *Candida albicans*.

De acordo com Kolenbrander et al. (2010), o biofilme oral pode ser dividido em supragengival presente em esmalte exposto ou, subgengival quando o biofilme que está localizado embaixo da gengiva. A formação do biofilme ocorre preferencialmente nas irregularidades onde os micro-organismos estão protegidos dos mecanismos de controle e regulação da microbiota (Gatewood et al., 1993; Quirynen et al., 1993; Pereira-Cenci et al., 2008). Deste modo, parece sensato afirmar que a rugosidade é um meio

susceptível à formação de biofilme em sua fase reversível até sua maturação, assim como observado por Aykent et al. (2010) e Anami et al. (2012) que observaram em seus estudos a relação direta entre a formação de biofilme dental e a rugosidade superficial de um material.

O biofilme dental é formado em três etapas: a fase de colonização inicial ou de acoplamento, a fase de crescimento rápido e a fase de remodelação. Na fase inicial, predomina a aderência de micro-organismos primários como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii* na película adquirida (Aruni et al., 2015). A segunda fase consiste em maior adesão interbacteriana, divisão e multiplicação celular. Já na terceira fase, existe maior complexidade na composição bacteriana, como por exemplo, a presença de *Streptococcus mutans*, intimamente relacionado com a cárie dentária (Pedrini et al., 2001), *Cândida albicans*, principal espécie de levedura responsável pelo desenvolvimento de candidoses bucais, cárie dental e doença periodontal (Järvensivu et al., 2004).

C. albicans pode ser frequentemente identificada na cavidade oral de pacientes saudáveis (Pereira CA et al., 2011). Em um biofilme heterotípico, a presença de *C. albicans* modifica o estado metabólico dos outros micro-organismos criando uma barreira de proteção física aos antimicrobianos, tornando-os resistentes aos medicamentos (Fox, Nobile, 2012; Cirasola et al., 2013).

A aderência de bactérias bucais aos dentes ou materiais restauradores desempenha papel fundamental na etiologia de doenças bucais como cárie e doença periodontal (Kantorski, Pagani, 2007). Na boca, geralmente existem superfícies duras, macias, naturais e artificiais dentro de um mesmo nicho ecológico (Shemesh et al., 2010) conferindo então, a aderência bacteriana e consequentemente, a formação de biofilme dental como fatores importantes na odontologia.

A presença de micro-organismos gera potencial patogênico e, a cárie dental e a periodontite são as duas doenças mais comuns relacionadas à ação do biofilme dental (Jakubovics et al., 2014).

A película adquirida é o resultado da junção de constituintes salivares e da adsorção seletiva bacteriana. Trata-se de uma película acelular na qual as bactérias se aderem formando o biofilme dental (Shemesh et al., 2010).

Streptococcus que colonizam a cavidade oral são micro-organismos comensais (Jakubovics et al., 2014). Suspensões de *S. mutans* e *S. sanguinis* estão presentes na microbiota oral saudável e representam mais de 80% dos micro-organismos colonizadores do biofilme dental inicial (Rosan, Lamont, 2000). *S. sanguinis* predominam sobre *S. mutans* em adultos sem experiência de cárie e quando existe a atividade de cárie, *S. mutans* prevalecem (Giacaman et al., 2015).

Segundo Shemesh et al. (2010), é possível que o biofilme se diferencie devido à película adquirida variar conforme o tipo de superfície dos materiais presentes na cavidade bucal (Aroonsang et al., 2014). Outros fatores também são considerados no estudo da aderência bacteriana: rugosidade superficial, carga do material, componentes químicos e hidrofobicidade celular (Sousa et al., 2009).

Outros autores ressaltam a importância do efeito hidrofóbico na aderência inicial dos micro-organismos no material. Em estudo recente, observou-se que existe menor aderência bacteriana aos materiais hidrofílicos comparados aos hidrofóbicos (Sousa et al., 2009). Os materiais superhidrofílicos possuem a capacidade de formarem em sua superfície uma densa camada de água que enfraquece a interação célula e substrato, reduzindo a adesão celular (Song et al., 2015). Desta forma, as bactérias apresentam maior preferência pelas superfícies hidrofóbicas, assim como, por superfícies rugosas (Renner, Weibel, 2011).

Não é definida na literatura a rugosidade ideal para que a formação de biofilme sobre a superfície do material seja inibida e, o efeito desta relação rugosidade e formação de biofilme pode ainda variar conforme o tamanho dos micro-organismos (Renner, Weibel, 2011). Almaguer-Flores et al. (2012), corroboram com esta afirmação quando observaram que a formação de biofilme inicial e também sua composição são afetados pela superfície hidrofílica, assim como, a microtopografia do material.

Diferentemente da técnica da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) que requer bastante tempo para ser realizada, por tanto, trata-se de um método trabalhoso e ainda, impreciso (Manoil et al., 2014), mas que, continua sendo utilizado (Giacaman et al., 2015). Outros métodos utilizados para avaliar a presença de biofilme são as microscopias: eletrônica de transmissão (Sanclement et al., 2005) e de fluorescência (Winkler et al., 2014).

Quando um material em contato com os tecidos do corpo humano exerce suas funções sem causar danos, é denominado inerte (Williams, 2008). Quando existe alteração metabólica na célula, o material é citotóxico, pois, acarreta em irritação e até degeneração dos tecidos circundantes (Willershausen et al., 2000). De acordo com a International Organization of Standardization (ISO) ISO 10993:1999, para avaliar a biocompatibilidade de um material que será utilizado em dispositivos médicos, deve-se primeiramente realizar o ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Comprovada a ausência de toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto progride para a realização dos testes em animais. A avaliação da citotoxicidade de um material pode ser qualitativa ou quantitativa (Rogerio et al., 2003). A qualitativa é realizada mediante análise microscópica das células a fim de se verificar alterações na morfologia geral e a avaliação quantitativa é realizada através da morte celular, proliferação celular ou formação de colônias celulares.

Os testes que avaliam a citotoxicidade (microscopia eletrônica de varredura e ensaios enzimáticos) consistem em colocar o material em contato com uma cultura de células, verificando se alterações celulares são geradas por diferentes mecanismos (Camilleri, Pitt Ford, 2006). A escolha do ensaio, segundo Costa e Souza (2005), depende da célula-alvo, do agente em estudo e da natureza da resposta.

Os ensaios de cristal de violeta (Schweikl et al., 2005), contagem de células por exclusão com azul de trypan (Cavalcanti et al., 2005; Costa, Souza, 2005), síntese de DNA (Costa, Souza, 2005; Tay et al., 2012), liberação de crômio, síntese de proteínas, (Costa, Souza, 2005), teste FDA (diacetato de fluoresceína), teste LDH (lactato desidrogenase), teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-brometo de difeniltetrazólio), teste BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) (Möller et al., 2012), WST teste (tetrazólio solúvel em água) (Möller et al., 2012; Winkler et al., 2014) e teste XTT (sódio 30-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazólio]-bis(4-metoxi-6-nitro) benzeno-sulfônico ácido hidrato) (Shehata et al., 2013) são ensaios enzimáticos que avaliam a citotoxicidade *in vitro*.

Os ensaios de citotoxicidade celular podem ser divididos em dois grupos: a) resposta imediata ou curto-prazo; b) sobrevivência em longo prazo. Os ensaios de curto-prazo determinam a viabilidade celular logo após o contato com o agente, revelando as células mortas no período avaliado. Já os testes de sobrevivência avaliam a capacidade metabólica ou proliferativa após exposição ao agente (Costa, Souza, 2005). O teste MTT ou método do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (De Deus et al., 2005) é um exemplo de ensaio enzimático bastante utilizado (Sabaliauskas et al., 2011; Tetè et al., 2014; Trumpaite-Vanagiene et al., 2015). Este método de avaliação determina o número de células em uma amostra e o nível de sua atividade metabólica, pois, baseia-se na capacidade enzimática da succinil desidrogenase,

presentes em células viáveis formar cristais de formazan através da conversão do sal amarelo MTT. Este método tem como vantagens sua simplicidade, precisão e rapidez (De Deus et al., 2005).

A zircônia é um material que apresenta baixa citotoxicidade. Desta forma, sobre sua superfície crescem fibroblastos que expressam e secretam fibronectina, proteína relacionada à adesão destas células (Raffaelli et al., 2007; Tetè et al., 2014). A zircônia pode então ser sugerida como um biomaterial cerâmico adequado para ser utilizado em próteses parciais fixas (Raffaelli et al., 2007). As restaurações à base de dissilicato de lítio promovem uma baixa secreção de proteínas associadas à adesão celular, logo para este material, sugere-se o término supra-gengival (Tetè et al., 2014).

Os fibroblastos (FMM-1) podem ser as células de escolha para avaliação da citotoxicidade. Vários estudos que avaliam a citotoxicidade ou viabilidade celular sobre materiais restauradores têm utilizado o fibroblastos gengivais humanos (Sabaliauskas et al., 2011; Attik et al., 2014; Frese et al., 2014; Kwon et al., 2014; Tetè et al., 2014; Zingler et al., 2014; Grande et al., 2015; Madhyastha et al., 2015; Trumpaite-Vanagiene et al., 2015; Yagci, Kesim, 2016) por ser o tipo celular mais comum no tecido gengival (Yagci, Kesim, 2016).

FMM-1 é a linhagem da qual os fibroblastos gengivais humanos podem ser extraídos. Os fibroblastos FMM-1 possuem comportamento estável conferindo a obtenção de resultados padronizados.

3 PROPOSIÇÃO

Este projeto teve como objetivos:

- a) Analisar a topografia superficial e energia livre de superfície das cerâmicas monolíticas à base de zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio de alta translucidez e à base de silicato de lítio reforçado por zircônia, quando glazeadas ou polidas;
- b) Quantificar a aderência de biofilmes formados na superfície destas cerâmicas glazeadas ou polidas;
- c) Avaliar a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) sobre estes materiais restauradores glazeados ou polidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em diferentes centros de pesquisa. As seções 4.1, 4.2.1 e 4.5 foram realizadas no Laboratório de Pesquisas em Materiais Odontológicos e Prótese. A seção 4.2.3 foi realizada no Laboratório de Bioengenharia. A seção 4.3 foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Imunologia. A seção 4.4 foi realizada no laboratório de Estudo Interdisciplinar em Célula (LEIC). Todos os laboratórios citados acima pertencem ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, em São José dos Campos, Brasil. A seção 4.2.2 foi desenvolvida no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) em São José dos Campos, Brasil. Os materiais restauradores que foram utilizados no presente estudo encontram-se descritos no Quadro 1.

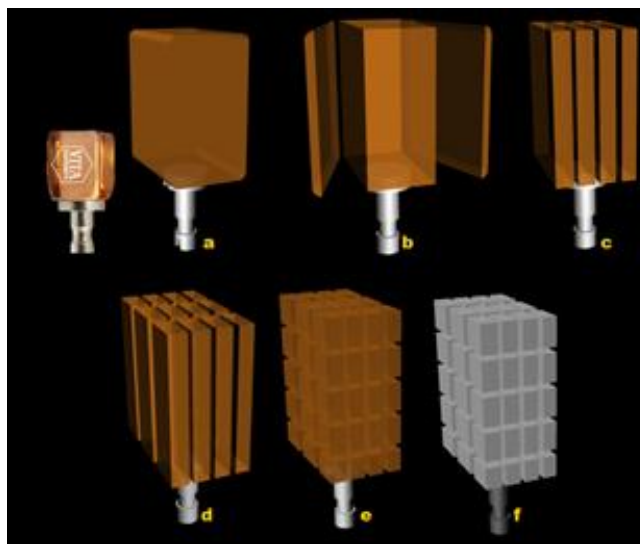
Quadro 1 – Marcas comerciais, fabricantes e indicações de uso dos materiais restauradores que foram utilizados no presente estudo

Sigla	Material	Marca comercial e fabricante	Indicação	Lote
HT	Zircônia policristalina parcialmente estabilizada por ítrio de alta translucidez	Vita YZ HT block, Vita Zahnfabrik, Bad, Säckingen, Alemanha	Coroas e PPF de até 9 elementos	48980
SUP	Cerâmica à base de silicato de lítio reforçada por zircônia	Suprinity, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha	Coroas anteriores e posteriores sobre dente e implante, facetas	49142
	Vita Akzent Glaze Spray	Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha	Otimizar a tonalidade das cerâmicas	E33820
	Pontas para polimento	Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha	Alcançar um alto brilho	E6510

4.1 Confeção dos corpos-de-prova

As cerâmicas (HT e SUP) foram cortadas em blocos menores com disco diamantado em máquina de corte (Isomet® 1000, Precision Sectioning Saw, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) sob refrigeração constante. Foram obtidos 46 espécimes de cada material, que foram lixados para padronização das dimensões (Figura 1). Devido à contração de 20% da cerâmica HT, suas dimensões iniciais foram de 5,7 x 5,7 x 2,1 mm. Todos blocos tiveram as superfícies polidas (à mão) em politriz automática (EcoMet™/AutoMet™250, Buehler, Illinois, EUA) com lixas d'água de granulação decrescente #600 até #1200 (30 s por lixa), sob refrigeração com água.

