



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia



Juliana Silvério Flausino de Almeida

**EFEITOS DE DIFERENTES MATERIAIS RESTAURADORES
NA FORMAÇÃO DE BIOFILME-
ANÁLISE DO ÂNGULO DE CONTATO, RUGOSIDADE DA
SUPERFÍCIE 3D E MICROSCOPIA CONFOCAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia

2013

Juliana Silvério Flausino de Almeida

**EFEITOS DE DIFERENTES MATERIAIS RESTAURADORES
NA FORMAÇÃO DE BIOFILME-
ANÁLISE DO ÂNGULO DE CONTATO, RUGOSIDADE DA
SUPERFÍCIE 3D E MICROSCOPIA CONFOCAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

Colaboradoras: Prof. Ms. Priscilla Barbosa Ferreria Soares

Ac. Valessa Florindo Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares

Prof. Dra Camila Christian Gomes Moura

**UBERLÂNDIA
2013**

FICHA DE APROVAÇÃO

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 20 de fevereiro de 2013, considerou a candidata Juliana Silvério Flausino de Almeida APROVADA.

Prof. Dr. Denildo de Magalhães (Orientador)_____

Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares _____

Profa. Dra. Camila Christian Gomes Moura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta vitória aos meus pais, por tudo o que eles são e por todo o amor, carinho e compreensão que dedicaram a mim e aos meus irmãos.

A Deus, que iluminou meus caminhos e me fortaleceu nos momentos mais difíceis desta caminhada, me indicando os passos certos a serem dados nesta etapa de crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade.

Agradeço a minha família, que sempre esteve ao meu lado em todas as escolhas que fiz na vida. Aos meus pais João e Maria, que me ensinaram os valores da vida e fazem tudo para realizar cada sonho que tenho. Todas as minhas vitórias devo a eles. Dedico essa conquista aos meus irmãos Fabrício e Marcelo, que me incentivaram desde o primeiro dia de aula na graduação, a sempre buscar mais em todos os meus caminhos, e por isso cheguei até aqui. Ao meu esposo, Antônio José que não me deixou desistir nos momentos difíceis e que teve paciência e compreensão nos meus momentos de estudo.

Ao Professor Doutor Carlos José Soares e Professora Mestre Priscilla Barbosa Ferreira Soares, para quem não há agradecimentos que eu possa expressar em palavras. Sempre ao meu lado, se dedicando com toda força e carinho. São excelentes professores, que sabem fazer e ensinar. Sabem compreender as ansiedades de seus alunos e responder as suas expectativas. Suas dedicações às pesquisas levam os alunos a sempre querer mais e ir muito mais além do que imaginam que podem ir. Foram professores que me ensinaram a pensar, que abriu horizontes e me deixou participar de seus ensinamentos, por onde consegui chegar ao sucesso.

Ao Professor Doutor Denildo de Magalhães que me ensinou a transmitir conhecimentos aos alunos. Agradeço a sua disponibilidade, a sua forma crítica e criativa de arguir as ideias apresentadas, que facilitaram o alcance dos propósitos nesta dissertação.

Agradeço aos Professores Dr. José Daniel Biasolli de Mello, Dra. Henara Lilian Costa, Dr. Washington Martins da Silva Junior e aos alunos José Lúcio e Sara do Laboratório de Tribologia dos Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica, pela disponibilidade de me ensinar a trabalhar nos equipamentos que utilizei na metodologia desta pesquisa. Fico grata a Mariani do Laboratório de Microscopia pelas inúmeras vezes que precisei utilizar seus conhecimentos e ao Professor Mário Paulo Amanti Penatti pela contribuição na pesquisa com o biofilme.

De uma maneira muito especial quero agradecer com todo carinho as alunas da graduação Valessa e Maiara que puderam compartilhar comigo todas as conquistas e as dificuldades encontradas no caminho. Agradeço o modo como elas compartilharam comigo e se disponibilizaram para desenvolvermos esse estudo. “Meninas desejo sucesso sempre para vocês”.

A todos os meus colegas de pós-graduação que fazem da nossa Faculdade uma importante instituição de ensino, onde todos podem ficar honrados em fazer parte, e que por muitos anos será uma instituição respeitada pelos grandes nomes que fazem parte dela.

A todos, obrigada por permitirem que esta dissertação seja uma realidade.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS, ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | 8 |
| RESUMO..... | 13 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 Lesão cervical não cariosa..... | 17 |
| 2.2 Constituição e formação do biofilme dental..... | 19 |
| 2.3 Biocompatibilidade dos materiais restauradores..... | 25 |
| 2.3.1 Resina composta nanoparticulada - Filtek Z350 XT..... | 26 |
| 2.3.2 Ionômero de vidro convencional – Ketac Fil Plus..... | 27 |
| 2.3.3 Ionômero de vidro nanoparticulado modificado por resina – Ketac Nano | 28 |
| 2.3.4 Ionômero de vidro modificado por resina – Vitremer..... | 28 |
| 2.4 Estudos das superfícies dos materiais restauradores: perfilometria e ângulo de contato..... | 30 |
| 2.5 Análise do biofilme na microscopia confocal..... | 36 |
| 3. PROPOSIÇÃO..... | 38 |
| 4. METODOLOGIA..... | 39 |
| 4.1 Confeção das amostras..... | 39 |
| 4.2 Avaliação experimental da topografia da superfície 3D dos materiais restauradores..... | 44 |
| 4.3 Avaliação experimental do ângulo de contato..... | 46 |
| 4.4 Avaliação do biofilme na microscopia confocal..... | 48 |
| 5. RESULTADOS..... | 56 |
| 5.1 Perfilometriaa laser..... | 56 |
| 5.2 Ângulo de contato..... | 61 |
| 5.3 Biofilme..... | 64 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 69 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 73 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 74 |
| 9. APÊNDICE..... | 81 |
| 10.ANEXO..... | 83 |

LISTAS DE FIGURAS, QUADROS, TABELAS, ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Desenvolvimento de um biofilme: (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro..... | 20 |
| Figura 2: Estágios de formação e vida de um biofilme, determinados por fatores físicos, biológicos e ambientais..... | 21 |
| Figura 3: Representação gráfica dos defeitos de forma, ondulação e rugosidade..... | 31 |
| Figura 4: Comprimento de corte utilizado para excluir erro de forma em medições 2D..... | 32 |
| Figura 5: Diagrama da influência do raio de ponta sobre o perfil medido..... | 32 |
| Figura 6: Diferentes perfis com o mesmo Sa | 34 |
| Figura 7: Ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer, 3M-Espe); Ionômero de vidro convencional (Ketac Fil Plus, 3M-Espe); Ionômero de vidro modificado por resina nanoparticulada (Ketac Nano, 3M-Espe); Resina composta nanoparticulada (Filtek Z350, 3M-Espe)..... | 39 |
| Figura 8: Proporção do Ketac Nano..... | 40 |
| Figura 9: Ionômero de vidro modificado por resina – Vitremer..... | 40 |
| Figura 10: Proporção do material a ser espatulado – Vitremer..... | 41 |
| Figura 11: Espatulação do material – Vitremer..... | 41 |
| Figura 12: Inserção do material no interior da matriz de teflon. Tira de poliéster posicionada – Vitremer..... | 42 |
| Figura 13: Posicionamento da matriz de poliéster sobre os orifícios – Vitremer..... | 42 |
| Figura 14: Polimerização do material – Optilux 501, Demetron, USA..... | 43 |
| Figura 15: Padronização do tamanho da amostra (4x2mm)..... | 43 |
| Figura 16: Interferômetro a laser UBM (Taylor Hobson Ltd, Leicester, LE)..... | 45 |
| Figura 17: Crescimento do biofilme 24 horas após semeadura..... | 47 |
| Figura 18: Seleção de uma colônia isolada..... | 48 |
| Figura 19: Caldo estéril de BHI..... | 48 |
| Figura 20: Diluição da suspensão bacteriológica em caldo de BHI não contaminado..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 21: Caldo bacteriológico diluído colocado nos eppendorfs contendo as amostras..... | 49 |
| Figura 22: Amostras com caldo bacteriológico..... | 50 |
| Figura 23: Amostras colocadas em estufa a 37°C por 24 horas..... | 50 |
| Figura 24: Amostra sendo retirada do caldo 24 horas após crescimento bacteriológico..... | 51 |
| Figura 25: Amostra sendo colocada no poço da placa..... | 51 |
| Figura 26: Corante proteico: Fluoresceína Sódica 1%..... | 52 |
| Figura 27: Amostras colocadas no corante por 15 minutos..... | 52 |
| Figura 28: Solução tampão para lavagem das amostras..... | 53 |
| Figura 29: Lavagem das amostras..... | 53 |
| Figura 30: Amostras lavadas com solução tampão prontas para serem analisadas no MCVL..... | 54 |
| Figura 31: Amostras prontas para serem analisadas no MCVL..... | 55 |
| Figura 32: Filtek Z350 XT - Imagem 3D com forma reduzida..... | 57 |
| Figura 33: Filtek Z350 XT – Valores da cada parâmetro de amplitude..... | 57 |
| Figura 34: Filtek Z350 XT – Perfil topográfico com forma reduzida..... | 57 |
| Figura 35: Ketac Fil Plus- Imagem 3D com forma reduzida..... | 58 |
| Figura 36: Ketac Fil Plus – Valores da cada parâmetro de amplitude..... | 58 |
| Figura 37: Ketac Fil Plus – Perfil topográfico com forma reduzida..... | 58 |
| Figura 38: Ketac Nano - Imagem 3D com forma reduzida..... | 59 |
| Figura 39: Ketac Nano – Valores da cada parâmetro de amplitude..... | 59 |
| Figura 40: Ketac Nano – Perfil topográfico com forma reduzida..... | 59 |
| Figura 41: Vitremer - Imagem 3D com forma reduzida..... | 60 |
| Figura 42: Vitremer – Valores da cada parâmetro de amplitude..... | 60 |
| Figura 43: Vitremer – Perfil topográfico com forma reduzida..... | 60 |
| Figura 44: Filtek Z350 XT – 0 segundos..... | 61 |
| Figura 45: Filtek Z350 XT – 20 segundos..... | 61 |
| Figura 46: Ketac Fil Plus – 0 segundos..... | 62 |
| Figura 47: Ketac Fil Plus – 20 segundos..... | 62 |
| Figura 48: Ketac Nano – 0 segundos..... | 62 |
| Figura 49: Ketac Nano – 20 segundos..... | 62 |
| Figura 50: Vitremer – 0 segundos..... | 63 |
| Figura 51: Vitremer – 20 segundos | 63 |
| Figura 52: Biofilme formado sobre Ketac Fil Plus..... | 65 |
| Figura 53: Biofilme formado sobre Vitremer..... | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 54: Biofilme formado sobre Ketac Nano..... | 66 |
| Figura 55: Biofilme formado sobre Filtek Z350 XT..... | 66 |
| Figura 56: Gráfico da correlação entre os parâmetros da rugosidade de superfície (μm) e biovolume do biofilme ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) entre os diferentes grupos..... | 67 |
| Figura 57: Gráfico da correlação entre os parâmetros da rugosidade de superfície (μm) e espessura do biofilme ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) entre os diferentes grupos..... | 68 |

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Média \pm desvio padrão (DP) e para o parâmetro rugosidade da superfície (mm) s, os parâmetros de amplitude (Sa e Sq), parâmetro espacial (Sds) e parâmetro híbrido (Sds).. 56

Quadro 2: Média \pm desvio padrão (DP) para ângulo de contato (graus).....61

Quadro 3: Média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para a espessura média (μm) e biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$).....64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

VT: Vitremer

KN: Ketac Nano

KF: Ketac Fil Plus

FZ: Filtek Z350 XT

LCNC: Lesão cervical não cariiosa

EPS: Exopolissacarídica

$\mu\text{m}/\text{mm}^2$: micrômetro por milímetro quadrado

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

MCVL: Microscopia confocal de varredura a laser

CLSM: Microscópio de varredura confocal a laser

CIVMRs: Cimento de ionômero de vidro modificado por resina

PBS: Tampão fosfato alcalino

μL : Microlitro

UFC: Unidade formadora de colônia

BHI: Brain Heart Infusion

nm: Nanômetro

Sa: Parâmetro de amplitude (rugosidade media)

Sq: Parâmetro de amplitude (desvio padrão)

Sds: Parâmetro espacial (densidade de cúmulos)

Ssc: Parâmetro híbrido (espacial/textura)

mm: Milímetros

g: Gramas

cm^2 : Centímetros quadrados

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

DP: Desvio padrão

CV: Coeficiente de variação

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito dos parâmetros de topografia e hidrofobicidade de diferentes tipos de materiais restauradores utilizados para restaurar lesões cervicais não cariosas sobre a formação de biofilme. Quatro materiais restauradores foram investigados: cimento de ionômero de vidro convencional (KF, Ketac Fil Plus, 3M ESPE), ionômero de vidro modificado por resina (VT, Vitremer, 3M ESPE), ionômero de vidro nanoparticulado modificado por resina (KN, Ketac Nano, 3M ESPE) resina composta nanoparticulada (FZ, Filtek Z350 XT, 3M ESPE). Quinze amostras foram preparadas a partir de cada material, divididas em quatro grupos. Dez amostras foram utilizadas para a análise de parâmetros usando a perfilometria a laser 3D. Os parâmetros amplitude (Sa e Sq), parâmetro espacial (Sds) e parâmetro híbrido (Ssc) foram extraídos em área usando cut-off= 0,25 mm. A hidrofobicidade foi determinada pela medição do ângulo de contato usando água deionizada sobre a superfície (n=5 por material). Biofilme foi avaliado após 24 horas após cultura sobre as amostras, que depois foram coradas com fluoresceína sódica a 1% utilizando microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) para análise do biovolume e espessura. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A correlação de Pearson foi utilizada para comparar os parâmetros topográficos com a formação de biofilme. Foram encontradas diferenças significativas entre os parâmetros de amplitude relacionados (Sa e Sq: FZ = KN < VT < KF). KN apresentou a maior hidrofobicidade. FZ e KN apresentaram a menor espessura e biovolume de biofilme quando comparadas com VT e KF. Todos os parâmetros de topografia foram significativamente correlacionados com a formação de biofilme. FZ e KN, materiais com nano partículas apresentaram melhor desempenho nos parâmetros relacionados com topografia e formação de biofilme.

PALAVRAS-CHAVE: nanomaterial, biofilme, microscopia confocal, rugosidade da superfície, ângulo de contato

The purpose of this study was to evaluate the effect of the topography parameters and hydrophobicity of restorative material used to restore non-carious cervical lesions on the biofilm formation. Four restorative materials were investigated: conventional glass ionomer cement (KF, Ketac Fill Plus, 3M ESPE), resin-modified glass ionomer cement (VT, Vitremer, 3M ESPE), nanofilled resin-modified glass ionomer (KN, Ketac Nano, 3M ESPE) nanofilled resin composite (FZ, Filtek Z350 XT, 3M ESPE). Forty disk specimens were prepared from each material, divided in four groups. Five samples were used for topography parameters analysis using a 3D profilometry. The amplitude parameters (S_a and S_q), spatial parameter (S_d) and hybrid parameter (S_{sc}) were extracted in area using cut off of 0.25mm. Hydrophobicity was determined by the contact angle measurement of deionized water on the surface. Biofilm was evaluated after 24 hours formation with each disk after stained with 1% fluorescein using confocal laser-scanning microscopy (CLSM). Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test ($\alpha=0.05$), Pearson correlation was used to compare topography parameters with biofilm formation. Significant differences were found related amplitude parameters (S_a and S_q , $FZ=KN<VT<KF$). KN presented the highest hydrophobicity. FZ and KN presented the lowest thickness and biovolume of biofilm when compared with VT and KF. All topography parameters were significantly correlated with biofilm formation. FZ and KN, material with nanoparticles presented better performance related topography parameters and biofilm formation.

KEYWORDS: nanomaterial, biofilm, confocal laser microscopy, surface roughness, contact angle

Há pouco tempo, as lesões cariosas destacavam-se como as maiores responsáveis pela sintomatologia dolorosa dos pacientes. Hoje, a redução da incidência de cárie é nítida, porém nota-se crescimento contínuo na ocorrência de lesões cervicais não-cariosas (LCNC) (Bader et al., 1996). Tais lesões são caracterizadas pela perda de tecido dental duro na região próxima à junção cimento-esmalte que, ao promoverem a exposição de dentina, podem desenvolver sensibilidade dentinária. Normalmente, fatores de risco de natureza diversa estão presentes, atuando com intensidade, duração e frequência variáveis, de forma isolada ou em associação entre si, o que caracteriza a condição como de natureza multifatorial (Levitch et al., 1994).

As lesões cervicais apresentam grande variedade de forma e podem ocorrer nas superfícies vestibular, lingual e/ou proximal de adultos e idosos, embora possam se manifestar em todos os grupos etários. Quanto mais velha a população, maior a prevalência de indivíduos que apresentam essas lesões e maior o número de lesões profundas neles encontradas. O conhecimento da etiologia dessas lesões é importante para prevenir o desenvolvimento de novas lesões, interromper a progressão de lesões já existentes, e determinar o tratamento apropriado. Os fatores etiológicos mais comumente citados que podem levar ao desenvolvimento de lesões cervicais são corrosão, abrasão e abfração (Maneenut et al., 1995).

Quanto ao tratamento, à primeira medida terapêutica a ser adotada consiste na remoção dos fatores causais e, posteriormente na análise individual de aspectos como a profundidade da lesão e a presença de sintomatologia dolorosa para determinar a necessidade ou não de procedimento restaurador. Diante da necessidade de tratamento restaurador, diversos materiais estão disponíveis no mercado, cada um com suas vantagens e desvantagens.

Após o diagnóstico e a tomada de decisão de restaurar a LCNC, torna-se necessário e fundamental definir o tipo de material restaurador a ser empregado. Para a seleção, deve-se considerar a característica da superfície em relação à rugosidade, a fim de promover uma lisura superficial, que dificulte a adesão e retenção de biofilme. Entre as alternativas para a realização de restauração na região cervical destacam-se o emprego de materiais estéticos, tais como cimento de ionômero de vidro, ionômero modificado por resina e resina composta (Maneenut et al., 1995; Peumans et al., 2005). Estes materiais usados nas restaurações dessas

áreas auxiliam na proteção contra maior perda de estrutura dental, sensibilidade e manutenção na qualidade dos tecidos gengivais.

As hipóteses nulas lançadas para este estudo foram: não existem diferenças significativas nos parâmetros de topografia e hidrofobicidade entre os materiais restauradores testados; não houve efeito dos parâmetros de topografia e hidrofobicidade de diferentes materiais utilizados para restaurar LCNC sobre a formação de biofilme.

Contudo, há que se considerar a possibilidade de atuarem como um agente colaborador no desenvolvimento do biofilme resultando assim, em uma possível agressão ao periodonto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LESÃO CERVICAL NÃO CARIOSA

A ressecção gengival é caracterizada pela perda de estruturas do periodonto, e consequente exposição da superfície radicular, independente do padrão de higiene bucal do indivíduo. O fator, provavelmente predominante para a recessão localizada é a oclusão traumatogênica, principalmente em adultos (Bartlett et al., 2006). Associada à recessão gengival e, por conseguinte, à superfície radicular exposta, há a presença de LCNC.

Em função de medidas de prevenção à cárie é notória a redução de sua incidência, porém nota-se crescimento contínuo na ocorrência de LCNC, ou seja, aquelas não ocasionadas por bactérias. Estas são classificadas em três categorias: corrosão, abrasão e abfração, caracterizadas pela perda de tecido dental duro na região próxima à junção cimento-esmalte (Terry et al., 2003; Soares et al., 2006; Lucchesi et al., 2007; Barbosa et al., 2009).

A corrosão é determinada pela dissolução de substância, pela presença de um meio quimicamente ácido, seja essa de origem intrínseca ou extrínseca. A primeira é procedente por regurgitação de ácido gástrico, enquanto a segunda ocorre em função da dieta de baixo pH. Em contrapartida, a abrasão é caracterizada por um desgaste da estrutura dentária causada por forças mecânicas anormais, tais como: excessiva e imprópria escovação e hábitos parafuncionais orais, como roer unhas, bruxismo, morder a haste de um tubo, segurar pregos entre os dentes. Por fim, a abfração advém de alterações na distribuição da força sobre o dente, principalmente na região cervical, porém, pode se manifestar, também, como invaginações oclusais resultantes da excessiva carga excêntrica de hábitos parafuncionais (Soares et al., 2006; Lucchesi et al., 2007; Francisconi et al., 2009; Pikdoken et al., 2011).

Historicamente, estas lesões eram classificadas de acordo com sua aparência: áreas em forma de cunha, em forma de disco, achatada e irregular. Geralmente, elas variam de sulcos rasos com amplas lesões em forma de cunha com defeitos afiados. Estudos clínicos e observações mostram que as lesões de desgaste cervical são muitas vezes situadas na superfície vestibular dos dentes, raramente nas regiões lingual e proximal. Elas também são mais pronunciadas em pré-molares e molares e mais prevalente na maxila que na mandíbula (Pikdoken et al., 2011).

Em específico, a lesão de abfração é uma lesão patológica não cariosa, caracterizada por defeito em forma de cunha em tecido duro, geralmente profunda e com margem definida na região cervical de um dente. Durante a mastigação, as forças laterais, geradas na superfície oclusal dos dentes posteriores, resultam na deflexão das cúspides, resultando em compressão na região cervical para o lado em que o dente está se flexionando e tração no lado oposto. Considerando que os substratos esmalte e dentina possuem elevada resistência à compressão e baixa à tração, então, essas tensões poderão causar falha pelo processo de fadiga (Lucchesi et al., 2007). A deformação de tecidos com comportamentos mecânicos diferentes gera quebras das ligações químicas entre os cristais de hidroxiapatita aumentando a permeabilidade às substâncias nos espaços formados, o que dificulta o restabelecimento das ligações químicas rompidas no esmalte (Pikdoken et al., 2011).

Após o restabelecimento da estabilidade oclusal, a indicação para o procedimento de recobrimento radicular pode ser necessário, sendo uma forma de intervir em estética, hipersensibilidade dentinária, tratamento de lesões não cariosas rasas na raiz e abrasões cervicais. Na presença de recessões gengivais extensas a cobertura radicular por meio de técnicas cirúrgicas plásticas periodontais tradicionais pode ser dificultada ou mesmo contra indicada devido à presença LCNC, as quais necessitam muitas vezes de aplainamento radicular abrangente, o que poderia comprometer a estrutura dentária. Neste caso, são necessárias técnicas integradas a procedimentos restauradores convencionais, que resultam, também, em proteção contra maior perda de estrutura dental e sensibilidade (Terry et al., 2003; Bartlett, 2006; Barbosa et al., 2009; Francisconi et al., 2009).

2.1.2 CONSTITUIÇÃO E FORMAÇÃO DO BIOFILME DENTAL

Genericamente, biofilmes são definidos como comunidades microbianas sésseis aderidas a superfícies rígidas. Os microrganismos que compõem o biofilme formam uma comunidade extremamente organizada, sendo envolvidos por uma matriz extracelular, composta principalmente de polissacarídeos produzidos pelos próprios microrganismos, os quais interagem com componentes do fluido pelo qual são banhados. Constitui-se de depósitos bacterianos e constituintes salivares, com um crescimento contínuo, sendo considerado a principal causa das doenças cárie e periodontal, infecções periimplantares e estomatites (Rosan et al., 2000).

Segundo Rickard et al., 2003 a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Inicialmente temos os organismos denominados colonizadores primários, que se aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. As células aderidas passam a se desenvolver, originando micro colônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS), que passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários. Estes colonizadores secundários podem aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e então se aderirem aos primários, conforme ilustrado na Figura 1.

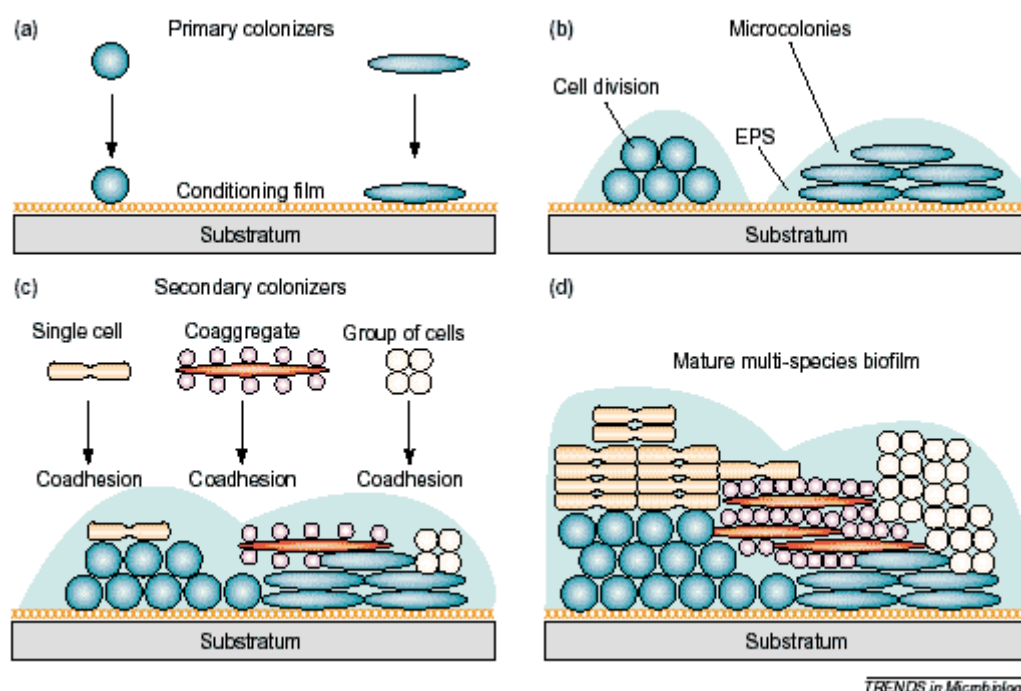


Figura 1. Desenvolvimento de um biofilme: (a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro. (Adaptado de Rickard et al., Trends Microbiol., 11:94-100, 2003)

Assim, o biofilme corresponde a uma "entidade" dinâmica, pois, de acordo com os microrganismos que o compõem, teremos condições físicas, químicas e biológicas distintas. Estas alterações fazem com que cada biofilme seja único, de acordo com os microrganismos presentes. Neste sentido, ao longo do tempo a composição microbiana dos biofilmes geralmente sofre alterações significativas. A Figura 2 ilustra não somente a estruturação físico-química de um biofilme, mas também sua evolução e amadurecimento, dependendo das relações estabelecidas pelos microrganismos presentes (Rickard et al., 2003).