Figura 1- Esquemática dos cortes para obtenção dos corpos de prova



Legenda: a) Bloco de SUP nas dimensões originais (11 x 18 x 14 mm); b) Remoção das extremidades para confecção das amostras para o cálculo da energia livre de superfície; c) Cortes longitudinais no bloco referentes à espessura; d) Após girar o bloco em 90°, realização dos cortes longitudinais referentes à altura; e) Cortes transversais referentes à largura. Os espécimes de SUP foram obtidos nas dimensões finais de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm; f) Os espécimes da HT foram obtidos nas dimensões de 5,7 x 5,7 x 2,1 mm para que após o processo de sinterização, as dimensões finais sejam iguais às da SUP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após limpeza em banho ultrassônico com álcool isopropílico durante 5 min, os blocos de HT foram submetidos à queima de limpeza em forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad, Säckingen, Alemanha) e sinterizados em forno Zyrcomatt (Vita Zahnfabrik, Bad, Säckingen, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. Já os blocos de SUP foram submetidos à cristalização em forno Vacumat 6000 MP. Em seguida, os blocos (subgrupos “g”) receberam uma fina camada de glaze Vita Akzent Spray (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) sobre a face de trabalho através de jato único (20 cm de distância) e foram sinterizados em forno Vacumat 6000 MP (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha). Após realização de todos os testes para os grupos glazeados, os espécimes foram novamente submetidos ao protocolo de lixamento (exceto os espécimes submetidos à microscopia eletrônica de varredura) e em seguida, ao protocolo de polimento de dois passos com as pontas sugeridas pelo fabricante para ambos os materiais (Vita Suprinity Polishing Set Clinical, Vita Zahnfabrik), totalizando 26 amostras de cada material para o subgrupo “polido”. Inicialmente foi utilizada a borracha Step 1 *Prepolishing* (velocidade de 7.000 a 12.000 rpm por 15 s) seguida da borracha Step 2 *High-gloss* (velocidade de 4.000 a 8.000 rpm por 15 s). Após protocolo de polimento, os espécimes foram novamente limpos em banho ultrassônico. Por fim, as dimensões finais de ambos materiais foram de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm (Figura 2). Em seguida, foi determinada a superfície de não-trabalho das amostras através de uma marcação realizada com uma broca diamantada esférica modelo 1014 (KG Sorensen, Medical Burs, São Paulo, Brasil). Os espécimes foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento da superfície e o material utilizado, descritos no Quadro 2.

Figura 2- Amostras finalizadas



Legenda: Blocos finalizados nas dimensões de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 2- Distribuição dos grupos conforme os fatores “material” e “superfície”

Grupo	Material	Superfície
HTg	Vita YZ HT	<i>Glaze</i>
HTp	Vita YZ HT	Polimento
SUPg	Vita Suprinity	<i>Glaze</i>
SUPp	Vita Suprinity	Polimento

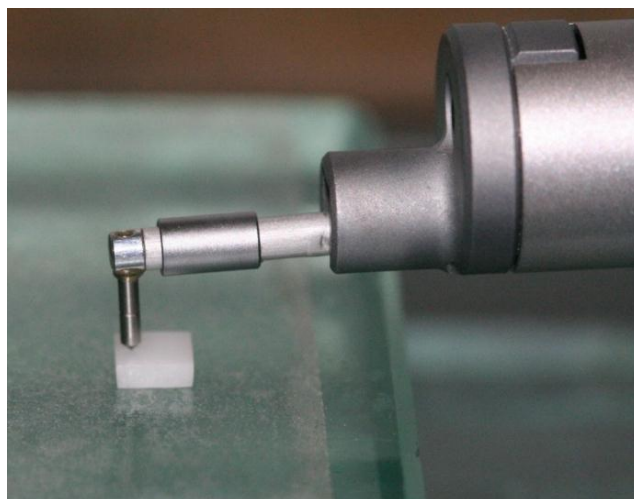
4.2 Caracterização da superfície dos materiais

4.2.1 Análise da rugosidade

Na superfície de trabalho foi analisada a rugosidade superficial (n=20), nos parâmetros Ra (rugosidade média absoluta das alturas das irregularidades ao

longo do perfil; parâmetro de altura) e RSm (espaçamento ou largura média do perfil das irregularidades dentro de um comprimento de amostragem; parâmetro híbrido) (Wennerberg, Albrektsson, 2000) dos espécimes que foram posteriormente utilizados para a Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (4.3.2). Os espécimes foram individualmente identificados e na superfície de cada amostra (4,5 x 4,5 mm) realizadas leituras (3 mm) da rugosidade tridimensional através de um rugosímetro (Surftest SJ 400, Mitutoyo, Tóquio, Japão) (Figura 3). Foram realizadas três leituras paralelas equidistantes com velocidade de varredura de 0,2 mm/s, seguindo a norma ISO 4287-1997, com filtro Gaussian e o valor *cut-off* de 0,8 mm. Em seguida, duas amostras de cada grupo foram utilizadas na sessão 4.5.

Figura 3- Amostra em análise através do Rugosímetro Surftest SJ 400 (Mitutoyo, Tóquio, Japão)



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Perfilometria

Foram realizadas duas leituras por espécime ($n=2$) para análise qualitativa da superfície bidimensional e tridimensional das cerâmicas através de um perfilometro óptico (Wyko NT1100, Veeco, Tucson, EUA). A análise da topografia superficial foi realizada utilizando o *software* Wyco Vision 32 (Veeco, Tucson, EUA) com aumento de 20 x em uma área de 301,3 x 229,2 μm .

4.2.3 Análise da energia livre de superfície (ELS)

Foram obtidas cinco amostras para cada grupo (15 x 15 x 1,5 mm), de forma semelhante ao descrito anteriormente, que foram utilizadas para análise da ELS por goniometria. O tensiômetro óptico TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lite (Attension, Lichfield, Staffordshire, Reino Unido) foi utilizado para a medição do ângulo de contato médio em 5 áreas distintas por amostra com a técnica de gota séssil com dois líquidos de diferentes tensões superficiais: água destilada e diiodometano em temperatura ambiente. Previamente à análise, cada amostra foi limpa em banho ultrassônico (álcool isopropílico) durante 5 min e manuseada com cuidado (luvas) evitando contaminação.

Uma seringa graduada (Gastight Syringes #1001 – 1ml, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) com agulha hidrofóbica deposita a gota e, após o tempo de espera de 5 s, o ângulo de contato médio é calculado (OneAttension, Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, Reino Unido) a partir da aquisição de 60 imagens por segundo durante 10 s. A energia livre de superfície, em mJ/m^2 , foi calculada de acordo com o método proposto por Owens e Wendt (1969).

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

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

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

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

Quadro 3- Componentes dispersivo (γ_d) e polar (γ_p) e energia de superfície (γ_T) dos líquidos utilizados para medidas de ângulo de contato, em mN/m (Combe et al., 2004)

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

Fonte: Combe et al. (2004)

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

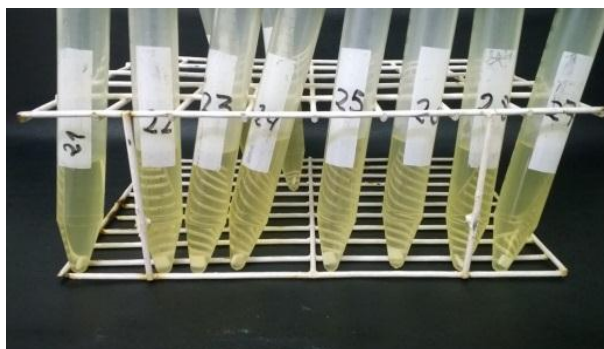
4.3 Formação de biofilme

4.3.1 Esterilização e contaminação dos espécimes

Trinta e dois espécimes de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm (n=8) foram esterilizados em câmara de fluxo laminar. Durante o estudo piloto para elaboração deste projeto de pesquisa, outras 10 amostras foram submetidas à esterilização em câmara de fluxo sob radiação ultravioleta. Os espécimes foram posicionados dentro do fluxo laminar, onde permaneceram sob a luz por 15 min de cada lado de 4,5 x 4,5 mm e foram manipulados com instrumental também estéril. Para confirmar a ausência de alterações superficiais resultantes deste procedimento foi analisada a rugosidade superficial de cada amostra antes e após a esterilização que se mostrou inalterada.

A Figura 4 apresenta os espécimes esterilizados por radiação ultravioleta em caldo BHI (infusão de cérebro coração) após 24 h e 48 h em estufa a 37 °C. A ausência de turvação garante a eficácia deste processo de esterilização que não influenciou os valores de rugosidade superficial do material e não apresenta custo para a execução do trabalho.

Figura 4- Estudo piloto avaliando a eficácia da câmara de fluxo como método de esterilização dos espécimes



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, os espécimes foram individualmente numerados e dispostos em ordem crescente na câmara de fluxo laminar para o processo de esterilização por radiação ultravioleta conforme descrito anteriormente.

A metodologia proposta por Pereira et al. (2011), foi utilizada com algumas modificações, para avaliação da formação dos biofilmes sobre a superfície dos materiais restauradores. Os biofilmes foram compostos por cepas padrão de *S. sanguinis* (ATCC 7073), *S. mutans* (UA 159) e *C. albicans* (ATCC 18804).

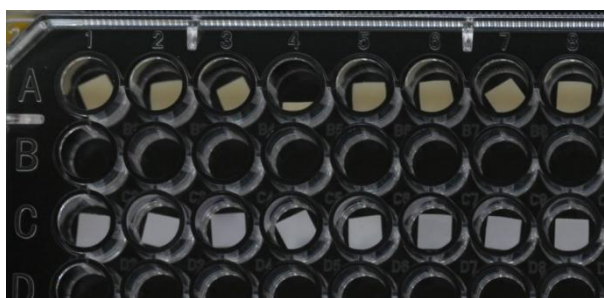
Suspensões padrão de cada cepa foram preparadas com densidade óptica relativa a 10^6 células/mL. Para isto, os estreptococos foram semeados em ágar BHI – Brain Heart Infusion (Difco, Detroit, EUA) e a *C. albicans*, semeada em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubada por 24 h em estufa 37 °C. Os estreptococos foram incubados em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Após incubação, as colônias de micro-organismos foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl a 0,9%) e a quantidade de células suspensas verificada em um espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo). Para isto, os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda de 0,620 e 398 nm para *S. mutans*, 0,560 e 398 nm para *S. sanguinis* e 0,284 e 530 nm para *C. albicans*, foram utilizados. Estes parâmetros foram pré-estabelecidos por meio de uma

curva padrão com as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) *versus* absorbância.

Foram contaminadas 8 amostras de cada grupo para obtenção de biofilme heterotípico com a associação destes três micro-organismos, (inoculando na placa 16,5 μ L da suspensão de cada micro-organismo) (Figura 5). Em seguida, duas amostras de cada grupo foram utilizadas na sessão 4.5. Para avaliar a formação de biofilme precoce, as placas foram seladas e incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ durante 16 h.

Figura 5- Amostras contaminadas dispostas em uma placa de 96 poços



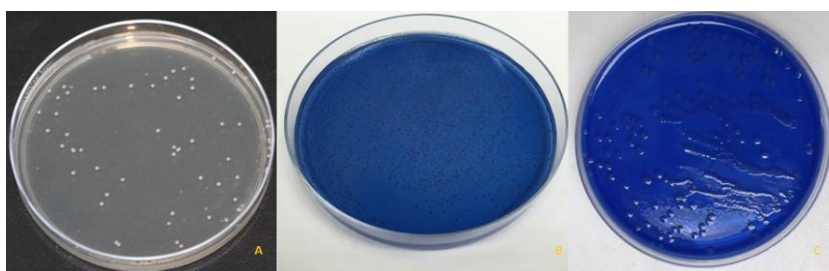
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Contagem de unidades formadoras de colônia

Trinta e duas amostras (n=8) foram lavadas substituindo-se 200 μ L do caldo de cada poço por solução fisiológica estéril e as placas foram agitadas por 5 min (agitador orbital, Solab, Piracicaba) para se remover células bacterianas não aderidas. Então, os espécimes foram individualmente transferidos para tubo falcon com 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%) e sonicados (Sonoplus HD 2200, 30 W, Bandelin Eletronic, Berlin, Germany) por 30 s para remoção dos biofilmes superficiais.

Uma série de diluições decimais e alíquotas de 0,1 ml das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foi realizada e semeadas, em duplicatas, em placas de Petri com meios seletivos para observarmos cada micro-organismo do biofilme heterotípico: ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) para *S. sanguinis*, ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) com 0,2 UI/mL de bacitracina (União Química, São Paulo) e sacarose (MSBS) para *S. mutans*, e ágar Sabouraud dextrose com 50 mg/l de coranfenicol (União Química, São Paulo) para *C. albicans* (Figura 6). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h e, em seguida, foram contadas (à mão) e o número de UFC/mL, determinado.

Figura 6- Colônias de micro-organismos formadas nos meios de cultura



Legenda: a) *C. albicans* em ágar Sabouraud e coranfenicol; b) *S. mutans* em ágar Mitis Salivarius, bacitracina e sacarose; c) *S. sanguinis* em ágar Mitis Salivarius.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Avaliação da viabilidade de células fibroblásticas gengivais humanas (FMM-1) através do teste MTT

Para realização do teste MTT (ISO 10993:1999), utilizou-se o fluxo laminar durante toda manipulação. Primeiramente cultivaram-se os fibroblastos gengivais humanos (FMM-1) em estufa nas condições de 5% de CO₂ e a 37 °C. Foram estabilizadas as culturas primárias de FMM-1 para crescimento e expansão celular. Para isto, as células foram descongeladas e cultivadas em duas

garrafas de cultura de 50 mL com 5 mL de meio de cultura, DMEM (DMEM high glucose, GlutaMAXTMSupplement, pyruvate, Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 10% Soro fetal Bovino - SFB (Gibco), e 1% de penicilina estreptomicina (*LGC*[®] - Cotia,). Para manutenção da cultura celular, o meio de cultura foi substituído a cada 48 h e, as células cultivadas durante 7 dias. Para a verificação das células viáveis para o teste, foi utilizado o teste azul de Trypan (0,4%) que consiste em aplicar 30 µL do corante em 30 µL de solução de células em um tubo eppendorf de 2 mL. Em seguida, 10 µL da mistura foi aplicada sobre uma placa de Neubauer para quantificação celular. Após comprovação de quantidade celular suficiente para realizar o experimento, as garrafas foram lavadas com solução tampão fosfato-salino – PBS (Cultilab Ltda, Campinas) e, 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 e então, a suspensão foi centrifugada (2000 rpm por 5 min a 25 °C) e o sobrenadante, descartado. Em seguida, o *pellet* foi suspenso em 1 mL de meio de cultura (DMEM). A suspensão de células foi transferida para um tubo falcon de 30 mL com 29 mL de meio. Foram então obtidas 240.000 células referentes a 20.000 células por poço.

Para realização do teste MTT, foi padronizado o uso de placas de 24 poços para ambos os períodos, pois, o poço de uma placa de 96 poços não possui espaço suficiente para que as células cresçam sem competir por nutrientes, no período de 7 dias. Desta forma, para que o local de cultivo não fosse outro fator possível de alterar a viabilidade celular, além do contato com os materiais, foram utilizadas seis amostras por material, dispostas em pares em três poços de placas de 24 poços.

Doze amostras de cada grupo nas dimensões de 4,5 x 4,5 x 1,5 mm foram utilizadas para avaliação da adesão de células fibroblásticas (n=6 por período de avaliação, N=48). As células FMM-1 foram plaqueadas sobre as respectivas amostras, dispostas no interior das placas de 24 poços. Para cada poço com duas amostras, foi adicionado 1 mL da suspensão contendo 20.000 células. As placas foram incubadas à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h e 7 dias. Para o período de 7 dias, o meio foi renovado a cada 48 h. A sobrevivência celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH), que é indicativa da função mitocondrial, o que é observada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio; Sigma, St Louis, USA). A viabilidade celular foi quantificada pela dissolução do MTT em 0,1 N NaOH (6,25 v/v%) em DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e a viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (=100%) que consistiu em poços sem material cerâmico.

Após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi descartado e as cerâmicas retiradas dos poços. As monocamadas celulares no fundo dos poços foram lavadas com 500 µl de PBS. Em seguida, foi adicionado a cada poço 500 µl da solução de MTT, que foi preparada conforme recomendação do fabricante (0,5 mg/mL de PBS). As placas foram incubadas durante 1 h a 37 °C em ambiente sem luz. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com 500 µl de PBS. Foi acrescentado 500 µml de DMSO incluindo nos poços controles e as placas foram incubadas por 10 min. Logo em seguida, as placas foram agitadas na mesa orbital durante 10 min. 100 µl 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, resultando em 9 poços por material e período. A leitura resultante foi mensurada através de um comprimento de onda de 570 nm (EL808IU, Biotek, Vermont, EUA).

4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para analisar morfológicamente a superfície dos materiais, antes do processo de esterilização (n=2), contaminados com biofilme heterotípico (n=2) e em contato com os fibroblastos gengivais humanos nos períodos de 24 h e 7 dias (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 h).

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

4.6 Análise dos resultados

Devido a distribuição não-normal, os dados dos dois parâmetros de rugosidade (em μm) foram submetidos aos testes Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($\alpha=95\%$) para comparações entre os grupos. Confirmada a normalidade da

distribuição e a homogeneidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados de energia livre de superfície (em mN/m) foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) 2 fatores (material x superfície) e teste Tukey para detecção das diferenças ($\alpha=95\%$). Os dados de UFC (em log) e MTT (em %) foram analisados estatisticamente por ANOVA 3 fatores, seguido por teste Tukey (caso $p \leq 0,05$) pelo *software* Minitab (Minitab 17 para Windows, 2004). Para UFC, os três fatores analisados foram “Material*Superfície*Micro-organismo” em 7 níveis. Para MTT, foram avaliados os três fatores “Material*Superfície*Tempo” em 6 níveis. Para as imagens obtidas através de perfilometria e MEV, foram realizadas análises descritivas.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da superfície dos materiais

5.1.1 Análise da rugosidade

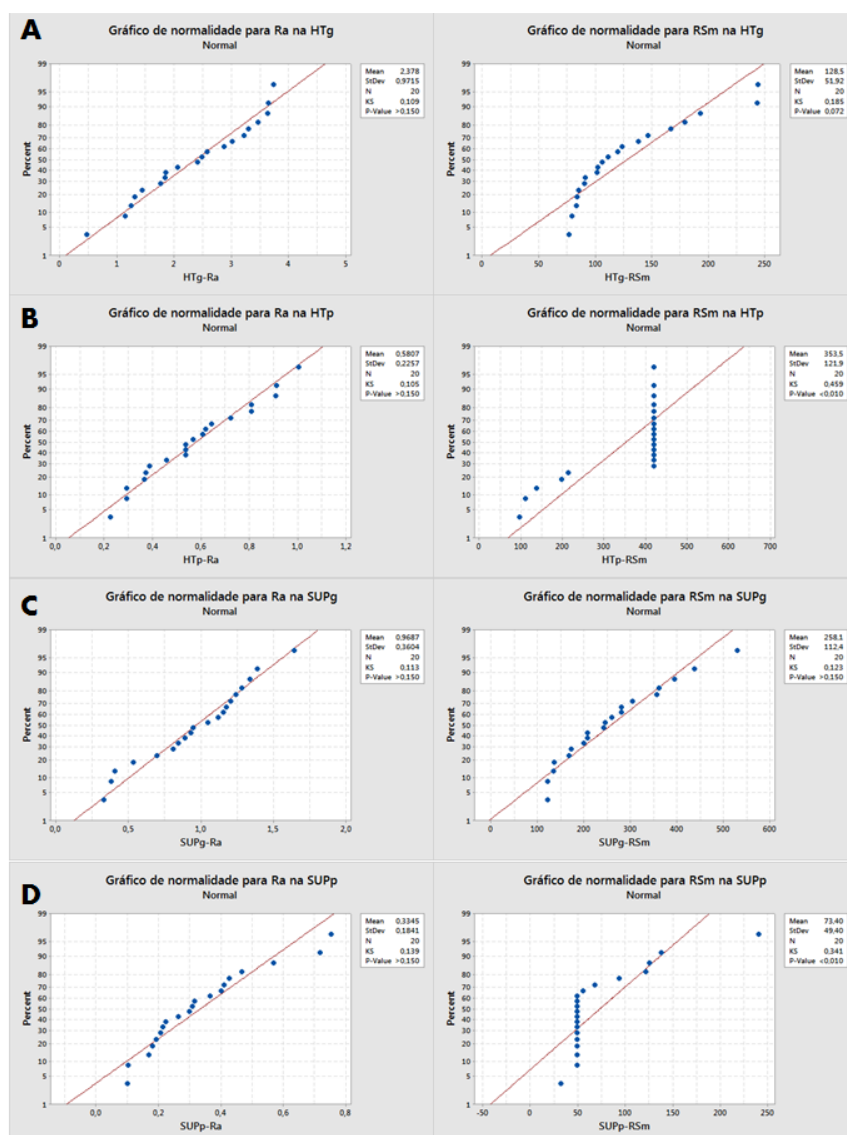
A análise estatística descritiva, apresentada na Tabela 1, mostra os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variância a 95% dos dados de rugosidade para os parâmetros avaliados. Conforme o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (Figura 7), apenas os dados de rugosidade dos grupos glazeados (HTg e SUPg) seguiram a distribuição normal.

Tabela 1- Valores de média $\pm$ desvio padrão (dp), em μm , e coeficiente de variância a 95% (95% CV) dos valores de rugosidade para os parâmetros Ra e RSm

Material	Ra		RSm	
	Média $\pm$ dp	95% CV	Média $\pm$ dp	95% CV
HTg	2,37 $\pm$ 0,97	40,85%	128,5 $\pm$ 51,92	40,49%
HTp	0,58 $\pm$ 0,23	39,82%	103,2 $\pm$ 101,60	98,48%
SUPg	0,96 $\pm$ 0,36	37,21%	258,1 $\pm$ 112,40	43,55%
SUPp	0,33 $\pm$ 0,18	55,03%	73,40 $\pm$ 49,40	67,30%

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7- Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para os valores de rugosidade

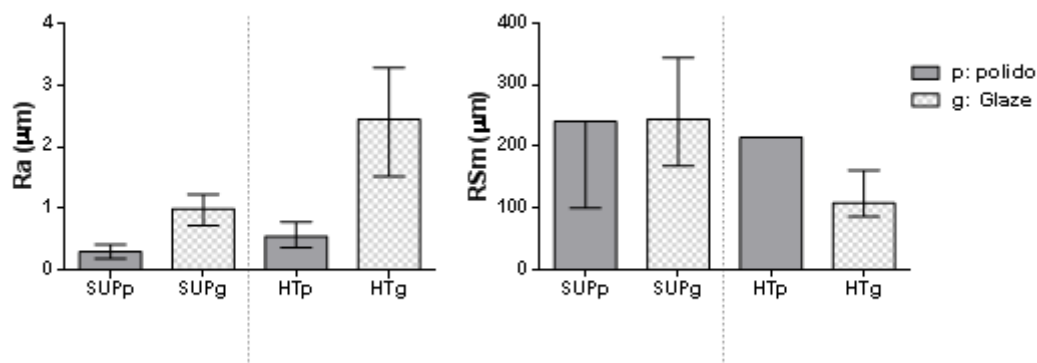


Legenda: a) HTg; b) HTp; c) SUPg; d) SUPp.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido a não normalidade dos dados estes foram submetidos aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e teste de Dunn, e Mann-Whitney (todos, $\alpha=95\%$). A Figura 8 apresenta um gráfico de barras de mediana e faixa interquartil dos dados de rugosidade das cerâmicas de acordo com os parâmetros avaliados.

Figura 8- Gráfico de barras da mediana e faixa interquartil dos dados de rugosidade de acordo com os fatores “material” e “superfície”



Fonte: Elaborada pelo autor.

O teste de Kruskal-Wallis detectou que os dois parâmetros de rugosidade foram influenciados pelos tratamentos de superfície e materiais cerâmicos utilizados ($p > 0,05$; Tabela 2). A cerâmica HTg apresentou ranhuras, em média, mais altas (Ra) e menos espaçadas (RSm) em comparação com as demais.

Tabela 2- Estatística descritiva (mediana, em µm), resultados da análise de Kruskal-Wallis (p-valor e estatística KW) e agrupamentos homogêneos do teste de Dunn para os valores de rugosidade

Parâmetros	HTg	HTp	SUPg	SUPp	p-valor	KW
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana		
Ra	2,45 ^A	0,55 ^C	1,00 ^B	0,31 ^C	<0,001	55,65
RSm	109,0 ^B	215,0 ^A	244,6 ^A	240,4 ^A	0,0002	19,37