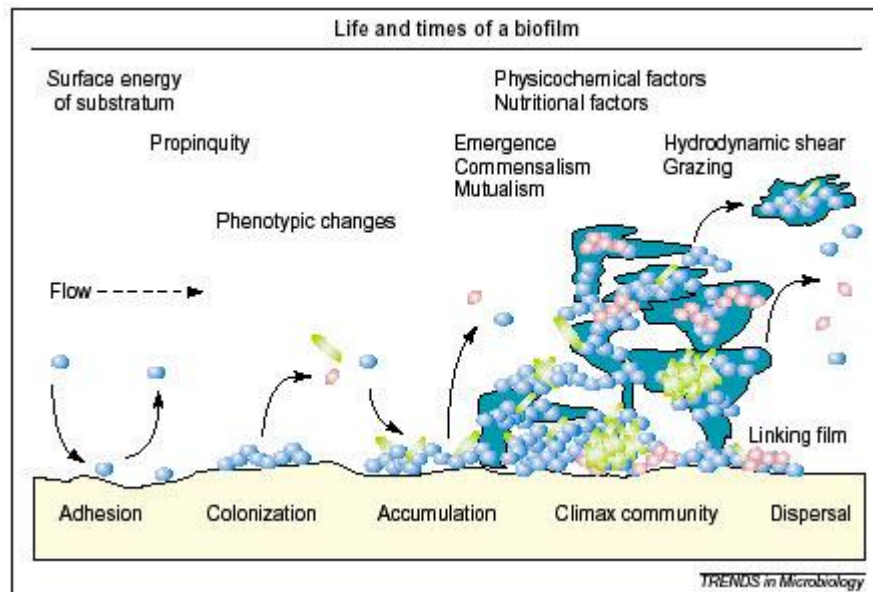


Figura 2. Estágios de formação e vida de um biofilme, determinados por fatores físicos, biológicos e ambientais. (Adaptado de Jenkinson & Lappin-Scott, Trends Microbiol., 9:9-10, 2001)

Segundo Jenkinson et al., 2001, embora seja discutido que a composição microbiana varia segundo as diferentes áreas dos dentes, principalmente quando se compara biofilme supragengival e biofilme subgengival, os mecanismos básicos de formação de biofilmes são academicamente divididos em três fases principais do desenvolvimento:

1) **Fase de aderência inicial:** envolve mecanismos inespecíficos e específicos de adesão à película adquirida do esmalte e outras superfícies dentárias expostas (Exemplo: superfícies radiculares). Os microrganismos com maior capacidade de se aderir aos dentes nestas fases iniciais são definidos como colonizadores primários.

2) **Fase de acúmulo:** envolve mecanismos de interação bacteriana e a produção de uma matriz extracelular. Muitos microrganismos não se aderem inicialmente aos dentes, mas são capazes de se aderir (co-adesão) a microrganismos primários que se estabelecem na fase inicial. Estes são denominados de colonizadores secundários.

3) **Fase da comunidade “clímax”:** atinge um estágio de equilíbrio dinâmico, onde os diversos microrganismos que compõem o biofilme estão em constante adaptação às alterações ambientais. Após a adesão e acúmulo, diversas modificações ambientais ocorrem de forma que os diferentes gêneros e espécies microbianas vão variar em proporção até atingir

uma fase de equilíbrio. Este equilíbrio é dinâmico, pois envolvem constantes modificações fisiológicas, para que a comunidade sobreviva no nicho colonizado. Variações na composição e proporção das espécies são menores, a não ser que grandes variações ambientais ocorram, como por exemplo, alterações acentuadas da dieta e/ou da saúde geral do hospedeiro. A microbiota clímax apresenta microrganismos colonizadores primários e secundários, e também os microrganismos colonizadores tardios, isto é, aqueles que aumentam em proporção como consequência de variações ambientais decorrentes do acúmulo microbiano no biofilme dentário.

Tem sido estimado que aproximadamente 500 espécies diferentes de bactérias habitam a cavidade bucal (Moore et al., 1994; Socransky et al., 1994; Wilson, 2001), sendo a maioria dos microrganismos comensais e uma pequena porção deles, patógenos oportunistas, causadores também de doenças sistêmicas (Paster et al., 2001). Segundo Marsh, 1994, a composição da placa bacteriana pode permanecer estável devido a uma variedade de interações entre as espécies constituintes. A comunidade microbiana de um biofilme dental maduro envolve interações microbianas intra e inter espécies e gêneros, as quais são relativamente estáveis. A matriz extracelular do biofilme apresenta canais por onde atravessam fluídos contendo nutrientes, metabólitos secretados, enzimas, oxigênio, sais e compostos orgânicos.

As bactérias que formam o biofilme apresentam mecanismos de comunicação por meio de sinais químicos. Estes sinais estimulam as bactérias a produzir proteínas e enzimas importantes para a adaptação fisiológica bacteriana há diferentes condições ambientais, às quais o biofilme está exposto. Assim, os biofilmes se comportam como um tecido organizado, sendo capazes de se adaptarem mais facilmente a diferentes condições de estresse ambiental (Costerton et al, 1999).

A placa bacteriana pode ser definida como uma película não calcificada fortemente aderida às superfícies dentais resistindo à presença do fluxo salivar. O termo biofilme é usado para denotar uma comunidade microbiana encapsulada em polímero que se acumula em uma superfície, que também protege contra colonização de patógenos exógenos (Wilson, 2001).

A arquitetura microscópica da placa bacteriana está bem definida, sendo as células bacterianas arranjadas em agrupamento ou colunas de micro colônias. Esta estrutura é permeável devido à sua porosidade permitindo que a saliva, o fluido gengival e os líquidos da dieta infiltrem-se na placa (Moore et al., 1994). O envolvimento de microrganismos na etiologia da doença periodontal está bem estabelecido, entretanto, uma completa identificação

de todos agentes microbianos envolvidos com a doença periodontal, ainda não está totalmente definida.

A placa supragengival apresenta um arranjo colunar de espécies bacterianas morfológicamente distintas da superfície dental e a placa subgengival frequentemente caracterizada por uma zona de gram-negativos e/ou espécies móveis localizadas adjacentes ao revestimento epitelial da bolsa, enquanto bastonetes e cocos gram-positivos parecem formar uma camada de organismos firmemente aderidos sobre o esmalte e superfície radicular (Listgarten, 1994).

As bactérias sub gengivais proeminentes encontradas nos biofilmes de sítios com saúde periodontal são: **Gram-positivas:** *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* e **Gram-negativas:** *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum*.

Controlar a formação de biofilme oral é uma constante luta diária duradoura para todos nós. O biofilme pode ser formado não somente nos dentes e nos tecidos moles, como também em uma multiplicidade de superfícies de biomateriais utilizados em restaurações de superfícies dentárias. Embora sua formação de biofilme em superfícies de biomateriais na cavidade oral pode parecer relativamente inofensivo, dependente da sua localização, suas conseqüências podem ser graves (Sbordone et al., 2003).

A deterioração (Beyth et al., 2008) da superfície de resinas compostas e cimentos de ionômeros de vidro tem sido demonstrada pelo aumento da rugosidade, efeitos sobre a exposição das partículas de enchimento, e por vezes por uma diminuição da micro-dureza dos materiais sobre a exposição a biofilmes *in vitro* (Fúcio et al., 2008).

A formação de biofilme em resinas compostas e cimentos de ionômeros de vidro leva a uma sucessão de eventos negativos em que os organismos colonizadores causam a deterioração grave da superfície que, por sua vez, promove a formação de biofilme e, com isso, a deterioração mais extensa da superfície. A manifestação clínica destes eventos negativos é o desenvolvimento de cárie em torno ou abaixo de uma restauração (Souza et al., 2009). A configuração dos cimentos ionoméricos ocorre por meio de uma reação ácido-base entre as partículas de vidro fluoroamino silicato e uma solução de ácido poliacrílico, obtendo-se uma estrutura que é dimensionalmente mais estável do que os compósitos. Assim, a utilização de cimentos ionoméricos potencialmente reduz a microinfiltração e aumenta a liberação de flúor, fator que atua com um potencial impacto sobre a formação de biofilme oral. A liberação de flúor ocorre por meio de uma libertação brusca inicialmente elevada que

pode ser entre 1,6 e 1,8 ug / mm². O flúor pode atuar como um efeito tampão para neutralizar os ácidos produzidos por bactérias (Wiegand et al., 2007) e suprimir o crescimento de cárie relacionada com as bactérias orais (Nicholson et al., 2000; Wiegand et al., 2007).

O cimento de ionômero de vidro possibilita a formação de um biofilme com baixa viabilidade (2% para 3%), possivelmente como resultado da liberação de fluoreto (Nakajo et al., 2009). Níveis de estreptococos em particular, *S. mutans* (Seppä et al., 1995) e *S. sanguis* (Hengtrakool et al., 2006), aparecem reduzidos. No entanto, um estudo *in vitro* (Al-Naimi et al., 2008) também mostrou que cimentos ionoméricos contendo flúor não reduzir a quantidade do crescimento bacteriano e a formação de biofilme sobre as superfícies banhadas em saliva. Isto sugere que o fluoreto não é um fator dominante no controle da formação do biofilme (Auschill et al., 2001).

2.3 BIOCOMPATIBILIDADE DOS MATERIAIS RESTAURADORES

A ciência dos materiais dentários tem a necessidade de acompanhar, conhecer e apreciar os aspectos biomecânicos que estão associados com a seleção e uso dos materiais a serem empregados na cavidade bucal, de modo a assegurar que a saúde dos tecidos orais será preservada ou restaurada. Em um sentido amplo, um biomaterial poderia ser definido como qualquer substância, que possa ser usada, por qualquer período de tempo, como parte de um sistema que objetivasse o tratamento ou a reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo. E, a biocompatibilidade ou bioaceitação, no que concerne aos tecidos orais é um parâmetro que deve ser considerado para sua formulação e uso. Sob este aspecto, parece óbvio agora que o ambiente hospedeiro destes biomateriais é especial em função da presença de bactérias e outros detritos da cavidade bucal, além das propriedades corrosivas da saliva e de outros fluidos (Bader et al., 1996). Portanto, não deverá:

- Causar dano à polpa e aos tecidos moles
- Conter substâncias tóxicas que, ao serem liberadas, se difundissem e fossem absorvidas pelo sistema circulatório, causando problemas de natureza sistêmica
- Possuir agentes com potencialidade sensibilizante que induzissem o aparecimento de respostas alérgicas
- Apresentar potencial carcinogênico

A formação do biofilme dentário pode ocorrer sobre todas as superfícies sólidas no ambiente bucal, independente de serem superfícies naturais, como esmalte e cimento, ou artificiais, como materiais restauradores (Baier et al., 1978, Chan et al., 1986). A interação entre o filme de proteína presente na superfície sólida e as bactérias, faz com que este sirva de precursor para a fixação bacteriana. Porém, o número e a condição de fixação da bactéria depende da força atômica da superfície sólida (energia livre de superfície), para que ocorra a deposição do filme proteico (Løe et al., 1965).

A rugosidade superficial parece ser a propriedade dos materiais restauradores que desempenha maior influência no processo de formação do biofilme dentário. Nas superfícies rugosas e irregulares o biofilme forma-se em maior quantidade e apresenta maturação mais rápida quando comparado às superfícies lisas (Quirynen et al., 1990; Quirynen et al., 1995; Gatewood et al., 1993). A energia livre superficial dos materiais também influencia na

formação do biofilme, sendo observada em substratos com alta energia livre de superfície, ou seja, substratos hidrofílicos (Jendresen et al., 1981; Pratt-Terpstra et al., 1989; Quirynen et al., 1990) . Portanto, uma superfície com baixa energia e baixa rugosidade de superfície, pode diminuir o acúmulo de placa *in vivo* (Quirynen et al., 1989).

Microorganismos com alta energia livre de superfície são encontrados em maioria na cavidade oral, podendo aderir preferencialmente a substratos hidrofílicos enquanto microrganismos com baixa energia de superfície são encontrados raramente na cavidade oral, o qual aderem melhor aos substratos hidrofóbicos (Busscher et al., 1984; Van Pelt et al., 1984).

Estudos têm demonstrado diferenças no biofilme formado sobre materiais restauradores, provavelmente devido às diferenças nas propriedades dos materiais como rugosidade superficial e energia livre superficial (Konishi et al., 2003).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a formação *in situ* do biofilme sobre materiais restauradores como as microscopias eletrônicas de varredura e transmissão (Hanning, 1999; Rimondini et al., 1997; Rimondini et al., 2002). Todavia, estas técnicas exigem fixação, desidratação ou inclusão do biofilme o que altera a sua arquitetura não permitindo uma análise adequada. Com o advento da microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), pôde-se estudar biofilmes dentários totalmente hidratados possibilitando análise mais fiel das relações existentes entre os componentes do biofilme, bem como das relações entre o biofilme e o substrato ao qual está aderido (Costerton et al., 1994; Netuschil et al., 1998; Auschill et al., 2001; Wood et al., 2000; Konishi et al., 2003).

De acordo com a bula do material restaurador utilizado neste estudo, as características de cada tipo foram descritas em tópicos (3M ESPE):

2.3.1 Resina Composta nanoparticulada - Filtek Z350 XT

A Filtek Z350 XT Universal Restorative (3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brasil) é uma resina composta fotoativada desenvolvida para ser usada em restaurações anteriores e posteriores. Todas as cores são radiopacas. Um sistema adesivo é usado para unir permanentemente a restauração à estrutura dentária. A restauração é disponível em uma grande variedade de cores de Dentina, Corpo (Body), Esmalte e Translúcido. A resina é embalada em seringas.

Indicações de uso

A resina Filtek Z350 XT é indicada para uso em:

- Restaurações diretas anteriores e posteriores (incluindo superfícies oclusais)
- Construções de núcleos
- Esplintagens
- Restaurações indiretas (incluindo inlays, onlays e facetas)

Composição

A resina contém bis-GMA, UDMA, TEGDMA e bis-EMA. As partículas são uma combinação de sílica com tamanho de 20nm não aglomeradas / não agregadas, zircônia com tamanho de 4-11nm não aglomeradas/não agregadas e aglomerados, clusters, de partículas agregadas de zircônica/sílica (combinação de partículas de sílica com 20nm e Zircônia 3 com 4-11 nm).

As cores de Dentina, Esmalte e Corpo (body) possuem tamanho médio de partículas do aglomerado com cerca de 0,6-10 microns. As cores translúcidas (T) apresentam tamanho médio de partículas do aglomerado com 0,6-20 microns. A carga de partículas inorgânicas representa cerca de 72,5% por peso (55,5% em volume) para cores Translúcidas e 78,5% em peso (63,3% por volume) para todas as outras cores.