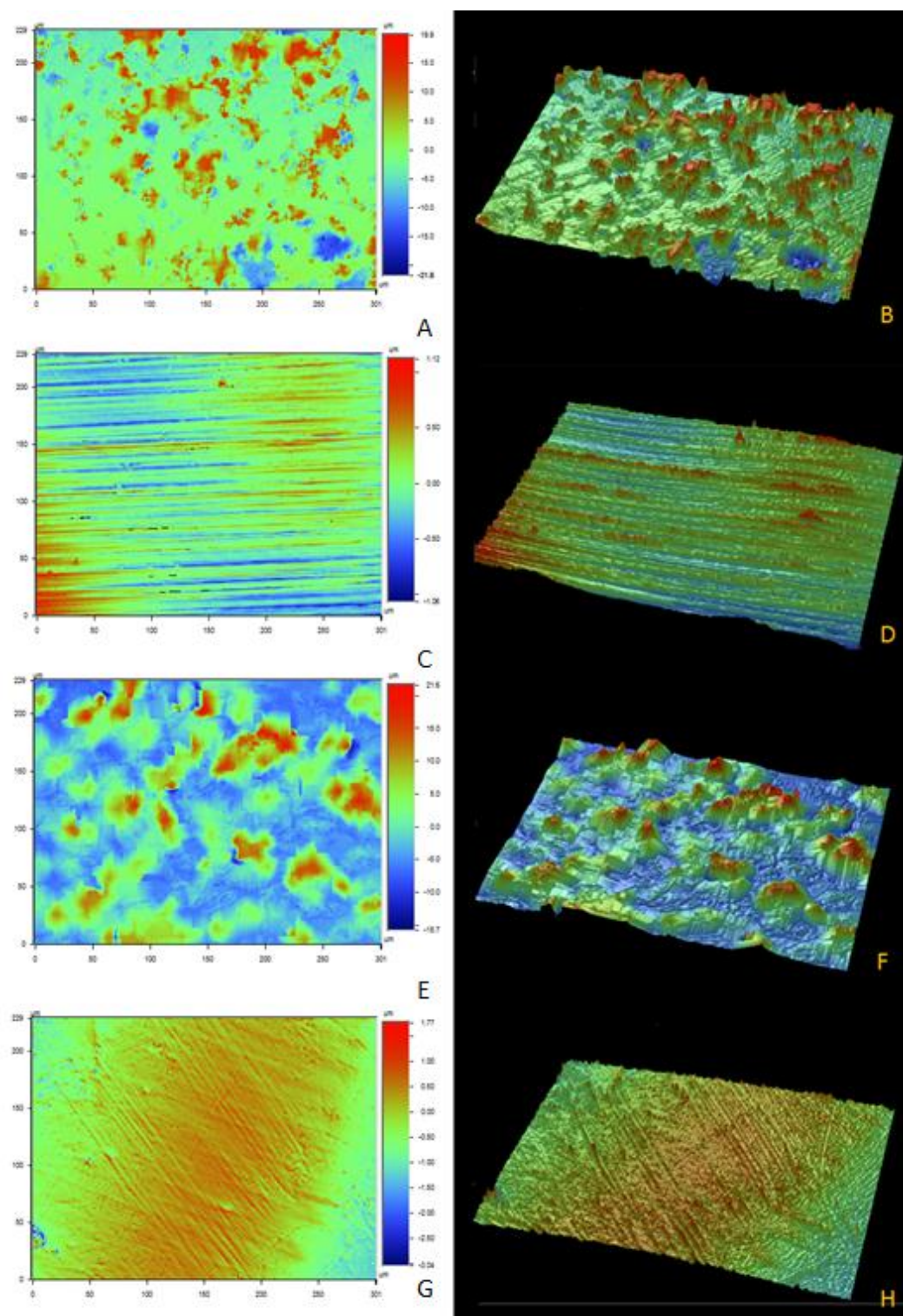
Legenda: Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatisticamente significativa na comparação dentro de um mesmo parâmetro (linha).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Perfilometria

Através das imagens 2D e 3D de perfilometria (Figura 9) é possível observar a diferença apontada estatisticamente pela análise da rugosidade superficial das cerâmicas glazeadas e polidas. Os detalhes em vermelho correspondem aos picos e em azul estão representados os vales. As superfícies glazeadas apresentam-se mais rugosas em comparação com as polidas. Dentre as cerâmicas glazeadas, a superfície da HT é mais heterogênea. Já para as superfícies polidas, a cerâmica SUP apresentou-se com distribuição de cores mais homogênea, porém com a presença de ranhuras de polimento assim como a cerâmica HT.

Figura 9- Imagens de perfilometria em 2D e 3D



Legenda: Imagens de perfilometria em 2D e 3D, respectivamente A-B) HTg; C-D) HTp; E-F) SUPg e, G-H) SUPp.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Análise da energia livre de superfície

Os ângulos de contato médio e desvio padrão das cerâmicas em contato com água e diiodometano, as energias dispersiva e polar de cada grupo experimental e a energia livre de superfície resultante encontram-se descritas na Tabela 3.

Ambas as cerâmicas, glazeadas ou polidas, apresentam comportamento predominantemente hidrofílico. A análise ANOVA 2 fatores (Tabela 4) observou que a interação “Material*Superfície” influenciou a ELS dos materiais estudados ($p=0,001$). O teste de Tukey apontou que HTg^B e HTp^A apresentaram ELS superiores a SUPg^C e SUPp^{BC}.

Tabela 3- 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 energia livre de superfície (γ_T , em mN/m) das cerâmicas e tratamentos de superfície avaliados

	Ângulo de contato médio		Componentes		
	Água	Diiodometano			
Material	Média $\pm$ dp (°)	Média $\pm$ dp (°)	γ_d (mN/m)	γ_p (mN/m)	γ_T (mN/m)
HTg	51 $\pm$ 11	47 $\pm$ 2	37,5	38,0	75,5
HTp	86 $\pm$ 10	54 $\pm$ 5	33,2	57,4	90,6
SUPg	32 $\pm$ 24	49 $\pm$ 7	37,5	33,0	71,5
SUPp	19 $\pm$ 4	53 $\pm$ 5	34,0	39,0	73,0

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

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4- Teste ANOVA 2 fatores (material e superfície) dos dados de ELS

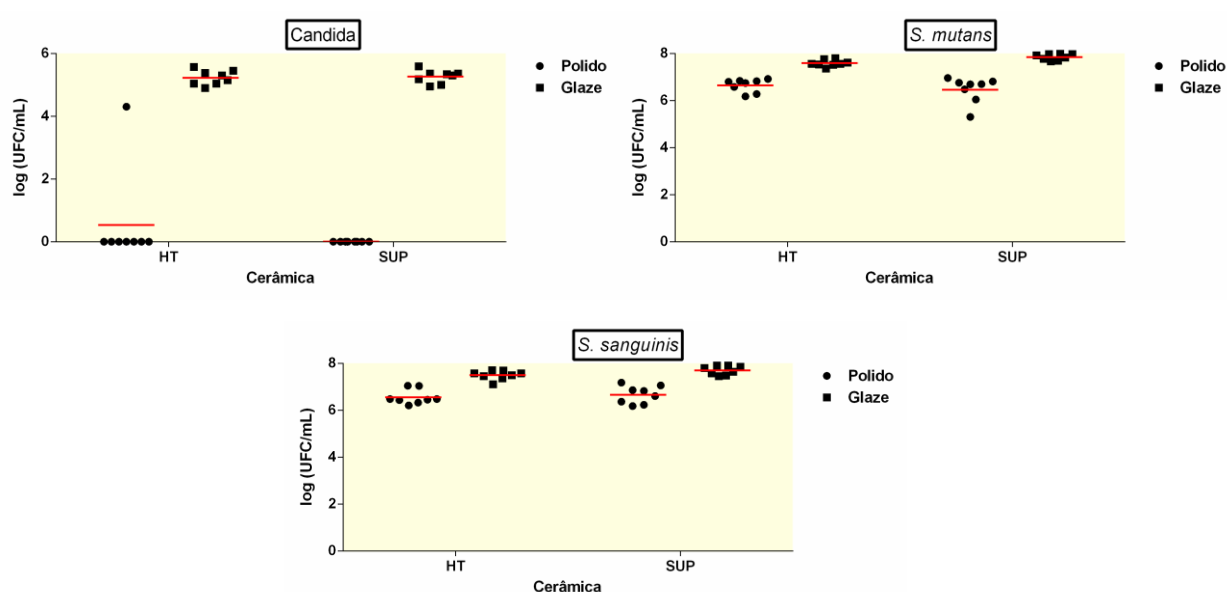
	DF	Adj SS	Adj MS	F	p-valor
Material	1	2338,4	2338,42	42,34	0,000
Superfície	1	187,4	187,39	3,39	0,084
Material*Superfície	1	826,1	826,13	14,96	0,001
Erro	16	883,6	55,23		
Total	19	4235,6			

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.4 Contagem de unidades formadoras de colônia

O gráfico da Figura 10 apresenta a distribuição dos dados de UFC transformados em logarítmo de base 10 do biofilme heterotípico comparando as cerâmicas e os tratamentos de superfície. Observa-se que não houve aderência de *C. albicans* sobre as cerâmicas polidas.

Figura 10. Gráfico de distribuição dos dados de UFC por micro-organismos do biofilme heterotípico de acordo com a cerâmica e tratamento superficial realizado



Legenda: Elaborado pelo autor.

O teste ANOVA 3 fatores (material x superfície x micro-organismo; 7 níveis) observou interação dos fatores “Superfície*Micro-organismo” na aderência de micro-organismos sobre as cerâmicas ($p=0,00$; Tabela 5).

Tabela 5- Tabela ANOVA 3 fatores (material, superfície e micro-organismo) dos dados de UFC do biofilme heterotípico

Fator	DF	Adj SS	dj MS	F	p-valor
Material	1	0,00	0,00	0,03	0,86
Superfície	1	135,67	135,67	519,30	0,00
Micro-organismo	2	406,29	203,14	777,57	0,00
Material*Superfície	1	0,82	0,82	3,17	0,07
Material*Micro-organismo	2	0,71	0,35	1,37	0,26
Superfície*Micro-organismo	2	81,14	40,57	155,29	0,00
Material*Superfície*Micro-organismo	2	0,23	0,11	0,45	0,63
Erro	84	21,94	0,26		
Total	95	646,84			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores médios de UFC, transformados em logarítimo de base 10, na comparação entre os grupos experimentais conforme a interação de fatores “Superfície*Micro-organismo” estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6- Valor médio $\pm$ desvio padrão (DP) em log de base 10 (log10) da quantidade de UFC e grupamentos homogêneos do teste Tukey para a interação de fatores “Superfície*Micro-organismo”

	Média $\pm$ DP (log10)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>C. albicans</i>
Glazeada	7,72 $\pm$ 0,13 ^A	7,60 $\pm$ 0,19 ^A	5,24 $\pm$ 0,23 ^C
Polida	6,55 $\pm$ 0,27 ^B	6,60 $\pm$ 0,31 ^B	0,26 $\pm$ 1,52 ^D

Legenda: Letras maiúsculas idênticas indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Sobre superfícies glazeadas, *S. mutans* e *S. sanguinis* formaram o maior número de UFC. Em seguida, *S. sanguinis* e *S. mutans* sobre superfícies polidas. Por fim, a *C. albicans* foi o micro-organismo que menos formou UFC sobre as cerâmicas, com aderência estatisticamente superior nas superfícies glazeadas em comparação com as polidas.

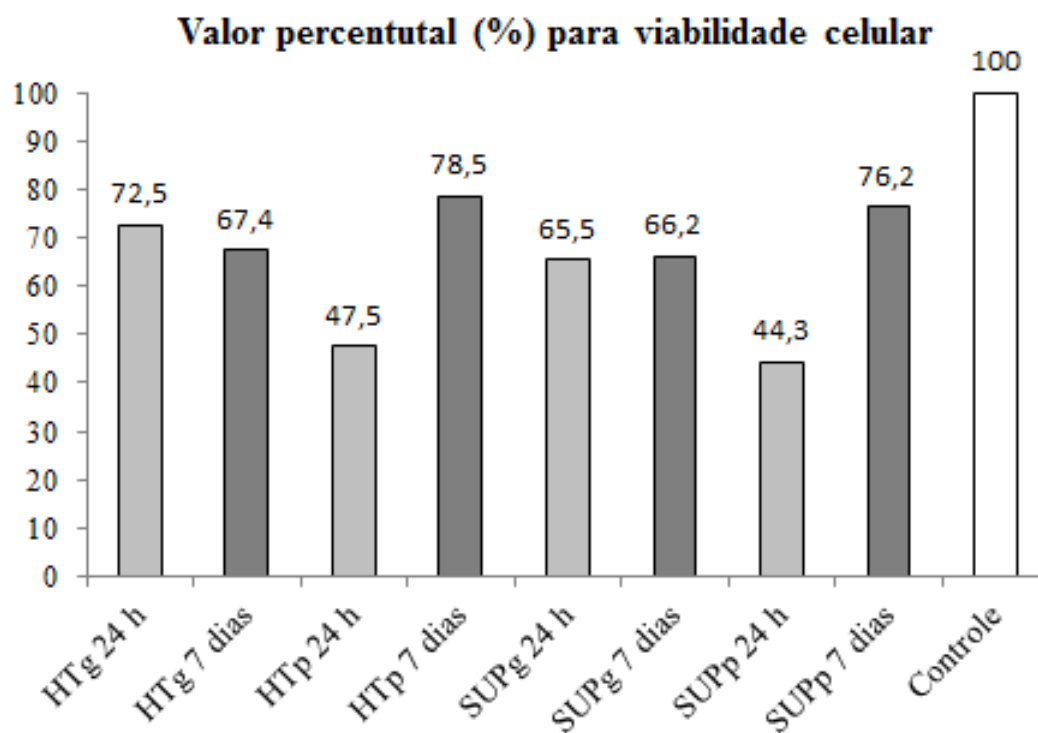
5.1.5 Avaliação da viabilidade de células fibroblásticas gengivais humanas (FMM-1) através do teste MTT

Os resultados do teste MTT apontaram que os fibroblastos gengivais humanos em contato com as cerâmicas por prazos curto (24 h) ou longo (7 dias) não causaram danos suficientes para caracterizá-las como materiais citotóxicos, exceto para os grupos polidos após 24 h que apresentaram viabilidade celular menor que 50% (Daguano et al., 2007) (Figura 11).

A distribuição normal dos dados foi comprovada através do teste Kolmogorov-Smirnov. Os testes t de Student comprovaram diferença de viabilidade celular nos dois períodos de avaliação (24 h e 7 dias) em relação ao

controle, considerado 100%, para todos os grupos experimentais ($p>0,05$).