2.3.2 Ionômero de vidro convencional – Ketac Fil Plus

O cimento de ionômero de vidro convencional Ketac Fil Plus (3M ESPE Dental Products) possui adesão química à estrutura dental, garantindo um ótimo selamento marginal na cavidade inibindo a formação de fendas. Descarta a necessidade de retenções mecânicas para sua aplicação. Atua como um reservatório de íons de flúor, liberando flúor e também se recarregando. Dessa maneira, atua na prevenção de cáries por meio da remineralização da estrutura dental, diminuindo a chance de recidiva de cárie. É radiopaco o que facilita o diagnóstico radiográfico. Apresenta-se em frascos contendo pó (10 g) e líquido com 8,3 mL.

Indicações de uso

- Restaurações em dentes decíduos
- Restaurações do tipo Classe III e V em dentes permanentes
- Selante de fóssulas e fissuras

Composição

Pó contém vidro de fluorsilicato de estrôncio, alumínio, lantânio e pigmentos. O líquido possui ácido policarbônico, ácido tartárico e água.

2.3.3 Ionômero de vidro nanoparticulado modificado por resina – Ketac Nano

Ketac Nano é um ionômero de vidro fotopolimerizável modificado por resina desenvolvido com nanotecnologia. Esta consistiu de uma combinação de nanopartículas e nanoaglomerados, o que adiciona benefícios que não são normalmente associados com ionômeros de vidro incluindo estética.

Indicações de uso

- Restaurações classe I
- Restaurações class V
- Restaurações em dentes decíduos

Composição

A composição química do Ketac Nano restaurador baseia-se no ácido de metacrilato modificado inicialmente comercializada no Vitremer e outros materiais 3M ESPE.

2.3.4 Ionômero de vidro modificado por resina – Vitremer

O cimento de ionômero de vidro modificado por resina foi introduzido no mercado para superar os problemas de sensibilidade à umidade e a baixas propriedades mecânicas iniciais associadas aos cimentos convencionais. Apresenta em sua formulação uma porção de resina composta que o torna mais resistente à fratura e abrasão pela escovação.

O Vitremer (3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brasil) é um material restaurador que apresenta com características e benefícios, a tripla presa, ou seja, é fotopolimerizável, autopolimerizável e reação ácido-base. Tem a polimerização garantida em qualquer situação clínica, mesmo em ausência de luz. É um material radiopaco, com um melhor vedamento marginal, o que irá proporcionar restaurações duráveis. Sua aplicação é em único incremento. Libera íons flúor sendo assim, cariostático e bactericida. Sua apresentação comercial é em frascos contendo pó (9g incluindo uma colher) nas cores A3/A3,5/B2/Pediatria; líquido (8 mL); primer (6,5 mL); glazer (6,5 mL).

Indicações de uso

O Vitremer é indicado para:

- Restaurações em classes III e V de dentes permanentes e todas as classes em dentes decíduos
- Construção de núcleo de preenchimento
- Restaurações realizadas sob a técnica do sanduíche

Composição

Em relação a sua composição, este cimento pode ser formulado de maneira simples ou complexa. A formulação simples é cimento de ionômero de vidro adicionado a pequenas quantidades de monômeros resinosos (2-hidroxietil-HEMA ou bis GMA). Outra, mais complexa sofreu modificações na cadeia poliácida, a qual ganhou radicais que podem ser polimerizados pela luz.

2.4 ESTUDOS DA SUPERFÍCIE DOS MATERIAIS RESTAURADORES – PERFILOMETRIA E ÂNGULO DE CONTATO

A rugosidade dos materiais restauradores é fator determinante na manutenção da saúde bucal, já que a adesão das bactérias nos tecidos moles e nas estruturas dentais desempenha papel chave no desenvolvimento das doenças orais. Na cavidade bucal, a maioria das bactérias apresenta a capacidade de sobrevivência se estiverem aderidas em tecidos duros como dentes, implantes dentários, materiais restauradores e revestimentos de próteses. Nesses sítios, a energia livre e a rugosidade das superfícies duras intrabuciais, têm impacto na adesão bacteriana inicial e breve maturação da placa, caracterizada pelo aumento proporcional de micro-organismos, o que intensifica o risco de infecções periodontais que podem acometer os materiais restauradores (Kuhar et al., 2005).

Os micro-organismos que dão origem a cárie e a periodontite só podem sobreviver na cavidade bucal se estiverem aderidos à superfície. Assim, a rugosidade da superfície dos materiais tem uma importância clínica no processo da retenção da placa bacteriana na cavidade oral (Aksoy et al., 2006). Um aumento na rugosidade superficial resulta em um aumento simultâneo do acúmulo de placa bacteriana, aumentando assim o risco para a doença cárie e a inflamação periodontal (Bollen et al., 1997). Dessa forma, o estudo da superfície dos materiais restauradores se torna fundamental no momento da escolha do tipo de material a ser utilizado no processo de reabilitação de LCNC.

A topografia da superfície de um material é constituída de forma, ondulação e rugosidade, conforme mostrado na Figura 3. Para separar estes três parâmetros é necessário atentar para a forma com que são separados, lembrando que diferentes equipamentos não influenciam nesta separação. Para separar a rugosidade, dos erros de forma e ondulação, utilizam-se diferentes tipos de filtros, sendo que para medições bidimensionais (2D), é usual utilizar um comprimento de corte que seja pelo menos 2,5 vezes o espaçamento de pico a pico e sempre definido para ser um quinto do comprimento de medição (Figura 4), enquanto que para medições tridimensionais (3D), utiliza-se um filtro Gaussiano (Stout et al., 1993).

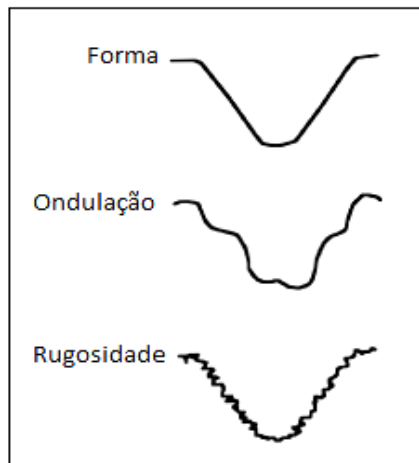


Figura 3. Representação gráfica dos defeitos de forma, ondulação e rugosidade

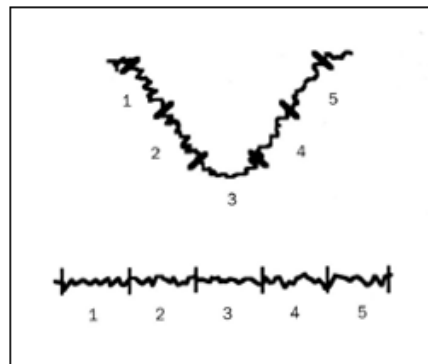


Figura 4. Comprimento de corte utilizado para excluir erro de forma em medições 2D

Dong e colaboradores em 1994 listaram seis itens exemplificando o motivo pelo qual a análise topográfica em 3D é superior a 2D:

1. Uma vez que a topografia da superfície é 3D na natureza, apenas análises 3D podem representar fielmente as características naturais da topografia da superfície
2. Parâmetros tridimensionais são mais realistas do que aqueles obtidos a partir de um perfil de 2D
3. Análise 3D pode fornecer alguns parâmetros funcionais, tais como volume de lubrificação, volume de detritos e área de contato
4. A análise estatística da topografia de superfície 3D é mais confiável e mais representativa, uma vez que é obtido um grande volume de dados aumentando a independência dos dados

5. As imagens 3D podem ser produzidas com a ajuda de um computador e uma técnica de processamento de imagem apropriado
6. Sistemas 2D normalmente usam medidas analógicas, enquanto os sistemas 3D utilizam principalmente de técnicas digitais sendo que os sistemas digitais são mais flexíveis no processamento e armazenamento de dados.

Os equipamentos de medição e normas para a avaliação topográfica de superfícies foram originalmente desenvolvidos para aplicações de Engenharia. Dentre as varias normas escritas para avaliação topográfica de superfície, existem três grandes grupos de instrumentos que podem fornecer dados quantitativos e qualitativos de avaliação topográfica da superfície: perfilômetros de contato mecânico, instrumentos de perfilometria a laser e microscopia de varredura (Dong et al., 1994).

A perfilometria de contato mecânico funciona com uma ponta (geralmente esférica com raio de 2 ou 10 μm) acoplada a um cantilever que se movimenta na direção vertical da amostra gerando um perfil topográfico. Para perfilômetros de contato mecânico, o raio de ponta da esfera e o ângulo (podendo ser de 60 ou 90 graus) determinam o menor gap que a ponta poderá entrar (Figura 5), determinando o perfil topográfico da amostra. Um fator negativo desta análise é que a ponta esta sempre em contato com a amostra, estando sujeito à contaminação e desgaste devido à carga aplicada para que ocorra o contato. Portanto, deve-se saber qual é a dureza do material a ser ensaiado. (Stout et al., 1993).

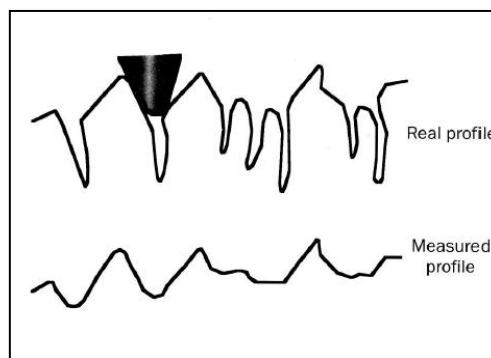


Figura 5. Diagrama da influência do raio de ponta sobre o perfil medido. Um raio que é muito grande resultará numa perda de informação

As análises realizadas pelos sistemas ópticos de perfilometria a laser são sem contato, e por esse motivo são atrativos na pesquisa de biomateriais. Além da vantagem do não

contato, os instrumentos ópticos geralmente são mais rápidos e possuem melhor resolução em relação aos sistemas mecânicos. Esse sistema utiliza um feixe de luz como uma caneta ótica com aproximadamente 1 μm de diâmetro. Este feixe varre a superfície com o movimento da amostra, sendo que o foco é determinado pela detecção da intensidade de luz. Para determinar a resolução do equipamento deve-se atentar para o tamanho do feixe, a abertura e o comprimento de onda da luz. Um dos problemas mais frequentes para este tipo de equipamento está relacionado com superfícies com declives superiores a 15 graus, que provocam um espalhamento da luz, dificultando a medição (Stout et al, 1993).

Para a microscopia de varredura confocal a laser utiliza-se um sistema de detecção de foco (TopScan 3D, Heidelberg Instruments GmbH, Alemanha), que emprega um microscópio de varredura confocal a laser, onde a luz refletida do laser e a posição XYZ do ponto são medidos simultaneamente. Além disso, o sistema ajusta o ponto de foco ponto a ponto, independentemente das medidas anteriores, reduzindo os erros de integração e para garantir uma fina resolução. O TopScan utiliza dois pinholes para filtrar a luz do detector (Stout et al, 1993).

Para descrever numericamente a topografia de superfície utilizam-se parâmetros, que podem ser classificados em três grupos: altura, espacial/textura e híbrido. O primeiro grupo serve exclusivamente para descrever a altura das irregularidades. O segundo grupo descreve os parâmetros espacial ou textura, obtendo a distância horizontal entre as irregularidades. O terceiro grupo é o parâmetro híbrido que inclui as informações espaciais e de altura (Stout et al, 1993).

Um problema é que existem muitos parâmetros diferentes de rugosidades de superfície (mais de 150 podem ser encontrados na literatura), e alguns foram inventados para uma aplicação específica e nem sempre são úteis em um sentido mais amplo. No entanto, a topografia da superfície não pode ser caracterizada também com apenas um parâmetro, já que uma superfície pode ter o mesmo desvio de altura, mas diferem na distribuição espacial em relação ao outro (Figura 6) (Stout et al, 1993).

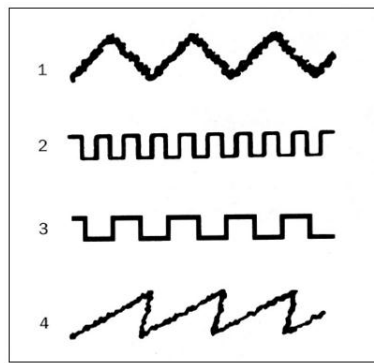


Figura 6. Diferentes perfis com mesmo Sa

Na literatura odontológica o parâmetro frequentemente utilizado para a avaliação da qualidade da superfície de materiais dentários é a rugosidade superficial, ou seja, valores de Sa. Este parâmetro é definido como o desvio absoluto da média ao longo do comprimento da amostragem, ou seja, é a média aritmética entre os picos e vales percorridos pelo instrumento. É o mais usado universalmente devido ao controle de qualidade (Gadelmawla et al., 2002).

O parâmetro Sq representa o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície, por isso é um parâmetro importante para descrever a rugosidade da superfície por meio de métodos estatísticos. Esse parâmetro é mais sensível que o parâmetro Sa quando há grandes desvios da linha média. O parâmetro espacial Sds representa a densidade dos picos máximos, enquanto o parâmetro Ssc é híbrido, o que demonstra uma análise da amplitude e espacial ao mesmo tempo (Gadelmawla et al., 2002).

Estudos de análise superficial vêm sendo realizados há algumas décadas empregando-se a perfilometria 2D, que apresenta limitações na análise de superfície quando comparada à 3D. Esta vem sendo amplamente empregada pela Engenharia de Materiais para avaliar alterações superficiais e, recentemente, tem sido utilizada na Odontologia para avaliar alterações de superfície apresentadas por materiais restauradores quando submetidos a diferentes tratamentos. A perfilometria 3D nos fornece uma análise tanto qualitativa quanto quantitativa, permitindo um melhor entendimento dos materiais restauradores. A análise qualitativa representa a justaposição de vários perfis bidimensionais que geram uma imagem tridimensional, o que possibilita uma noção mais próxima da superfície estudada (Agra et al., 2002).

Considerando a análise quantitativa verificou-se que a rugosidade média era o parâmetro determinante. Porém, é sabido que a rugosidade média, quando analisada separadamente, fornece informações limitadas (Agra et al., 2002). É indicada para o monitoramento de processos de produção em que podem ocorrer mudanças graduais na superfície. Portanto, optou-se por usar os parâmetros Sds e Ssc, que geram informações complementares para um bom entendimento do comportamento clínico dos materiais restauradores, o que proporciona uma melhor avaliação das propriedades funcionais das superfícies (Mummery, 1990).

O crescimento do biofilme dentário parece ocorrer principalmente pela multiplicação de células aderidas (Brex et al., 1983; Quirynen et al., 1989). Weerkamp et al. em 1985, estudaram a medida do ângulo de contato da superfície bacteriana para determinar sua energia livre de superfície. As espécies de *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. salivarius* apresentaram-se de forma homogênea, tendo alta energia livre de superfície, não sendo afetado pela presença da película salivar. *S. mitis* tiveram energia livre de superfície muito baixa, que diminuiu significativamente após a presença da película salivar.

O cálculo da energia livre se superfície, na interface da adesão bacteriana na superfície sólida em suspensão de saliva mostrou que estreptococos com maior energia livre se superfície encontram condições mais favoráveis para a adesão em superfícies com alta energia livre se superfície. Entretanto, a energia livre de superfície do *S. mitis*, não permitiu, em função da presença da película salivar, ser capaz de aderir em superfícies com baixa energia livre se superfície. Esses resultados indicam que, a superfície do esmalte dentário, com baixa energia livre se superfície, seria desfavorável para adesão de uma maior quantidade de estreptococos orais (Tanner et al., 2005).

2.5 ANÁLISE DO BIOFILME NA MICROSCOPIA CONFOCAL

O microscópio confocal de varredura a laser (MCVL) é um microscópio fluorescente que permite que o laser atravesse a amostra para que ocorra sua varredura interna. Essa penetração do laser permite a excitação dos fluoróforos presentes nos corantes, resultando na liberação de energia fluorescente, que é detectada pelos tubos fotomultiplicadores, que registram essa excitação. O escaneamento é controlado por um microprocessador que coordena a leitura e a transferência de dados ao computador para produção da imagem digital (Palmer et al., 1999).

Segundo Carlsson et al., 1989, as imagens digitais na secção óptica sagital (x-y), produzidas em série (“stacks”), são automaticamente coletadas. A série de imagens pode ser processada por computador para criar reconstruções tridimensionais. As vantagens do uso da microscopia confocal seriam:

- Melhor resolução em função da perda de luz ser significativamente reduzida devido à abertura confocal (pinhole)
- Boa performance da microscopia em 3D
- O seccionamento óptico que evita que ocorra a interferência da parafina na amostra, durante o seccionamento mecânico, impedindo assim, que ocorra distorção durante o corte mecânico
- O seccionamento óptico para MCVL ser de 1 μm já o mecânico é de 8 μm^2 .

Dessa forma, a MCVL tem provado ser ideal para estudar o biofilme microbiano, pois permite a análise de biofilmes *in situ*, ou seja, de forma hidratada e sem nenhum tipo de fixação química ou técnica de inclusão. Essa característica acoplada com a habilidade em digitalizar as imagens ópticas de secções finas, de locais específicos do biofilme, e livres de interferências ópticas fora de foco (fora da abertura pinhole), permite a observação espacial no eixo horizontal (xy) e sagital (xz), que existe entre a bactéria, seus produtos extracelulares e seu meio (Woldringh et al., 1977).

O programa COMSTAT é capaz de analisar as imagens 3D obtidas em MCVL pela soma das secções ópticas de cada imagem. Na análise quantitativa realizada por esse programa, o operador estabelece um valor de limiar para cada conjunto de secções ópticas (isto é, para cada amostra do biofilme). Este limiar auxilia o programa na identificação da presença ou ausência de biomassa em cada pixel de cada imagem. Portanto, o operador

analisa as secções de todas as amostras e seleciona um limiar em que apenas o biofilme possa ser quantificado pelo programa, fazendo com que o background (plano na superfície que o biofilme está depositado), seja identificado, e transformado em fundo preto. Assim, quando cada secção for convertida em imagem preta e branca, pelo programa, os pixels brancos significam a presença de biomassa e os pretos, a ausência de biomassa. Em seguida, seleciona-se as ferramentas do programa para quantificar as propriedades do biofilme (Heydorn et al., 2000).

Desta forma, a caracterização quantitativa da característica estrutural do biofilme é uma ferramenta valiosa para estudar a resposta e o comportamento do biofilme. Atualmente, a MCVL é uma ferramenta de escolha para estudar os biofilmes diretamente no seu habitat natural (*in situ*) (Stenberg et al., 1993; Neu et al., 1997; Palmer et al., 1999; Yerly et al., 2007), devido sua característica não invasiva e não destrutiva.

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a rugosidade superficial de quatro materiais restauradores: Resina composta nanoparticulada (Filtek Z350 XT), Ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer), Ionômero de vidro convencional (Ketac Fil Plus), Ionômero de vidro nanoparticulado modificado por resina (Ketac Nano)
2. Avaliar a hidrofobicidade superficial destes materiais restauradores, com água deionizada
3. Avaliar a colonização bacteriana inicial formada *in situ* sobre os quatro tipos de materiais restauradores, por meio da microscopia confocal de varredura a laser
4. Avaliar os métodos de rugosidade da superfície, hidrofobicidade, crescimento do biofilme e suas correlações

4. METODOLOGIA

4.1 CONFEÇÃO DAS AMOSTRAS

60 amostras foram confeccionadas a partir da seleção dos materiais restauradores (Figura 7). As amostras foram produzidas seguindo as orientações do fabricante (Figuras 8, 9 e 10), usando uma matriz de teflon com orifícios padronizados com diâmetro de 4,0 mm e espessura de 2,0 mm. O material foi manipulado e inserido (Figuras 11 e 12) no interior da matriz. Tiras de poliéster transparentes foram posicionadas sobre o material (Figura 13) e então com pressão digital foi definida superfície lisa e polida de forma padronizada. Para os materiais ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer), ionômero de vidro modificado por resina nanoparticulada (Ketac Nano), resina composta nanoparticulada (Z350 XT) a polimerização foi realizada por meio de luz halógena com intensidade luminosa de 1000 mW/cm² e comprimento de onda 400-505 nm (Optilux 501, Demetron, USA) (Figuras 14 e 15).



Figura 7. Ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer, 3M-Espe); Ionômero de vidro convencional (Ketac Fil Plus, 3M-Espe); Ionômero de vidro modificado por resina nanoparticulada (Ketac Nano, 3M-Espe); Resina composta nanoparticulada (Filtek Z350, 3M-Espe)



Figura 8. Proporção do Ketac Nano

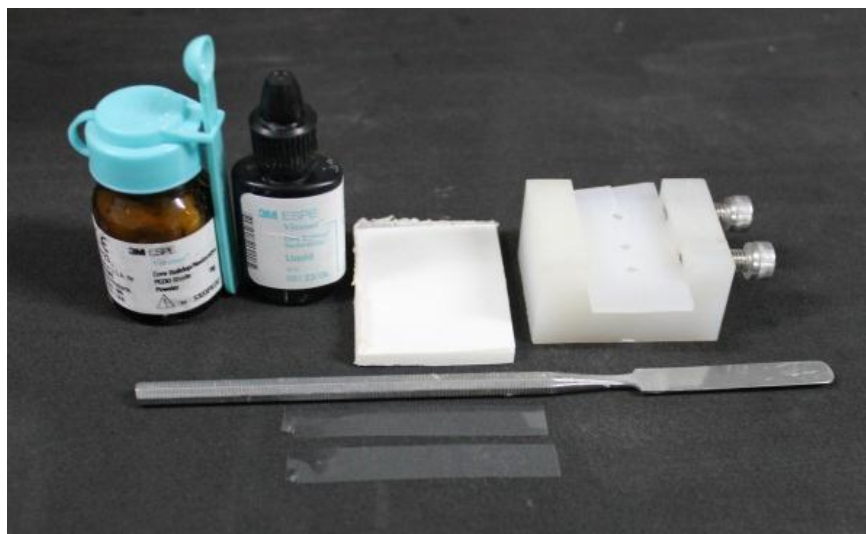


Figura 9. Ionômero de vidro modificado por resina – Vitremer



Figura 10. Proporção do material a ser espatulado – Vitremer

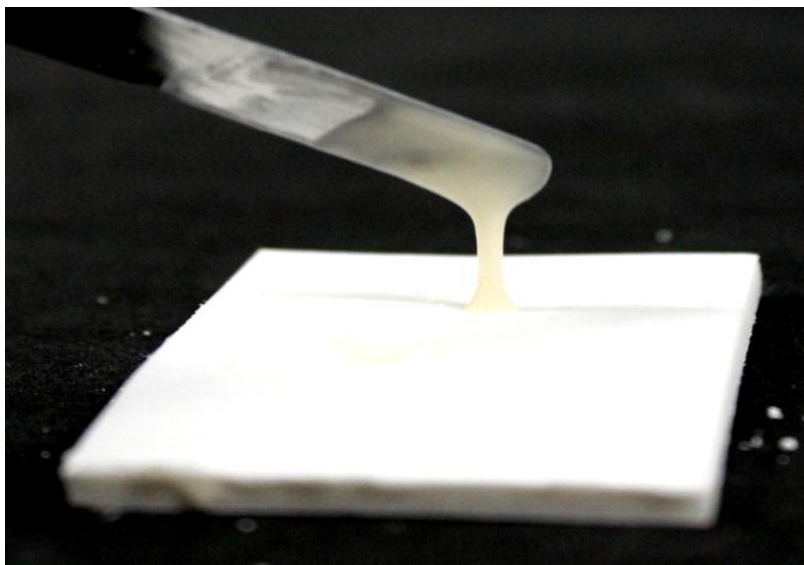


Figura 11. Espatulação do material – Vitremer

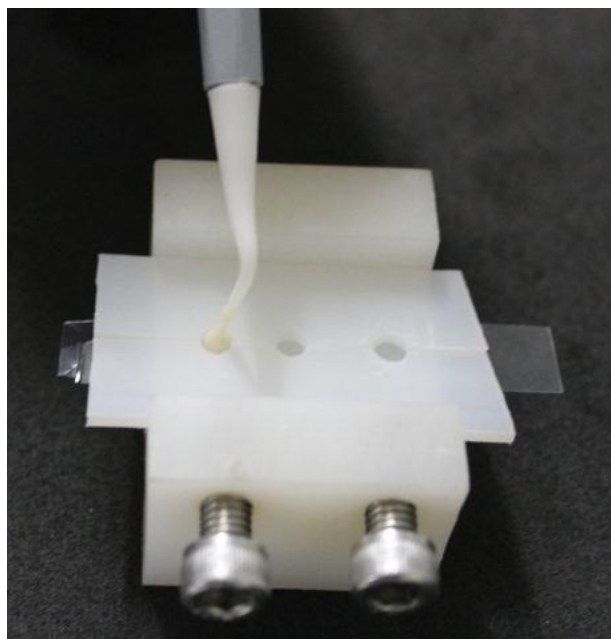


Figura 12. Inserção do material no interior da matriz de teflon. Tira de poliéster posicionada – Vitremer