Figura 11- Gráfico de barras dos valores percentuais de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%) através do teste MTT no período de 24 h e 7 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

O teste ANOVA 3 fatores (tempo, material e superfície) apontou que apenas o fator tempo influenciou o crescimento de células FMM-1 sobre as cerâmicas ($p=0,000$; Tabela 7). O teste de Tukey identificou que as cerâmicas em contato com as células durante 7 dias apresentaram um maior número de células viáveis em comparação com o período de 24 h, independente do material ou do tratamento superficial. O grupo HTg foi o único grupo que apresentou um decréscimo de viabilidade celular média (5,1%) entre 24 h e 7 dias, enquanto HTp, SUPg e SUPp apresentaram aumentos de 31%, 0,7% e, 32%, respectivamente.

Tabela 7- Teste ANOVA 3 fatores (material, superfície e tempo) dos dados de MTT

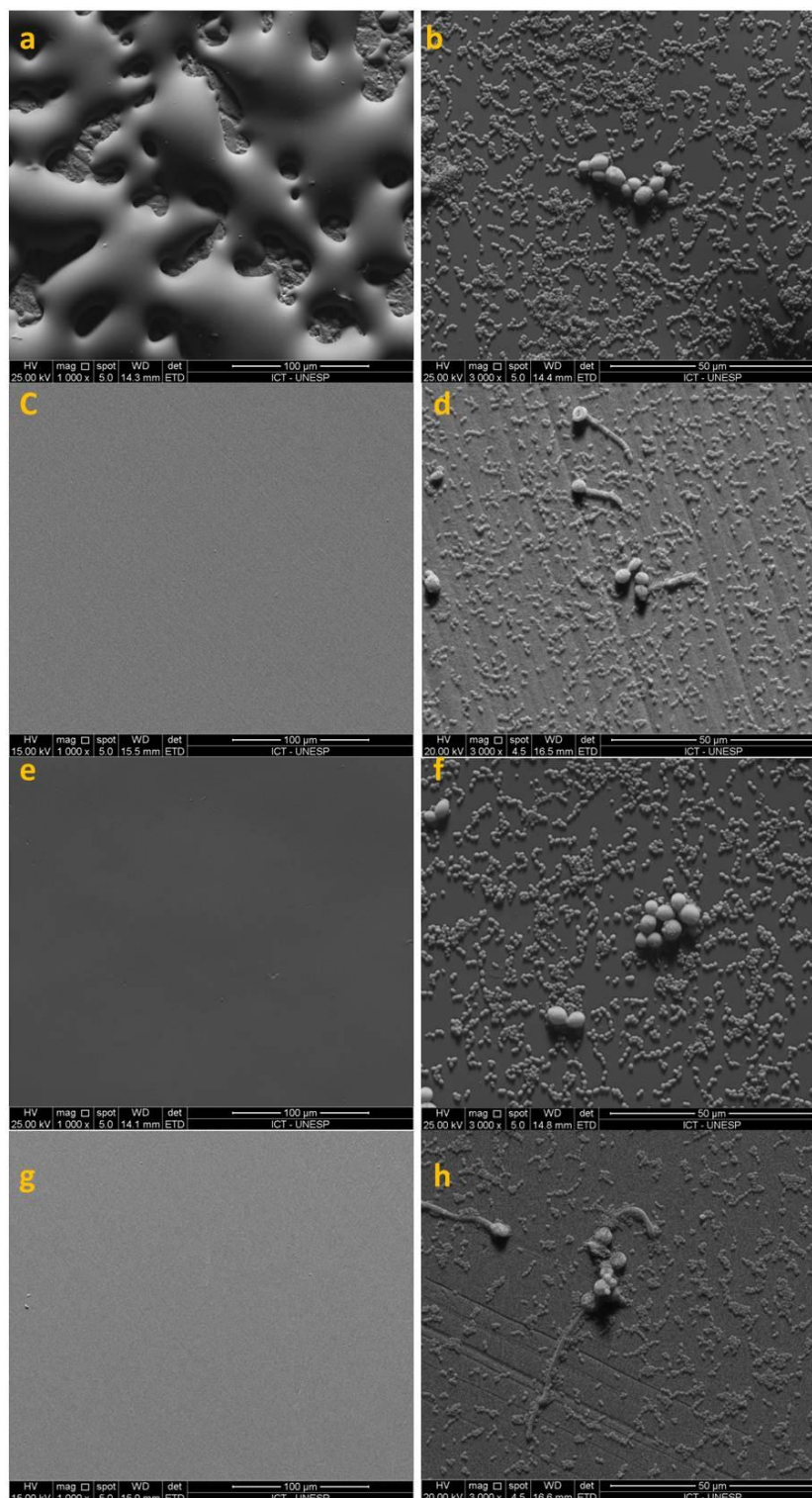
Fator	DF	Adj SS	dj MS	F	p-valor
Material	1	0,00	0,00	1,85	0,178
Tempo	1	0,06	0,06	15,89	0,00
Superfície	1	0,00	0,00	0,06	0,81
Material*Tempo	1	0,00	0,00	1,64	0,20
Material*Superfície	1	0,00	0,00	0,78	0,37
Tempo*Superfície	1	0,00	0,00	0,43	0,51
Material*Tempo*Superfície	1	0,00	0,00	0,77	0,38
Erro	64	0,26	0,00		
Total	75	0,35			

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Nas micrografias da superfície dos materiais estéreis (magnificação de 1000x, Figura 12, coluna esquerda) e contaminados (magnificação de 3000x, Figura 12, coluna direita), observam-se diferentes padrões de superfície. A camada de *glaze* sobre a cerâmica HTg se apresentou menos homogênea em comparação com a SUPg. O padrão de rugosidade gerado pelo polimento foi homogêneo e semelhante entre HTp e SUPp, como pode ser observado no aumento maior. Observa-se a presença de *Streptococcus* e *Candida albicans* nas amostras contaminadas (Figura 12, coluna direita). Nas micrografias das amostras submetidas ao teste MTT (Figura 13), observa-se aumento do número de células FMM-1 aderidas à superfície dos materiais em relação ao tempo de crescimento. Também é possível verificar também que a aderência das células ocorreu independente da morfologia superficial das amostras.

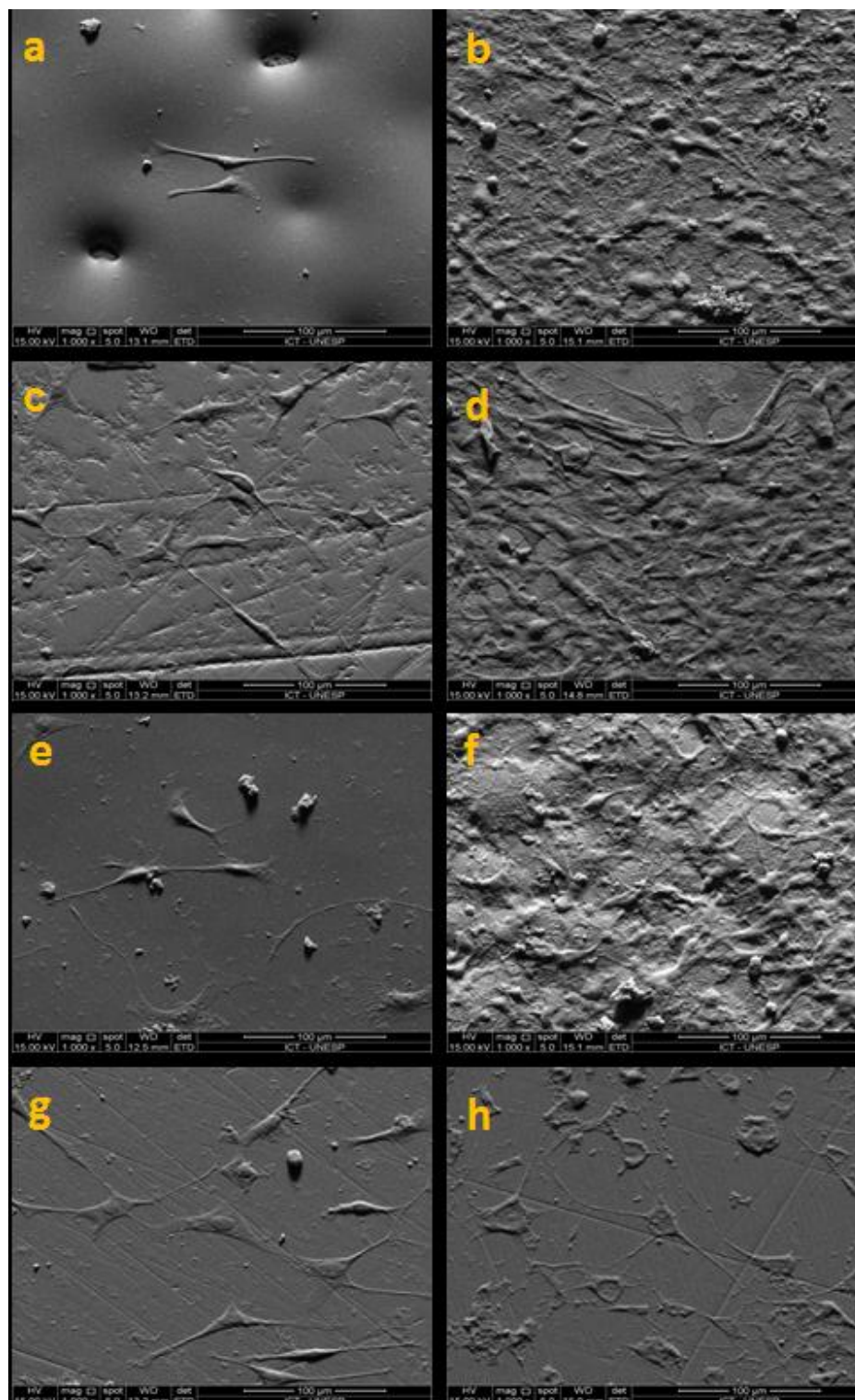
Figura 12- Micrografias da superfície das cerâmicas sem biofilme (aumento de 1000x, coluna esquerda) e contaminadas com biofilme heterotípico (3000x, coluna direita)



Legenda: a-b) HTg; c-d) HTP; e-f) SUPg e; g-h) SUPp.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13- Imagens de MEV das células FMM-1 em contato com a cerâmica



Legenda: (a-b HTg); HTp (c-d); SUPg (e-f); SUPp (g-h) nos períodos de 24 h e 7 dias, respectivamente. Aumento de 1000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

O sucesso clínico em longo prazo das cerâmicas odontológicas depende de suas propriedades físicas, processo de fabricação, técnica de confecção e indicação laboratorial, e por fim, dos procedimentos clínicos. A composição de um material, assim como sua superfície, pode influenciar na adesão bacteriana inicial comprometendo a saúde bucal (Aykent et al., 2010; Anami et al., 2012; Rashid, 2014). A cerâmica odontológica é o material restaurador de preferência devido às propriedades mecânicas, qualidade estética e biocompatibilidade, apresentando superfícies lisas que minimizam o acúmulo de biofilme oral (Aksoy et al., 2006).

A zircônia apresenta uma superfície menos homogênea comparada aos outros materiais devido a presença de poros provenientes do processo de sinterização (Grenade et al., 2016) ou defeitos causados pelo polimento, pois quanto maiores os grãos que compõem este material, maior a probabilidade da exposição destes grãos durante protocolos de acabamento e polimento (Al-Haj Husan et al., 2016). Este fato assim como a dureza e resistência ao desgaste deste material, podem justificar o perfil mais rugoso da zircônia de alta translucidez (HT) (com maior número de picos e vales) comparada à cerâmica a base de silicato de lítio reforçada por zircônia (SUP) na análise de rugosidade e nas avaliações qualitativas.

Os achados qualitativos da perfilometria e MEV corroboram com os dados de rugosidade superficial, onde a cerâmica HT glazeada apresentou a maior altura média absoluta das irregularidades ao longo do perfil (parâmetro de altura R_a). A superfície glazeada da Suprinity (SUPg) apresentou, nestas imagens, irregularidades mais espaçadas, o que foi confirmado por respectivos

valores superiores de espaçamento de irregularidades dentro da amostragem (parâmetro de espaçamento RSm).

Devido às vantagens da aplicação do *glaze* (Mehulic et al., 2010; Anusavice et al., 2013) e por se tratar de um protocolo que também é recomendado pelo fabricante, a camada vítrea foi aplicada nos dois materiais simulando o uso clínico do material quanto ao tratamento de superfície comumente utilizado. Para padronizar o polimento das superfícies de HT e SUP, o kit de polimento da cerâmica Suprinity foi utilizado conforme sugerido pelo fabricante como protocolo padrão para as duas cerâmicas.

Independente do material cerâmico, a finalização das amostras por aplicação de *glaze* resultou em superfícies mais rugosas em comparação com aquelas obtidas pelo polimento nos dois parâmetros avaliados: Ra (altura) e RSm (espaçamento). Segundo Wennerberg e Albrektsson (2000), a análise topográfica tridimensional (3D) é preferível e deve ser realizada em pelo menos 3 amostras por grupo; o *cutt-off* deve ser determinado e os parâmetros de altura e espaçamento devem ser empregados sempre que possível para a correta caracterização da superfície. Um único parâmetro não é suficiente para a real detecção da topografia superficial, pois diferentes superfícies podem apresentar a mesma rugosidade através de um parâmetro e, no entanto, terem perfis distintos quando avaliados por uma associação de parâmetros (Wennerberg, Albrektsson, 2000).