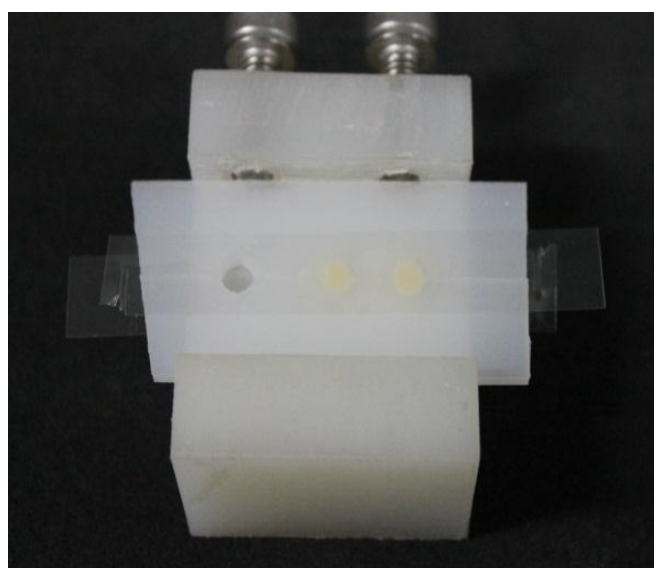


Figura 13. Posicionamento da matriz de poliéster sobre os orifícios – Vitremer

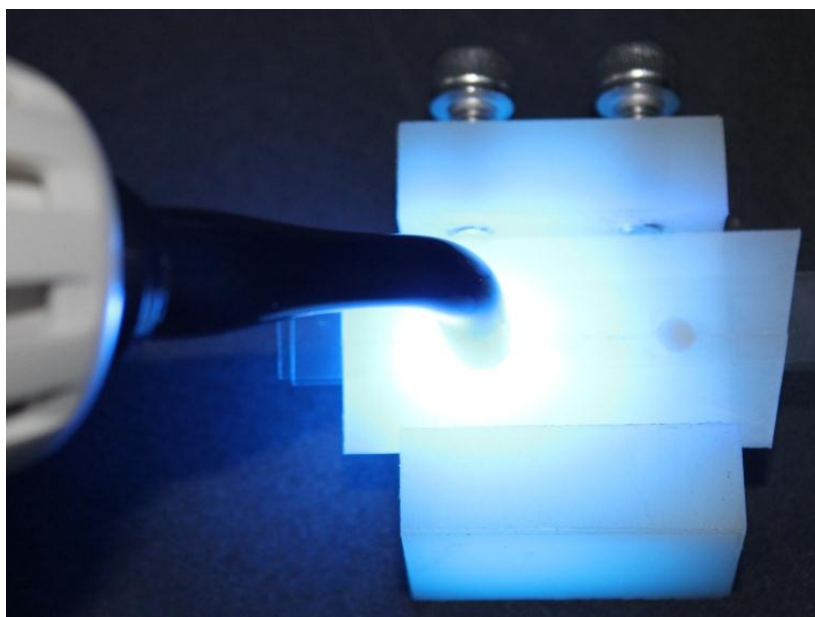


Figura 14. Polimerização do material - Optilux 501, Demetron, USA

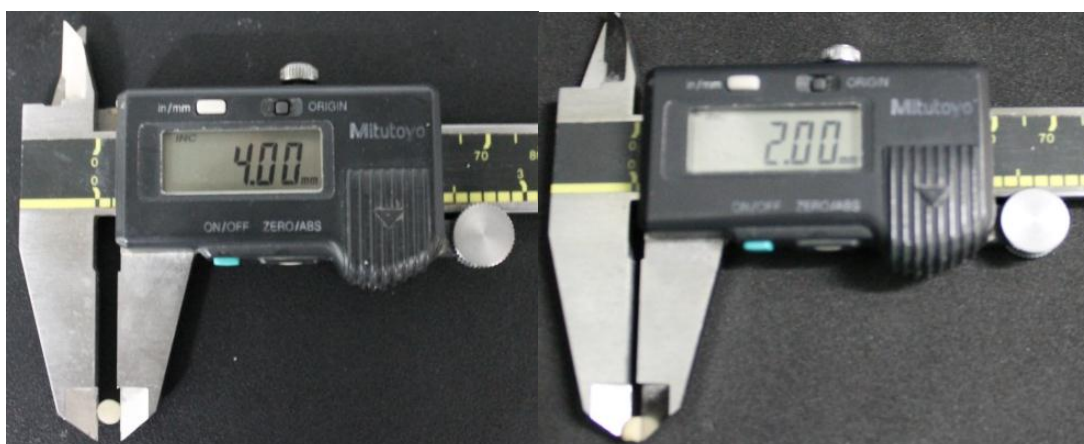


Figura 15. Padronização do tamanho da amostra (4x2 mm)

4.2 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA TOPOGRAFIA DE SUPERFÍCIE 3D DOS MATERIAIS RESTAURADORES

Para fazer a análise da rugosidade, utilizou-se um perfilômetro a laser UBM (Taylor Hobson Ltd, Leicester, LE). De acordo com o tamanho das amostras (4x2 mm), algumas medidas foram ajustadas e padronizadas no aparelho, a fim de se obter uma leitura com os mesmos parâmetros:

- Área: 1x1 mm
- Densidade de pontos: 1000/100
- Velocidade: 0,25mm/s
- Taxa de medição: 250 pontos/s
- Cut-off: 0,25 mm

Foram analisadas 40 amostras (4x2 mm), sendo 10 de cada grupo. As mesmas foram divididas em 4 grupos, identificadas por siglas e numeradas:

- Vitremer – VIT 01 a 10
- Filtek Z350 XT – RES 01 a 10
- Ketac Fil Plus – QUETAC 01 a 10
- Ketac Nano – NANO 01 a 10

As amostras foram posicionadas sobre a mesa do aparelho onde o feixe de luz foi incidindo perpendicularmente no centro da mesma. Cada leitura demorou, em média, 12 minutos (Figura 16).

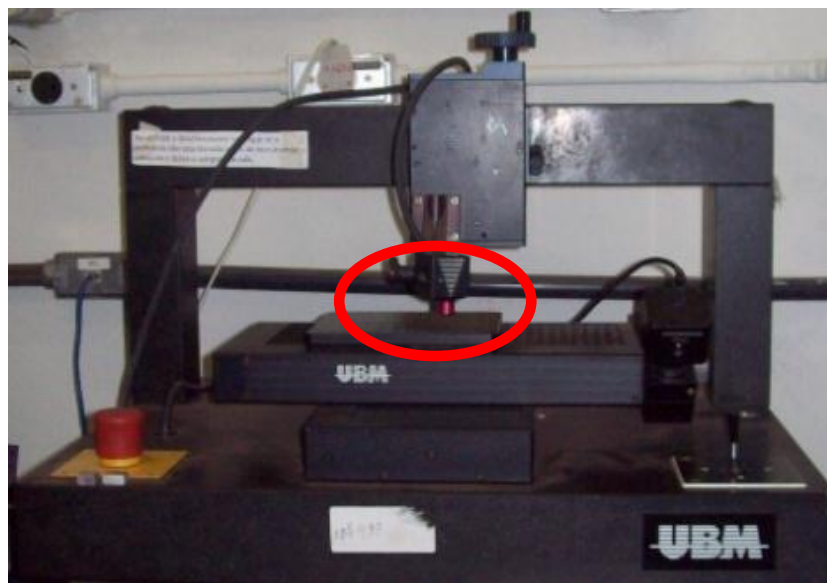


Figura 16. Interferômetro a laser UBM (Taylor Hobson Ltd, Leicester, LE)

Com todas as amostras submetidas à perfilometria, as imagens obtidas foram lançadas no software Mountains Map, versão 3.0.11, para obtenção dos parâmetros.

Após aquisição de todos os parâmetros, os valores de S_a , S_q , S_{ds} e S_{sc} foram submetidos à análise estatística.

4.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DO ÂNGULO DE CONTATO

A hidrofobicidade dos quatro tipos de materiais restauradores foi avaliada, em 5 amostras de cada grupo, por meio da medida do ângulo de contato da água sobre as amostras. O ângulo de contato foi determinado utilizando-se a técnica da gota.

O líquido usado para calcular a hidrofobicidade foi a água deionizada depositada sobre a superfície lisa e plana da amostra com auxílio de uma seringa adaptada ao goniômetro (Ramé-AB74 Hart – DROPimage, Advanced, USA). Uma gota foi dispendada sobre a amostra, e as medições se iniciaram em 0 (zero) segundos até 20 (vinte) segundos. Desta forma, o ângulo de contato (graus) foi calculado pelo software Advanced Drop Shape Analysis do próprio equipamento, fornecendo a média e o desvio padrão das medidas obtidas em cada amostra para estes tempos.

4.4 AVALIAÇÃO DO BIOFILME NA MICROSCOPIA CONFOCAL

O biofilme dental foi coletado de um indivíduo, aleatório, com boa saúde bucal, depois de oito horas, sem consumir comida ou bebida. Antes do ensaio experimental, o doador da placa bacteriana realizou procedimentos de higiene bucal, com escova de dente e fio dental. Houve o termo de consentimento livre e esclarecido, e os critérios de exclusão foram o uso de antibióticos ou clorexidina, três meses anteriores ao estudo, o uso do tabaco e xerostomia, segundo Brentel et al., 2011.

Utilizando um swab, o biofilme foi coletado nas faces vestibular do dente 33, lingual do dente 45, na mucosa jugal e língua. Em seguida, por meio de semeadura de isolamento, fez-se o inóculo num ponto da superfície do meio ágar de BHI (Brain Heart Infusion Agar, HIMEDIA®, Ref: M211-500G, AUG-2014; LOT 0000066245, Mumbai, Índia) espalhando-se o mesmo por estrias em toda a placa. Após a semeadura, incubou a cultura por 24 horas, a 37°C em estufa, por meio de calor seco (BIOMATIC, Porto Alegre, Brasil), em condições ótimas para seu crescimento (Figura 17).



Figura 17. Crescimento do biofilme 24 horas após a semeadura

Após 24 horas, selecionou-se uma colônia isolada (Figura 18). A mesma foi coletada e inserida em um caldo estéril de BHI (Figura 19), para posterior crescimento (Brain Heart Infusion Broth, HIMEDIA®, Ref: M210-500G, DEC-2014; LOT 0000073129, Mumbai, Índia) por 24 horas, a 37°C na estufa.



Figura 18. Seleção de uma colônia isolada



Figura 19. Caldo estéril de BHI

A suspensão bacteriológica foi diluída (Figuras 20 e 21) a uma densidade padrão de 1 McFarland (3×10^8 unidades formadoras de colônia/mL – UFC/mL), que corresponde a 630 μ l de caldo de bactéria diluído a 3 mL de caldo não contaminado de BHI. Assim, as amostras foram posicionadas em tubos de eppendorfs e preenchidas até recobrir as mesmas (Figura 22), em uma quantidade padrão de 200 μ l de caldo bacteriológico. Em seguida, os 40 tubos eppendorfs, sendo 10 de cada grupo experimental, foram incubados na estufa por 24 horas a

37° C (Figura 23), para crescimento do biofilme. Após este período, as amostras foram removidas dos eppendorfs (Figura 24) e coradas com fluoresceína sódica a 1% (Allergan, Guarulhos-SP, lote: F29374, 17 junho 12 e F32817, junho 13) por 15 minutos (Figuras 25, 26 e 27). Para remoção do excesso de corante utilizou PBS (tampão fosfato-salino) filtrado, repetindo este processo uma vez (Figuras 28, 29 e 30).



Figura 20. Diluição da suspensão bacteriológica em caldo de BHI não contaminado

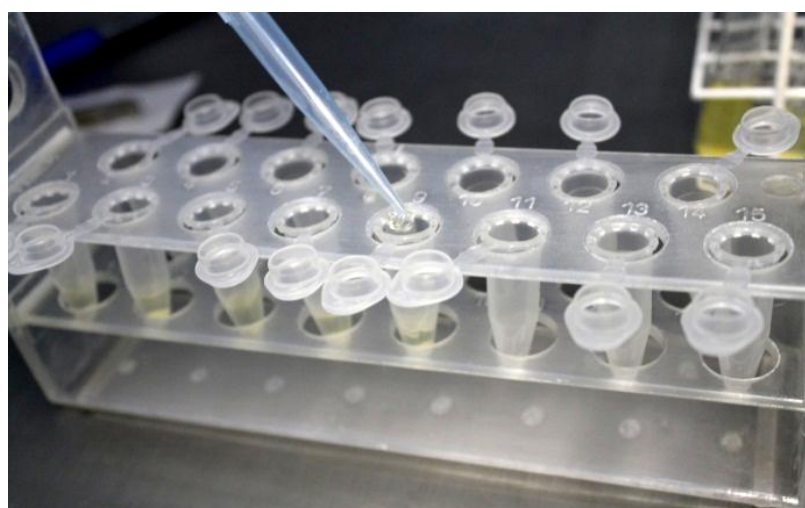


Figura 21. Caldo bacteriológico diluído colocado nos eppendorfs contendo as amostras

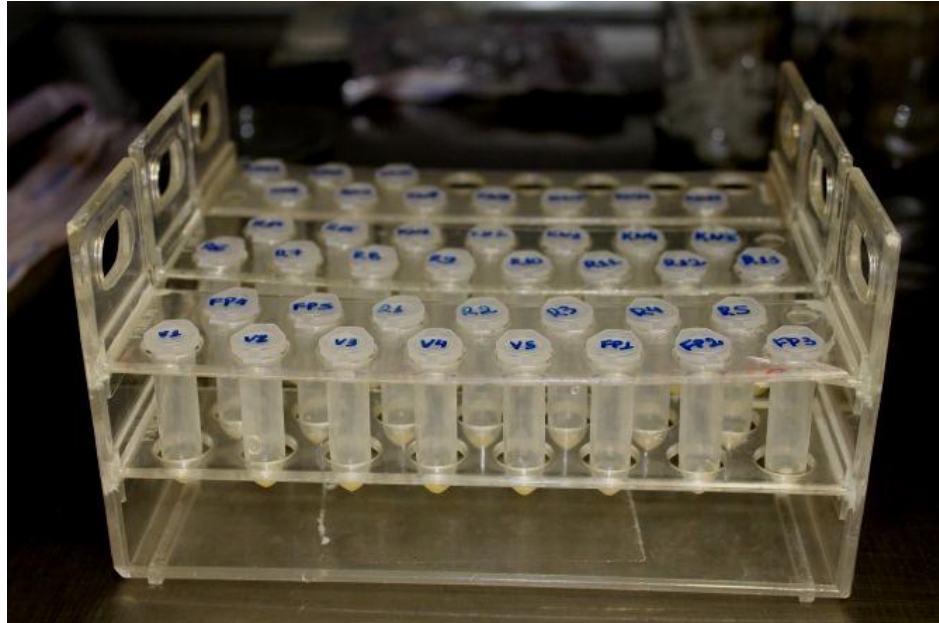


Figura 22. Amostras com caldo bacteriológico



Figura 23. Amostras colocadas em estufa a 37°C por 24 horas

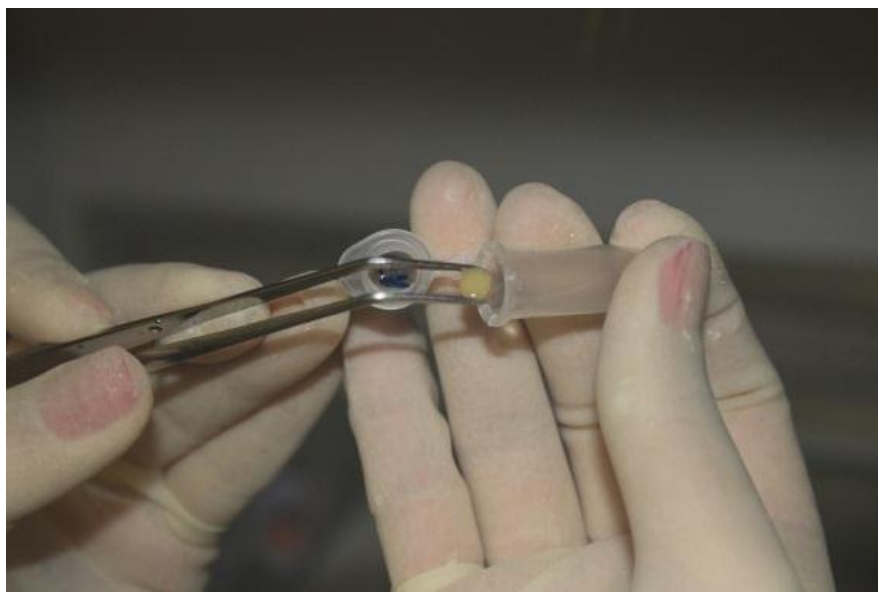


Figura 24. Amostra sendo retirada do caldo 24 após crescimento bacteriológico

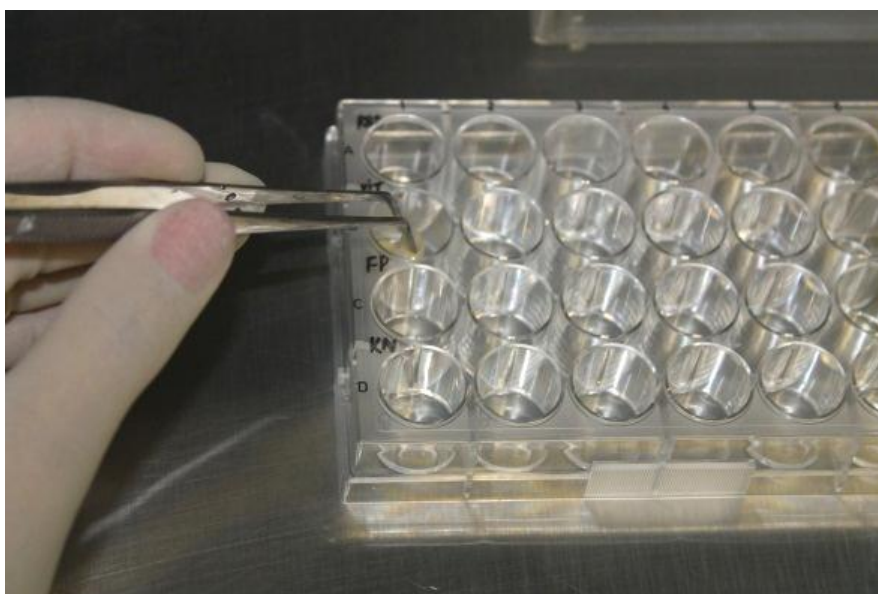


Figura 25. Amostra sendo colocada no poço da placa



Figura 26. Corante proteico – Fluoresceína Sódica a 1%

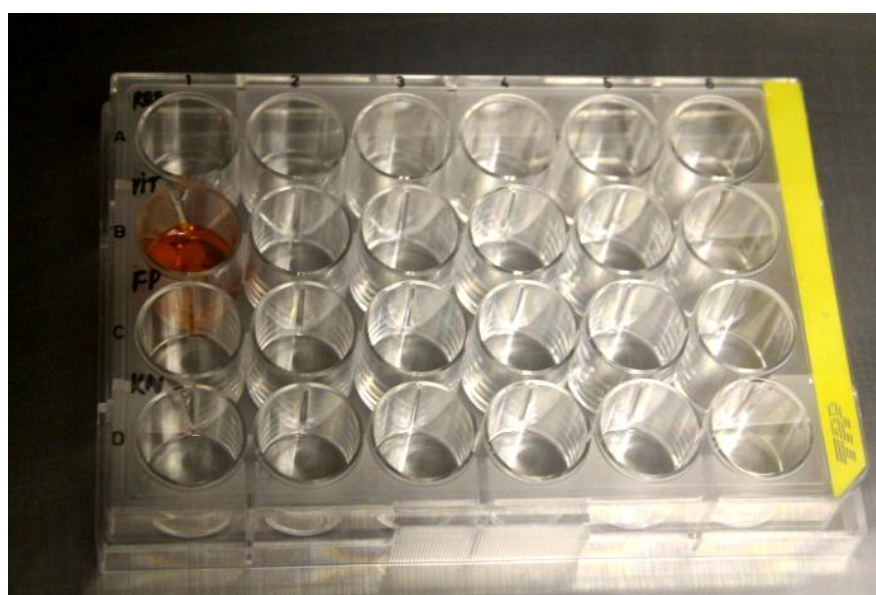


Figura 27. Amostras colocadas no corante por 15 minutos

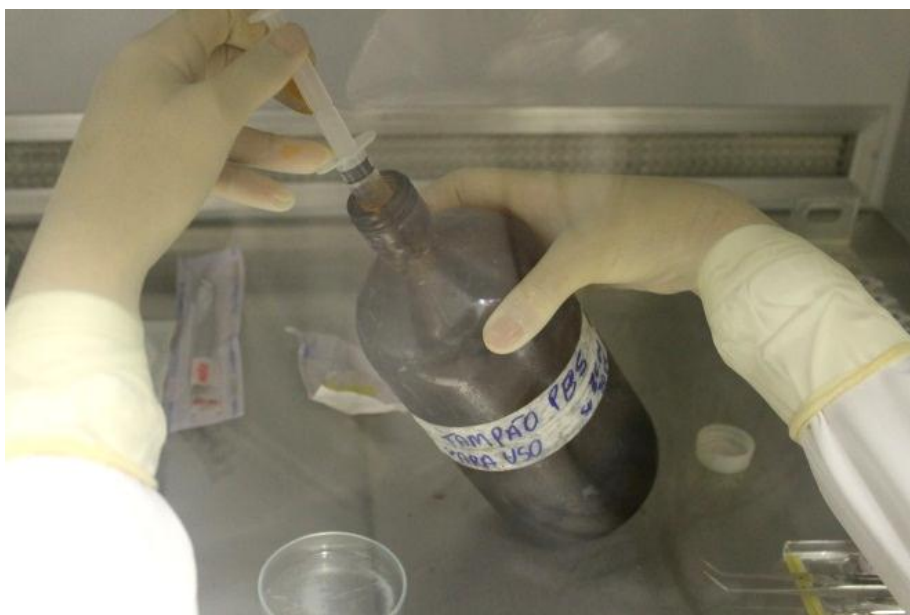


Figura 28. Solução tampão para lavagem das amostras

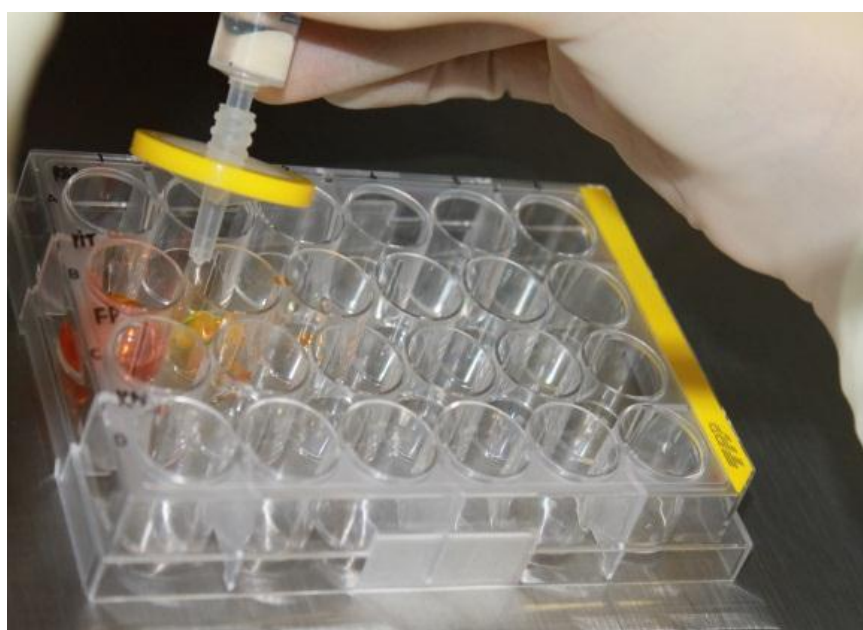


Figura 29. Lavagem das amostras

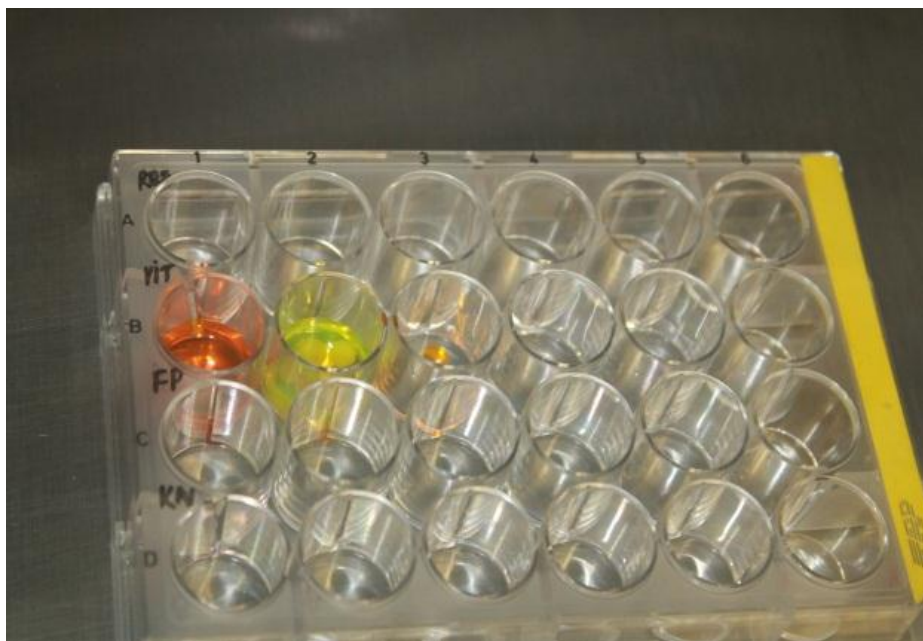


Figura 30. Amostras lavadas com solução tampão prontas para serem analisadas no MCVL

Após a coloração com o corante proteico e remoção do excesso de PBS, as amostras foram imediatamente posicionadas sobre a lâmina de vidro e analisadas no microscópio de varredura confocal a laser (MCVL) (Microscopia Confocal - LSM META 510, Carl Zeiss, Alemanha), usando laser argônio, em um comprimento de onda de excitação de 488 nm. As lentes ópticas foram padronizadas em objetiva 10x/0.3 de aumento para avaliar a espessura e biovolume do biofilme (Brentel et al., 2001).

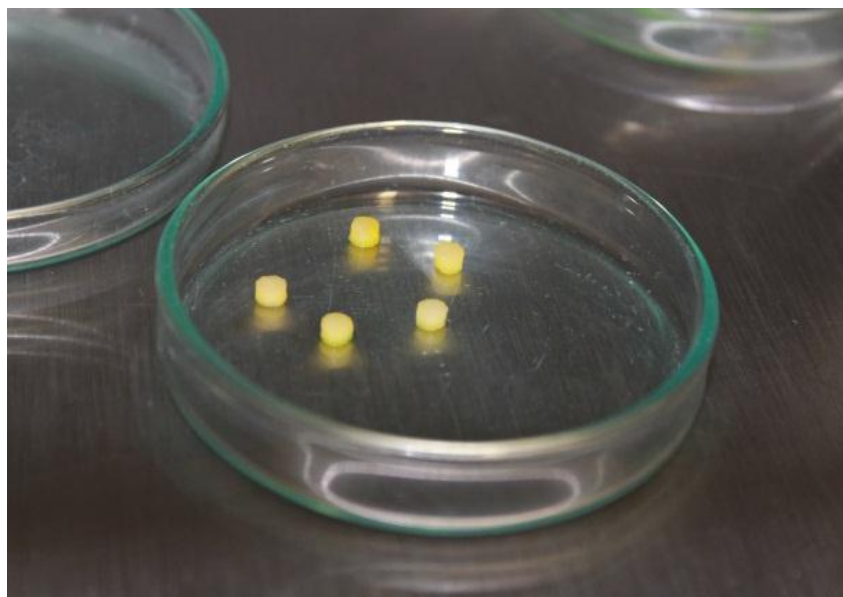


Figura 31. Amostras prontas para serem analisadas no MCVL

Para quantificar o biovolume e espessura média utilizou-se COMSTAT 2, um software acoplado com MCVL empregado com sucesso para quantificar, pelas pilhas de imagens, os parâmetros arquitetonicos de biofilme bacteriano tridimensionalmente (Heydorn et al., 2000a; Heydorn et al., 2000b). Para melhor resultado do programa é necessário discriminar o que é pixel do primeiro plano com a do fundo para identificar a presença ou ausência de biomassa. Desta forma, utilizou-se a ferramenta automática “Limiar usando o método de Otsu”. Além disto, também selecionou o “Volume Ligado Filtragem”, que tem a função de eliminar elementos que não fazem parte do biofilme da pilha de imagens, ou seja, pedaço de detritos flutuantes (Heydorn et al., 2000a; Heydorn et al., 2000b).

O biovolume foi caracterizado em função do número de pixels de biomassa em todas as imagens de uma pilha, multiplicada pelo tamanho do voxel {(tamanho do pixel)x x (tamanho do pixel)y x (tamanho do pixel)z} e dividido pela área do substrato da pilha de imagem. O valor resultante foi volume de biomassa dividida pela área de substrato ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). A espessura média do biofilme fornecia uma medida do tamanho do espaço do biofilme sendo a variável mais comum na leitura de biofilme (Heydorn et al., 2000a; Heydorn et al., 2000b).

5. RESULTADOS

5.1 PERFILOMETRIA A LASER

A partir de uma análise estatística (One-way ANOVA) foi observado que o tipo de material restaurador influenciou significativamente nos parâmetros de amplitude (Sa e Sq), parâmetro espacial (Sds) e o parâmetro híbrido (Ssc) da topografia da superfície ($p < 0,001$). O teste de Tukey (Quadro 1) mostrou que KN e FZ foram semelhantes entre si e apresentaram valores significativamente mais baixos do que VT, que apresentou valores mais baixos do que KF para parâmetros de amplitude (Sa e Sq). KN e FZ foram semelhantes entre si e apresentaram valores significativamente mais baixos do que KF e VT para os parâmetros espaciais e híbridos.