A aplicação de *glaze* resultou em uma superfície ainda mais rugosa (Ra) para a cerâmica policristalina (HTg) em comparação com a cerâmica vítrea (SUPg). Um fator que pode ter contribuído para este resultado é a união química que ocorre entre o *glaze* (composto vítreo) e a cerâmica vítrea (SUP) durante a cocção, gerando uma superfície mais homogênea em comparação com o *glaze* aplicado sobre a zircônia que se acumulou em “ilhas”. A existência destas “ilhas” faz com que exista um desnível na superfície do espécime entre a

cerâmica HT e o *glaze*, resultando em uma maior diferença de altura entre picos e vales (maior Ra). A camada de *glaze* sobre a cerâmica vítrea (SUP) se distribui mais uniformemente, aumentando o espaçamento entre picos e vales (maior RSm). Até o momento não existem dados na literatura sobre a relação entre a cerâmica à base de silicato de lítio reforçada com zircônia (SUP) e o composto vítreo *glaze*, mas sugere-se que a afinidade das superfícies de SUP e HT ao *glaze* seja diferente.

A literatura acerca da rugosidade superficial destes materiais lançados recentemente no mercado é escassa. Para outras cerâmicas monolíticas glazeadas foram observados valores médios de 4,31 μm de R_{max} para Y-TZP Zirluna' (ACF Amberger Central Fraescenter, Amberg, Alemanha) (Hmaidouchet al., 2014), 0,317 μm de R_{max} para Y-TZP Crystal Zirconia (DLMS, Scottsdale, EUA) glazeada (Ceramco 3 Glaze DeguDent) e Ra de 0,665 μm para dissilicato de lítio (IPS e-max CAD) (Amer et al., 2015). Em outro estudo, a Suprinity polida com lixas de carbetto de silício até a granulação 1.000 e polimento em politriz automática com uso de líquido de polimento (sem descrição) apresentou Ra de 0,09 μm (Ramakrishnaiah et al., 2016). O dissilicato de lítio que é o material que mais se aproxima microestruturalmente da Suprinity (SUP), apresenta grãos mais alongados e arredondados comparados aos grãos pontiagudos do dissilicato de lítio (Ramos et al., 2016), o que pode resultar em padrões de rugosidade superficial não idênticos.

Para compreender a reatividade de uma superfície aos fluídos orais e sua consequente relação com a formação de biofilme, é importante a avaliação da energia livre de superfície (ELS) deste material (de Avila et al., 2016). É importante observar que ELS não deve ser confundida com o conceito de hidrofobicidade, uma vez que hidrofobicidade está diretamente associada com um líquido particular, no caso, a água. Já a ELS, também chamada de

molhabilidade (Aksoy et al., 2006; Teughels et al., 2006) ou tensão superficial (Craig, 1993), consiste em uma propriedade intrínseca do material.

A ELS pode ser calculada através da aferição do ângulo de contato médio formado entre líquidos e a superfície do material (Combe et al., 2004; de Avila et al., 2016). Os valores médios dos ângulos de contato da água destilada (líquido polar) e do diiodometano (líquido apolar) sobre as cerâmicas foram utilizados para calcular a energia através do conceito de componentes polar e dispersiva de cada material, proposto por Owens e Wendt (1969).

Para a água, a menor hidrofobicidade média foi verificada para a Suprinity polida (SUPp, 19°). De acordo com Shirtcliffe et al., (2010), uma superfície cujo ângulo de contato médio (θ) para água é igual a zero pode ser considerada completamente hidrofílica. Se o $\theta=180^\circ$, a superfície será hidrofóbica. Por fim, se $0<\theta<180^\circ$, esta superfície será caracterizada como parcialmente hidrofílica.

A soma das componentes dispersiva e polar de um material resulta na ELS do mesmo. Estas componentes podem ser encontradas através da substituição dos valores de ângulo de contato médio na equação harmônica. Para tanto, devem ser utilizados os respectivos valores das componentes dispersivas dos líquidos utilizados que, neste estudo foram obtidas a partir da literatura.

Uma superfície com tendência hidrofóbica pode ter esta característica elevada através do aumento da rugosidade (Aksoy et al., 2006; Shirtcliffe et al., 2010), afetando sua molhabilidade e assim, favorecendo a retenção bacteriana (Aksoy et al., 2006). O ângulo de contato médio fornece uma média de molhabilidade de uma superfície, mas não é suficiente para representar esta propriedade do material, visto que duas superfícies diferentes podem apresentar o mesmo ângulo de contato médio, como observado por Aksoy et al. (2006).

Logo, faz-se importante o conhecimento dos clínicos quanto as consequências de procedimentos inadequados que resultem em superfícies mais

rugosas (Schmitter et al., 2015), contaminadas com impurezas ou modificadas por exposição às alterações na temperatura, que podem elevar a ELS (Craig, 1993) e assim facilitar a aderência bacteriana. Segundo Anusavice (1996), a ELS está diretamente associada com a propriedade de adesão. Quanto maior a ELS, maior a capacidade adesiva. Deste modo, a zircônia polida (HTp) pode ser sugerida como a condição que confere melhor propriedade adesiva por apresentar maior ELS.

Devido aos avanços tecnológicos e clínicos, a cerâmica é o material indireto que tende a promover a melhor adaptação marginal, acabamento e polimento. Apesar destas vantagens, as bactérias presentes na cavidade oral naturalmente tendem a aderir a estes materiais, principalmente na interface entre dente e restauração (Busscher et al., 2010; Vo et al., 2015).

Para que ocorra aderência bacteriana na superfície de um material, é necessária a interação hidrofóbica bem sucedida com a superfície do substrato (Doyle, 2000). Com relação à *C. albicans*, sua hidrofobicidade celular mostra-se como um importante fator na classificação deste patógeno como oportunista para a aderência em superfícies (Masuoka, Hazen, 1997), assim como ocorre para *Streptococcus mutans* (Meier et al., 2008) e *Streptococcus sanguinis* (de Avila et al., 2016).

Os micro-organismos que compoem o biofilme oral concentram-se em regiões do dente protegidas da ação mecânica da língua, bochechas, alimentos duros, escovação, como: face oclusal (durante o processo de erupção), superfície proximal do terço cervical e, ao longo da margem gengival (Kidd, Fejerskov, 2004).

Segundo estudos anteriores, a rugosidade superficial possui influência no acúmulo de biofilme (Aykent et al., 2010; Anami et al., 2012; Vo et al., 2015). Um estudo que comparou a aderência de *C. albicans* à superfície de uma porcelana sem tratamento superficial, glazeada (no forno ou *overglazed*) e

polida verificou que a superfície glazeada apresentou valor inferior de aderência bacteriana em comparação com a superfície sem tratamento superficial, porém sem diferença significativa do grupo polido (Lawaf et al., 2016). Como observado neste e em estudos anteriores, a presença do *glaze* na superfície não previne a formação de biofilme dental (Lawaf et al., 2016). Sobre a superfície de próteses parciais removíveis com e sem *glaze*, após três meses *in vivo*, houve crescimento de biofilme em ambas, mas a remoção foi facilitada em próteses glazeadas (Sesma et al., 2005).

Este trabalho avaliou a direta relação entre o material (glazeado ou polido) e a aderência bacteriana na formação do biofilme inicial. Trabalhos recentes já validaram diferentes períodos, de até 24 h, para a formação deste tipo de biofilme, utilizando dois ou mais micro-organismos (Burgers et al., 2010; Al-Radha et al., 2012). O biofilme maduro é tão complexo que se faz importante o estudo do biofilme inicial para compreensão do processo de desenvolvimento (Kolenbrander et al., 2010). Além disso, no biofilme maduro, a aderência de micro-organismos ocorre sobre outras camadas de micro-organismos. Este modelo objetivou simular *in vitro* as condições ambientais para a formação de um biofilme inicial visando avaliar a interação entre micro-organismos e a superfície dos materiais, diferentemente de estudos que avaliam a formação e maturação do biofilme oral por longo período de tempo nos quais a microestrutura do material pode ter menor influência.

Neste estudo, foi investigada a aderência de um colonizador inicial (*S. sanguinis*), um colonizador associado com o desenvolvimento de lesões cariosas (*S. mutans*) e, por fim, um colonizador relacionado não somente à cárie, mas às doenças periodontais e candidose (*C. albicans*). A disponibilidade de trabalhos avaliando a aderência bacteriana em cerâmicas monolíticas é escassa. Não existem dados na literatura quanto à aderência bacteriana na superfície das cerâmicas estudadas neste trabalho.

Sabe-se que *S. mutans* apresentam comportamento hidrofóbico (Meier et al., 2008), assim como observado com relação ao *S. sanguinis* em estudo posterior (de Avila et al., 2016). A aderência de *S. mitis* e *Prevotella nigrescens* sobre a zircônia Metoxit AG (High Tech Ceramics, Thayngen, Suíça), por exemplo, é menor que sobre o titânio utilizado na confecção de implantes dentários (Goodfellow Cambridge Limited, Huntingdon, Inglaterra) (Al-Radha et al., 2012). Um estudo anterior verificou que a zircônia Lava (3M ESPE) glazeada apresenta maior rugosidade em comparação com a polida, com tendência ao acúmulo de biofilme (Scotti et al., 2007).

Através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), observou-se interação Superfície*Micro-organismo ($p=0,00$). Quando os micro-organismos foram comparados entre si, observou-se maior crescimento de *Streptococcus* independente do tipo de superfície e maior formação de colônias sobre as superfícies glazeadas em comparação com as superfícies polidas, corroborando com estudo anterior de Scotti et al., (2007). Isto pode estar associado ao fato de que *S. sanguinis* é colonizador inicial e por isso facilita o crescimento de outros *Streptococcus*. Neste trabalho, os *Streptococcus* cresceram de maneira semelhante, o que pode ser justificado pela natureza hidrofóbica de ambos (Meier et al., 2008). *C. albicans* também apresenta característica hidrofóbica, no entanto, seu crescimento em menor número pode estar associado com o fato de que *Streptococcus* são micro-organismos comensais (Kolenbrander et al., 2010). O comensalismo consiste em uma relação ecológica interespecífica onde as duas espécies se encontram associadas com benefícios para uma delas sem, porém, prejudicar a outra.

Já o baixo crescimento da *Candida albicans* também nas superfícies polidas pode ser justificado por uma menor facilidade, em comparação ao *S. mutans*, de aderência a superfícies muito lisas (Yuan et al., 2016), visto que *Streptococcus mutans* produz uma substância insolúvel em água que facilita a

união destes micro-organismos ao substrato liso (Mukasa, Slade, 1973). Diferente de uma superfície rugosa, a superfície polida não acumula muitos nutrientes. Esta disputa pelo alimento escasso, assim como a falta de espaço e efeito negativo de metabólitos provenientes das bactérias, também podem justificar uma competição entre *C. albicans* e *Streptococcus*, como observado principalmente nas amostras polidas. Por fim, na estrutura cerâmica, *C. albicans* atua como facilitador para a aderência de *S. mutans* por apresentam mecanismo de virulência e características bioquímicas semelhantes (Barbieri et al., 2007). No entanto, o estudo da *C. albicans* em biofilmes heterotípicos é importante visto que nas restaurações onde o preparo dentário apresenta contato com o tecido gengival, é interessante a observação de poucas colônias de *C. albicans*, pois necessita-se que o tecido esteja sempre saudável. Menor número de colônias de *C. albicans* em superfícies lisas comparadas com rugosas já foi relatado também para outros materiais utilizados na cavidade oral (Tari et al., 2007; Satpathy et al., 2013).

Relacionando os dados de rugosidade e ELS, com os dados da UFC que demonstrou não haver diferença entre as cerâmicas, observa-se maior número de micro-organismos aderidos sobre as superfícies mais rugosas (glazeadas) que apresentam ELS menor que as polidas. Desta forma, a rugosidade parece ser o principal fator relacionado com a formação de colônias. Quando se trata de superfícies lisas, sugere-se que a ELS possa ser o fator principal associado à aderência bacteriana inicial (Quirynen et al., 1989; Al-Radha et al., 2012; Yuan et al., 2016).

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é possível verificar a presença de *Streptococcus* e *C. albicans* (Figura 12, coluna direita). Observa-se que as cerâmicas foram colonizadas com biofilme fino, repleto de aglomerados celulares com tamanhos e morfologias semelhantes, com destaque

para a extensa colonização por *Streptococcus*, não sendo possível a distinção entre *S. mutans* e *S. sanguinis*.

C. albicans cultivada apresenta diferentes estruturas, como: blastóporos, pseudo-hifas, hifas, tubos germinativos; sendo todas estas estruturas recobertas por uma substância amorfa entre as células das duas espécies (Barbieri et al., 2007). Quando *C. albicans* deixa de ser levedura para se transformar em hifa, está caracterizando sua virulência (Jarosz et al., 2009). Em associação com *S. mutans*, *C. albicans* apresenta mais frequentemente a morfologia em forma de levedura ou blastóporos (Barbieri et al., 2007). A interação entre estes dois organismos se dá por mutualismo, que consiste na associação entre dois seres vivos na qual ambos são beneficiados, resultando em frequente dependência mútua. Segundo Barbieri et al. (2007), a substância amorfa é importante fator nesta relação. Nas imagens de MEV, observa-se esta matriz amorfa envolvendo ambas espécies, visivelmente maior na superfície da SUPg (Figura 12f). Esta matriz pode estar associada com a aderência de *C. albicans* ao biofilme. Existe forte coaderência entre estas espécies, principalmente entre *S. mutans* e as hifas do fungo (Metwalli et al., 2013). A presença deste fungo corrobora com a afirmação de que *C. albicans* atua como facilitador para a aderência de *S. mutans*, podendo estar diretamente associada com o aumento de risco da doença cárie.

Os resultados deste trabalho mostram que ambos os materiais estudados e ambos tratamentos de superfície avaliados podem ser considerados moderadamente citotóxicos (International Organization of Standardization 10993-5:1999) ao crescimento de fibroblastos gengivais humanos (FMM-1), visto que todos apresentaram viabilidade celular superior a 50%. A citotoxicidade inicial (24 h) que os materiais polidos (HTp e SUPp) apresentaram pode estar relacionada com o fato das células não apresentarem defesa imediata suficiente a algum resquício do procedimento de polimento. No

entanto, com o tempo, as células melhoram seus mecanismos de defesa e se tornam capazes de se protegerem do agressor (De Deus et al., 2005). Desta forma, fazem-se importantes estudos futuros avaliando quais substâncias podem ser liberadas e causar danos aos tecidos.

7 CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que:

- a) As superfícies menos rugosas foram encontradas para as cerâmicas à base de zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio de alta translucidez e à base de silicato de lítio reforçado por zircônia, sendo que a altura das irregularidades foi maior para a zircônia glazeada. A maior energia livre de superfície foi observada para a zircônia polida;
- b) As superfícies glazeadas promoveram uma maior aderência de *Streptococcus* em comparação com as superfícies polidas. *C. albicans* foi o micro-organismo com menor aderência aos materiais;
- c) Apesar das cerâmicas polidas apresentarem citotoxicidade no contato inicial (24 h) com as células FMM-1, após 7 dias as cerâmicas polidas ou glazeadas se tornaram inertes às células.

REFERÊNCIAS*

Aboushelib MN, de Jager N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of different components of core veneered all-ceramic restorations. *Dent Mater*. 2005 Oct;21(10):984-91.

Aboushelib MN, de Jager N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Effect of loading method on the fracture mechanics of two layered all-ceramic restorative systems. *Dent Mater*. 2007 Aug;23(8):952-9.

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. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 Dec;53(2):254-9.

Al-Haj Husain N, Camilleri J, Özcan M. Effect of polishing instruments and polishing regimens on surface topography and phase transformation of monolithic zirconia: An evaluation with XPS and XRD analysis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Dec;64:104-12. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.07.025.

Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Wieland M, Ximénez-Fyvie LA, Schwartz Z, Boyan BD. Influence of topography and hydrophilicity on initial oral biofilm formation on microstructured titanium surfaces *in vitro*. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Mar;23(3):301-7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02184.x.

Al-Radha AS, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent*. 2012 Feb;40(2):146-53. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.006.

Amer R, Kürklü D, Johnston W. Effect of simulated mastication on the surface roughness of three ceramic systems. *J Prosthet Dent*. 2015 Aug;114(2):260-5. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.02.018.

Amer R, Kürklü D, Kateeb E, Seghi RR. Three-body wear potential of dental yttrium-stabilized zirconia ceramic after grinding, polishing, and glazing treatments. *J Prosthet Dent*. 2014 Nov;112(5):1151-5. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.12.021.

* 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

Anami LC, Pereira CA, Guerra E, Assunção 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 Sep;40(9):742-9. doi: 10.1016/j.jdent.2012.05.005.

Anusavice KJ. Phillips' Science of dental materials. 10.ed. Philadelphia: W.B. Saunders;1996.

Anusavice K J, Shen C, Rawls H. Phillips' Science of dental materials. 12^a Edição.W.B. Saunders;2013.

Aroonsang W, Sotres J, El-Schich Z, Arnebrant T, Lindh L. Influence of substratum hydrophobicity on salivary pellicles: organization or composition? Biofouling. 2014 Oct;30(9):1123-32. doi: 10.1080/08927014.2014.974155.

Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. Curr Oral Health Rep. 2015 Mar 1;2(1):48-56.

Attik GN, Gritsch K, Colon P, Grosogeat B. Confocal time lapse imaging as an efficient method for the cytocompatibility evaluation of dental composites. J Vis Exp. 2014 Nov 9;(93):e51949. doi: 10.3791/51949.

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 Apr;103(4):221-7. doi: 10.1016/S0022-3913(10)60034-0.

Baldissara P, Llukacej A, Ciocca L, Valandro FL, Scotti R. Translucency of zirconia copings made with different CAD/CAM systems. J Prosthet Dent. 2010 Jul;104(1):6-12. doi: 10.1016/S0022-3913(10)60086-8.

Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Braz. J. Microbiol. 2007 Oct-Dec;38(4):624-31.

Bispo LB. Cerâmicas odontológicas: vantagens e limitações da zircônia. Rev Bras Odontol. 2015 Jan-Jun;72(1-2):24-9.

Boaventura JM, Nishida R, Elossais AA, Lima DM, Reis JM, Campos EA, et al. Effect finishing and polishing procedures on the surface roughness of IPS Empress 2 ceramic. Acta Odontol Scand. 2013 May-Jul;71(3-4):438-43. doi: 10.3109/00016357.2012.690570.

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;21:156-64.

Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. J Dent Res. 2010;89:657-65

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. Int Endod J. 2006 Oct;39(10):747-54.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. Int Endod J. 2005 Aug;38(8):505-9.

Chevalier J, Cales B, Drouin JM. Low-Temperature Aging of Y-TZP Ceramics. J Am Ceram Soc. 1999;82(8):2150-4.

Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-Temperature Degradation of Zirconia and Implications for Biomedical Implants. Annu Rev Mater. 2007;37:1-3.

Christensen RP, Ploeger BJ. A clinical comparison of zirconia, metal and alumina fixed-prosthesis frameworks veneered with layered or pressed ceramic: a three-year report. J Am Dent Assoc. 2010 Nov;141(11):1317-29.

Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. Future Microbiol. 2013 Jun;8(6):799-805. doi: 10.2217/fmb.13.36.

Combe EC, Owen BA, Hodges JS. A protocol for determining the surface free energy of dental materials. Dent Mater. 2004 Mar;20(3):262-8.

Costa CAS, Souza PPC. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C, editor. Metodologia Científica: ciência, ensino, pesquisa. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.211-30. cap 11.

Craig RG. Restorative dental materials. 9. ed. St. Louis, Missoure: Editora Mosby;1993.

da Cunha LF, Mukai E, Hamerschmitt RM, Correr GM. Fabrication of lithium silicate ceramic veneers with a CAD/CAM approach: A clinical report of

cleidocranial dysplasia. *J Prosthet Dent*. 2015 May;113(5):355-9. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.10.004.

Daguano JKMF, Santos C, Rogero SO. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. *Matéria (Rio J)*. 2007;12(1).

de Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidório DM, Mollo Fde A Jr. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent*. 2016 Apr;115(4):428-36. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.09.016.

De Aza AH, Chevalier J, Fantozzi G, Schehl M, Torrecillas R. Crack growth resistance of alumina, zircônia and zircônia toughened alumina ceramics for joint prostheses. *Biomaterials*. 2002;23:937-45.

De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*. 2005 Sep;38(9):604-9.

Denry I, Kelly JR. Emerging ceramic-based materials for dentistry. *J Dent Res*. 2014 Dec;93(12):1235-42. doi: 10.1177/0022034514553627.

Denry I, Kelly JR. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent Mater*. 2008 Mar;24(3):299-307.

de Oliveira JR, Almeida RBA, Vilela PGF, de Oliveira FE, da Rocha RF, Jorge AO, et al. Control of microorganisms of oral health interest with *Arctium lappa* L. (burdock) extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages (RAW 264.7). *Arch Oral Biol*. 2014 Aug;59(8):808-14. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.013

de Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res*. 2000 Nov-Dec;34(6):486-90.

Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Feb;24(1):69-75. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00482.x.

Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes Infect*. 2000 Apr;2(4):391-400.

Ebeid K, Wille S, Hamdy A, Salah T, El-Etreby A, Kern M. Effect of changes in sintering parameters on monolithic translucent zirconia. *Dent Mater*. 2014 Dec;30(12):e419-24. doi: 10.1016/j.dental.2014.09.003. Epub 2014 Sep 26.

Edward A, McLaren D, Tran C. Ceramics in Dentistry-Part I: Classes of Materials. *Inside Dentistry*. 2009 Oct;5(9):94-104.

Eisenburger M, Mache T, Borchers L, Stiesch M. Fracture stability of anterior zirconia crowns with different core designs and veneered using the layering or the press-over technique. *Eur J Oral Sci*. 2011 Jun;119(3):253-7. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00829.x.

Elsaka SE, Elnaghy AM. Mechanical properties of zirconia reinforced lithium silicate glass-ceramic. *Dent Mater*. 2016 Jul;32(7):908-14. doi: 10.1016/j.dental.2016.03.013.

Fox EP, Nobile CJ. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*. 2012 Nov-Dec;3(6):315-22. doi: 10.4161/trns.22281.

Frese C, Wolff D, Zingler S, Krueger T, Stucke K, Lux CJ, et al. Cytotoxicity of coated and uncoated fibre-reinforced composites. *Acta Odontol Scand*. 2014 Jul;72(5):321-30. doi: 10.3109/00016357.2013.826381.

Fuzzi M, Zaccheroni Z, Vallania G. Scanning electron microscopy and profilometer evaluation of glazed and polished dental porcelain. *Int J Prosthodont*. 1996 Sep-Oct;9(5):452-8.

Gatewood RR, Cobb CM, Killoy WJ. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 1993 Jun;4(2):53-64.

Giacaman RA, Torres S, Gómez Y, Muñoz-Sandoval C, Kreth J. Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Arch Oral Biol*. 2015 Jan;60(1):154-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.007.

Grande R, Pacella S, Di Giulio M, Rapino M, Di Valerio V, Cellini L, et al. NF- κ B mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/*Streptococcus mutans* co-cultured cells. *Clin Oral Investig*. 2015 May;19(4):841-9. doi: 10.1007/s00784-014-1304-4.

Grenade C, De Pauw-Gillet MC, Gailly P, Vanheusden A, Mainjot A. Biocompatibility of polymer-infiltrated-ceramic-network (PICN) materials with Human Gingival Fibroblasts (HGFs). *Dent Mater*. 2016 Sep;32(9):1152-64. doi: 10.1016/j.dental.2016.06.020.

Guazzato M, Albakry M, Ringer SP, Swain MV. Strength, fracture toughness and microstructure of a selection of all ceramic materials. Part II. Zirconia-based dental ceramics. *Dent Mater*. 2004; 20:449-56.

Hmaidouch R, Müller WD, Lauer HC, Weigl P. Surface roughness of zirconia for full-contour crowns after clinically simulated grinding and polishing. *Int J Oral Sci*. 2014 Dec;6(4):241-6. doi: 10.1038/ijos.2014.34.

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

Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community interactions of oral streptococci. *Adv Appl Microbiol*. 2014;87:43-110.

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

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

Kantorski KZ, Pagani C. Influência da rugosidade superficial dos materiais odontológicos na adesão bacteriana: revisão da literatura. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2007;19(3):325-30.

Karataşlı O, Kursoğlu P, Capa N, Kazazoğlu E. Comparison of the marginal fit of different coping materials and designs produced by computer aided manufacturing systems. *Dent Mater J*. 2011;30(1):97-102.

Kawai Y, Uo M, Wang Y, Kono S, Ohnuki S, Watari F. Phase transformation of zirconia ceramics by hydrothermal degradation. *Dent Mater J*. 2011;30(3):286-92.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83:C35-8.

Kim MJ, Ahn JS, Kim JH, Kim HY, Kim WC. Effects of the sintering conditions of dental zirconia ceramics on the grain size and translucency. *J Adv Prosthodont.* 2013 May;5(2):161-6. doi: 10.4047/jap.2013.5.2.161

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993 Jun;175(11):3247-52.

Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jul;8(7):471-80. doi: 10.1038/nrmicro2381.

Kosmac T, Oblak C, Jevnikar P, Funduk N, Marion L. The effect of surface grinding and sandblasting on flexural strength and reliability of Y-TZP zirconia ceramic. *Dent Mater.* 1999 Nov;15(6):426-33.

Kruger S, Deubener J, Ritzberger C, Höland W. Nucleation kinetics of lithium metasilicate in ZrO₂-bearing lithium disilicate glasses for dental application. *Int J Appl Glass Sci.* 2013;4(1):9-19.

Kwon YD, Choi HJ, Lee H, Lee JW, Weber HP, Pae A. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J Adv Prosthodont.* 2014 Oct;6(5):406-14. doi: 10.4047/jap.2014.6.5.406.

Lawaf S, Azizi A, Farzad A, Adimi P. Effect of surface treatments of porcelain on adhesion of *Candida albicans*. *Gen Dent.* 2016 Jul-Aug;64(4):e1-4.

Layton DM, Walton TR. The up to 21-year clinical outcome and survival of feldspathic porcelain veneers: accounting for clustering. *Int J Prosthodont.* 2012;25(6):604-12.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.

Madhyastha PS, Naik DG, Kotian R, Padma D, Srikant N, Bhat KM. Evaluation of Cytotoxicity of Silorane and Methacrylate based Dental Composites using

Human Gingival Fibroblasts. J Clin Diagn Res. 2015 Jan;9(1):ZC05-8. doi: 10.7860/JCDR/2015/10269.5366

Manjuran NG, Sreelal T. An in vitro study to identify a ceramic polishing protocol effecting smoothness superior to glazed surface. J Indian Prosthodont Soc. 2014 Sep;14(3):219-27. doi: 10.1007/s13191-013-0313-3.

Manoil D, Filieri A, Gameiro C, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, et al. Flow cytometric assessment of streptococcus mutans viability after exposure to blue light-activated curcumin. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014 Sep;11(3):372-9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.06.003.

March PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol. 2005;32(6):7-15. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x

Masuoka J, Hazen KC. Cell wall protein mannosylation determines Candida albicans cell surface hydrophobicity. Microbiology. 1997 Sep;143(Pt 9):3015-21.

Mehulic K, Svetlicic V, Segota S, Vojvodic D, Kovacic I, Katanec D, et al. A study of the surface topography and roughness of glazed and unglazed feldspathic ceramics. Coll Antropol. 2010 Mar;34(1):235–8.

Meier R, Hauser-Gerspach I, Lüthy H, Meyer J. Adhesion of oral streptococci to all-ceramics dental restorative materials in vitro. J Mater Sci Mater Med. 2008 Oct;19(10):3249-53. doi: 10.1007/s10856-008-3457-7.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003616. doi: 10.1371/journal.ppat.1003616.

Möller B, Terheyden H, Açil Y, Purcz NM, Hertrampf K, Tabakov A, et al. A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2012 May;41(5):638-45. doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.004.

Mukasa H, Slade HD. Mechanism of Adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. Infection and Immunity. 1973 Oct:555-62.

Odatsu T, Jimbo R, Wennerberg A, Watanabe I, Sawase Tamer. Effect of polishing and finishing procedures on the surface integrity of restorative ceramics. *Am J Dent*. 2013 Feb;26(1):51-5.

Odman P, Andersson B. Procera AllCeram crowns followed for 5 to 10.5 years: a prospective clinical study. *Int J Prosthodont*. 2001;14(6):504-9

Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci*. 1969;13:1741-7.

Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE. Rapid Succession within the Veillonella Population of a Developing Human Oral Biofilm In Situ. *J Bacteriol*. 2006 Jun;188(11):4117-24. doi: 10.1128/JB.01958-05

Pedrini D, Gaetti-Jardim Júnior E, Mori GG. Effect of the application of fluoride on the superficial roughness of vitremer glass ionomer cement and microbial adhesion to this material. *Pesqui Odontol Bras*. 2001 Jan-Mar;15(1):70-6.

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 May;26(3):341-8. doi: 10.1007/s10103-010-0852-3.

Pereira PC. Efeito da escovação na formação in situ de biofilme dentário inicial e na rugosidade superficial em cerâmica de Y-TZP após vitrificação e polimento [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, Unesp; 2010.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94.

Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999 Jan;20(1):1-25.

Qualtrough AJ, Piddock V. Dental ceramics: what's new? *Dent Update*. 2002 Jan-Feb;29(1):25-33.

Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, et al. The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res*. 1989 May;68(5):796-9.

Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, 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 Sep;72(9):1304-9.

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*. 2007 Sep;86(4):959-68.

Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res*. 2010;44(3):272-6. doi: 10.1159/000314675.

Ramakrishnaiah R, Alkheraif AA, Divakar DD, Matinlinna JP, Vallittu PK. The Effect of Hydrofluoric Acid Etching Duration on the Surface Micromorphology, Roughness, and Wettability of Dental Ceramics. *Int J Mol Sci*. 2016 May 27;17(6). pii: E822. doi: 10.3390/ijms17060822.

Ramos N de C, Campos TM, Paz IS, Machado JP, Bottino MA, Cesar PF, et al. Microstructure characterization and SCG of newly engineered dental ceramics. *Dent Mater*. 2016 Jul;32(7):870-8. doi: 10.1016/j.dental.2016.03.018.

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

Ren L, Janal MN, Zhang Y. Sliding contact fatigue of graded zirconia with external esthetic glass. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1116-21. doi: 10.1177/0022034511412075.

Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*. 2011 May;36(5):347-55.

Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Nov-Dec;17(6):793-8.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat Res*. 2003 Apr-Jun;6(3):317-20.

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000 Nov;2(13):1599-607.

Rosenblum MA, Schulman A. A review of all-ceramic restorations. *J Am Dent Assoc.* 1997 Mar;128(3):297-307.

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.

Sailer I, Fehér A, Filser F, Gauckler LJ, Lüthy H, Hämmerle CH. Five-year clinical results of zirconia frameworks for posterior fixed partial dentures. *Int J Prosthodont.* 2007 Jul-Aug;20(4):383-8.

Sanclement JA, Webster P, Thomas J, Ramadan HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2005 Apr;115(4):578-82.

Satpathy A, Dhakshaini MR, Gujjari AK. An evaluation of the adherence of *Candida albicans* on the surface of heat cure denture base material subjected to different stages of polishing. *J Clin Diagn Res.* 2013 Oct;7(10):2360-3. doi: 10.7860/JCDR/2013/6082.3524. Epub 2013 Oct 5.

Schmitter M, Lotze G, Bömicke W, Rues S. Influence of surface treatment on the in-vitro fracture resistance of zirconia-based all-ceramic anterior crowns. *Dent Mater.* 2015 Dec;31(12):1552-60. doi: 10.1016/j.dental.2015.10.003.

Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, et al. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials.* 2005 May;26(14):1713-9.

Scotti R, Kantorski KZ, Monaco C, Valandro LF, Ciocca L, Bottino MA. SEM evaluation of in situ early bacterial colonization on a Y-TZP ceramic: a pilot study. *Int J Prosthodont.* 2007 Jul-Aug;20(4):419-22.

Scotti R, Kantorski KZ, Scotti N, Monaco C, Valandro LF, Bottino MA. Early biofilm colonization on polished- and glazed-zirconium ceramic surface. Preliminary results. *Minerva Stomatol.* 2006 Sep;55(9):493-502.

Sesma N, Laganá DC, Morimoto S, Gil C. Effect of denture surfaceglazing on denture plaque formation. *Braz Dent J.* 2005;16(2):129-34.

Shehata M, Durner J, Eldenez A, Van Landuyt K, Styllou P, Rothmund L, et al. Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):971-9. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.007.

Shemesh M, Tam A, Aharoni R, Steinberg D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol*. 2010 Feb;10:51. doi: 10.1186/1471-2180-10-51.

Shenoy A, Shenoy N. Dental ceramics: an update. *J Conserv Dent*. 2010 Oct;13(4):195-203. doi: 10.4103/0972-0707.73379.

Shirtcliffe NJ, McHale G, Atherton S, Newton MI. An introduction to superhydrophobicity. *Adv Colloid Interface Sci*. 2010 Dec 15;161(1-2):124-38. doi: 10.1016/j.cis.2009.11.001.

Song F, Koo H, Ren D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J Dent Res*. 2015 Aug;94(8):1027-34. doi: 10.1177/0022034515587690.

Sousa C, Teixeira P, Oliveira R. Influence of Surface Properties on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Acrylic and Silicone. *Int J Biomater*. 2009;2009:1-9. doi: 10.1155/2009/718017.

Stawarczyk B, Özcan M, Schmutz F, Trottman A, Roos M, Hämmerle CH. Two-body wear of monolithic, veneered and glazed zirconia and their corresponding enamel antagonists. *Acta Odontol Scand*. 2013 Jan;71(1):102-12. doi: 10.3109/00016357.2011.654248.

Sulaiman TA, Abdulmajeed AA, Donovan TE, Ritter AV, Vallittu PK, Närhi TO, et al. Optical properties and light irradiance of monolithic zirconia at variable thicknesses. *Dent Mater*. 2015 Oct;31(10):1180-7. doi: 10.1016/j.dental.2015.06.016.

Tari BF, Nalbant D, Dogruman Al F, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. *J Contemp Dent Pract*. 2007 Jul 1;8(5):18-25.

Tay LY, Herrera DR, Quishida CC, Carlos IZ, Jorge JH. Effect of water storage and heat treatment on the cytotoxicity of soft liners. *Gerodontology*. 2012 Jun;29(2):e275-80.

Teixeira LHP, Santos C, Daguanio JKMF, Koizumi MH, Elias CN. Sinterização e propriedades mecânicas do compósito Y-TZP/ Al_2O_3 . *Cerâmica*. 2007 Jul-Set;53(327):227-33.

Tetè 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 Oct;17(2):68-81.

Trumpaite-Vanagiene R, Bukelskiene V, Aleksejuniene J, Puriene A, Baltriukiene D, Rutkunas V. Cytotoxicity of commonly used luting cements -An *in vitro* study. *Dent Mater J*. 2015 Jun;34(3):294-301. doi: 10.4012/dmj.2014-185.

Valandro L, Bottino MA. Cimentação adesiva de restaurações cerâmicas. In: Bottino MA, editor. *Percepção: estética em próteses livres de metal em dentes naturais e implantes*. São Paulo: Artes médicas; 2009. p.469-542. cap. 7.

Vo DT, Arola D, Romberg E, Driscoll CF, Jabra-Rizk MA, Masri R. Adherence of *Streptococcus mutans* on lithium disilicate porcelain specimens. *J Prosthet Dent*. 2015 Nov;114(5):696-701. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.06.017.

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

Willershausen B, Marroquín BB, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod*. 2000 Dec;26(12):703-7.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.035.

Winkler C, Schäfer 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 May;72(4):241-50. doi: 10.3109/00016357.2013.828320.

Yagci F, Kesim B. Cytotoxic and genotoxic effects on gingival fibroblasts from static magnetic fields produced by dental magnetic attachments. *Gerodontology*. 2016 Sep;33(3):421-7. doi: 10.1111/ger.12191.

Yilmaz K, Ozkan P. Profilometer evaluation of the effect of various polishing methods on the surface roughness in dental ceramics of different structures subjected to repeated firings. *Quintessence Int*. 2010 Jul-Aug;41(7):e125-31.

Yuan C, Wang X, Gao X, Chen F, Liang X, Li D. Effects of surface properties of polymer-based restorative materials on early adhesion of *Streptococcus mutans* in vitro. *J Dent*. 2016 Nov;54:33-40. doi: 10.1016/j.jdent.2016.07.010. Epub 2016 Jul 21.

Zhang Y. Making yttria-stabilized tetragonal zirconia translucent. *Dent Mater*. 2014 Oct;30(10):1195-203. doi: 10.1016/j.dental.2014.08.375.

Zhou P, Liu J, Merritt J, Qi F. A YadA-like autotransporter, Hag 1 in *Veillonella atypica* is a multivalent hemagglutinin involved in adherence to oral streptococci, *Porphyromonas gingivalis*, and human oral buccal cells. *Mol Oral Microbiol*. 2015 Aug;30(4):269-79. doi: 10.1111/omi.12091.

Zingler S, Matthei B, Diercke K, Frese C, Ludwig B, Koh A, et al. Biological evaluation of enamel sealants in an organotypic model of the human gingiva. *Dent Mater*. 2014 Sep;30(9):1039-51. doi: 10.1016/j.dental.2014.06.002.

APÊNDICE A - Valores percentuais de viabilidade celular através do teste MTT nos períodos de 24 h e 7 dias

Tabela 8- Valores percentuais de viabilidade celular através do teste MTT no período de 24 h

MTT 24 h	HTg	HTp	SUPg	SUPp	Controle
Poço 1	0,170	0,070	0,151	0,089	0,105
Poço 2	0,168	0,080	0,148	0,090	0,106
Poço 3	0,100	0,620	0,114	0,081	0,050
Poço 4	0,171	0,128	0,129	0,094	0,106
Poço 5	0,171	0,129	0,066	0,094	0,109
Poço 6	0,080	0,119	0,142	0,087	0,920
Poço 7	0,145	0,075	0,139	0,075	0,117
Poço 8	0,144	0,074	0,110	0,075	0,122
Poço 9	0,102	0,075	0,131	0,079	0,091
Média	0,139	0,091	0,125	0,085	0,191
%	72,5	47,5	65,5	44,3	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 9- Valores percentuais de viabilidade celular através do teste MTT no período de 7 dias

MTT 7 dias	HTg	HTp	SUPg	SUPp	Controle
Poço 1	0,063	0,076	0,064	0,071	0,080
Poço 2	0,064	0,070	0,065	0,070	0,077
Poço 3	0,066	0,069	0,058	0,070	0,077
Poço 4	0,061	0,081	0,061	0,081	0,085
Poço 5	0,060	0,082	0,064	0,079	0,084
Poço 6	0,061	0,053	0,064	0,058	0,086
Poço 7	0,061	0,066	0,058	0,058	0,111
Poço 8	0,061	0,063	0,058	0,058	0,113
Poço 9	0,060	0,055	0,055	0,058	0,113
Média	0,061	0,069	0,060	0,067	0,091
%	67,4	78,5	66,2	76,2	100

Fonte: Elaborada pelo autor.