Quadro 1: Média \pm desvio padrão (DP) e para o parâmetro rugosidade da superfície (mm) s, os parâmetros de amplitude (Sa e Sq), parâmetro espacial (Sds) e parâmetro híbrido (Sds).

| Grupos | Sa | Sq | Sds | Ssc |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Filtek Z350 XT | 0.16 ± 0.05^A | 0.34 ± 0.11^a | 1228 ± 650^E | 0.14 ± 0.02^e |
| Ketac Fil Plus | 0.73 ± 0.39^C | 1.68 ± 1.25^c | 3555 ± 1019^F | 0.17 ± 0.01^f |
| Ketac Nano | 0.18 ± 0.06^A | 0.39 ± 0.21^a | 1322 ± 586^E | 0.14 ± 0.02^e |
| Vitremer | 0.29 ± 0.12^B | 0.57 ± 0.44^b | 3640 ± 847^F | 0.17 ± 0.01^f |

*Representação dos grupos heterogêneos observadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Letras diferentes significam diferenças estatísticas para cada parâmetro isolado (colunas)

A leitura das amostras no perfilômetro gerou imagens 3D removendo-se os defeitos de forma (forma removida) para posterior extração do perfil topográfico das amostras, conforme ilustrado pelas Figuras 32 a 43 que seguem:

Filtek Z350 XT

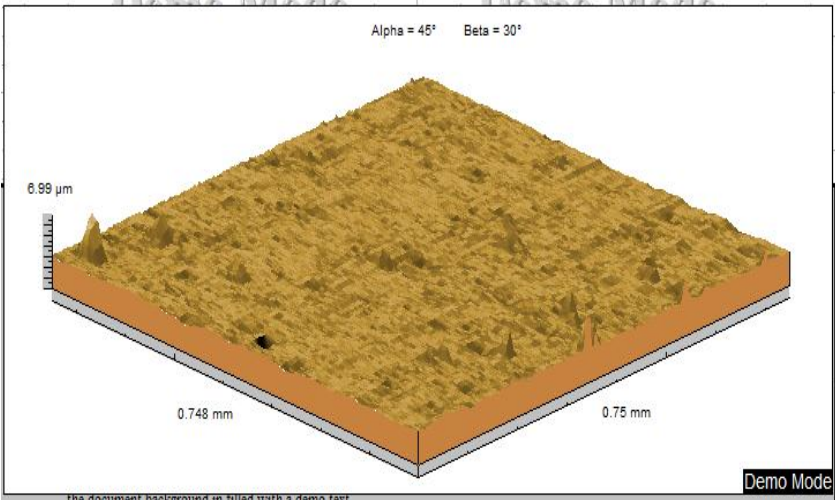


Figura 32. Imagem 3D com forma removida

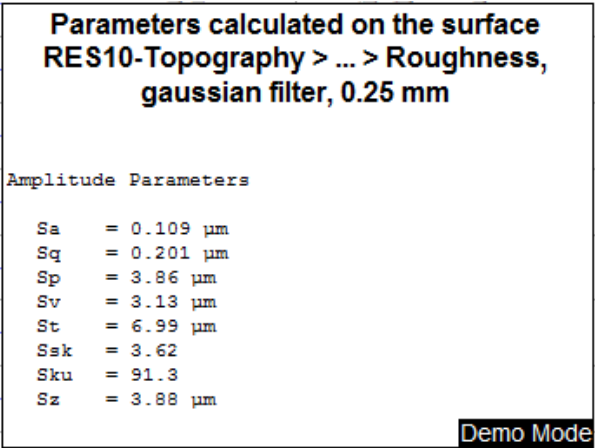


Figura 33. Valores de cada parâmetro de amplitude

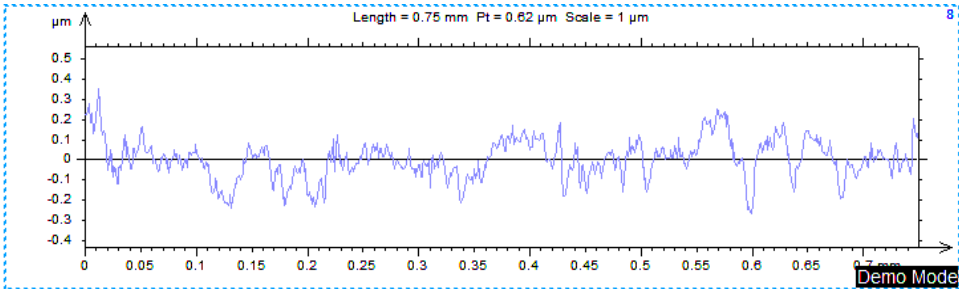


Figura 34. Perfil topográfico com forma removida

Ketac Fil Plus

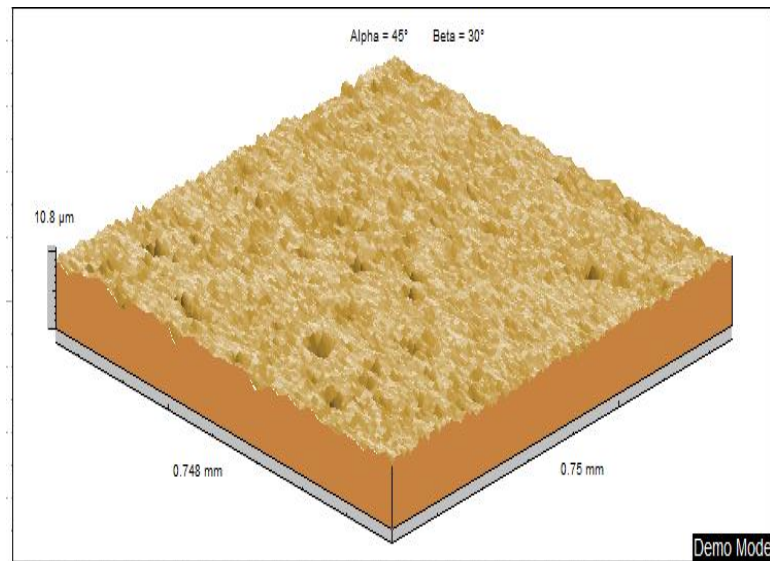


Figura 35. Imagem 3D com forma removida

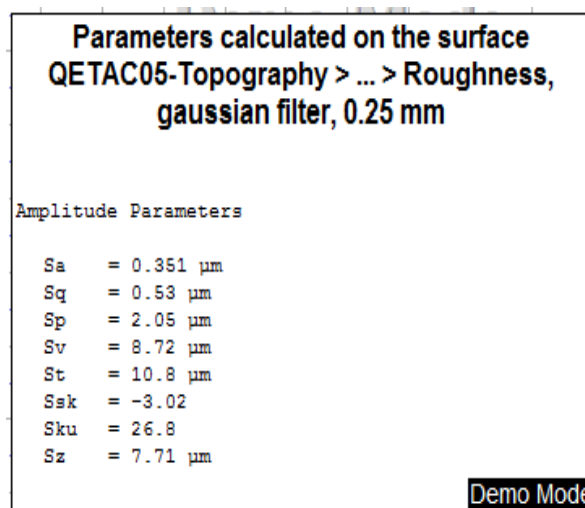


Figura 36. Valores de cada parâmetro de amplitude

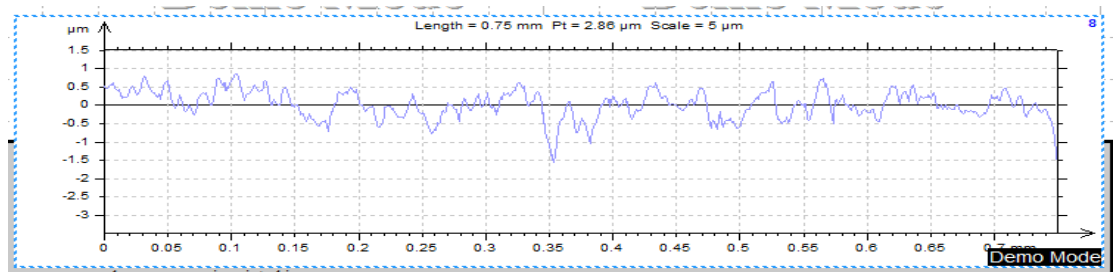


Figura 37. Perfil topográfico com forma removida

Ketac Nano

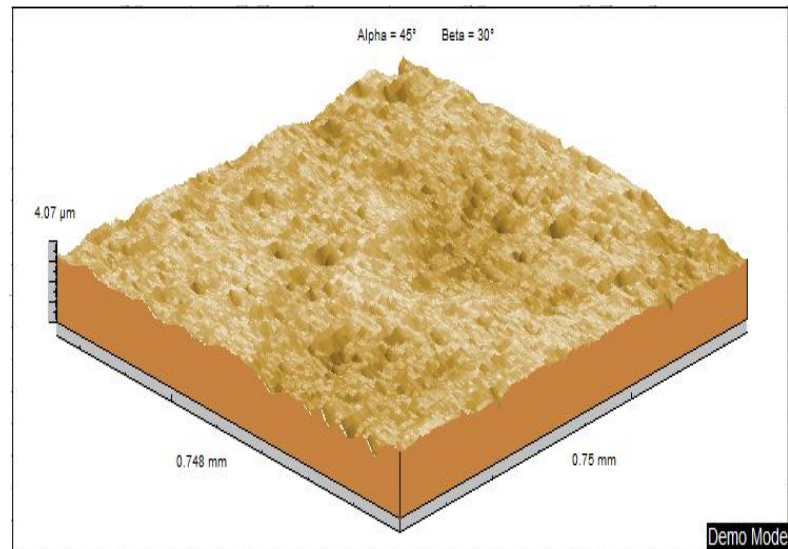


Figura 38. Imagem 3D com forma removida

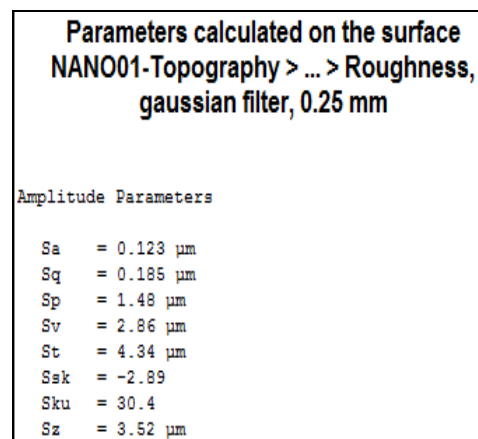


Figura 39. Valores de cada parâmetro de amplitude

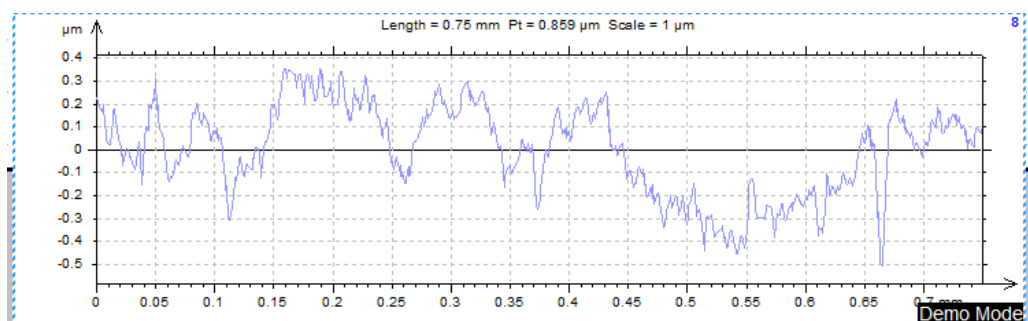


Figura 40. Perfil topográfico com forma removida

Vitremer

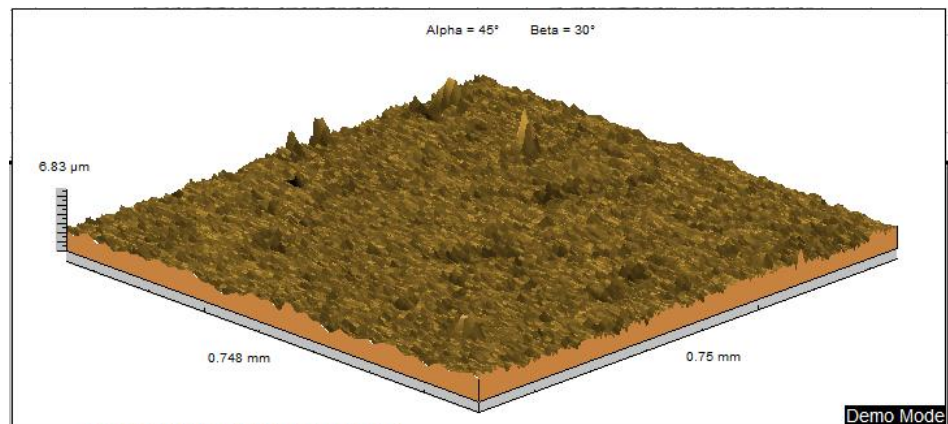


Figura 41. Imagem 3D com forma removida

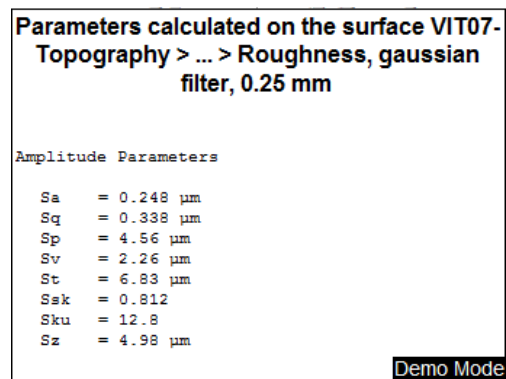


Figura 42. Valores de cada parâmetro de amplitude

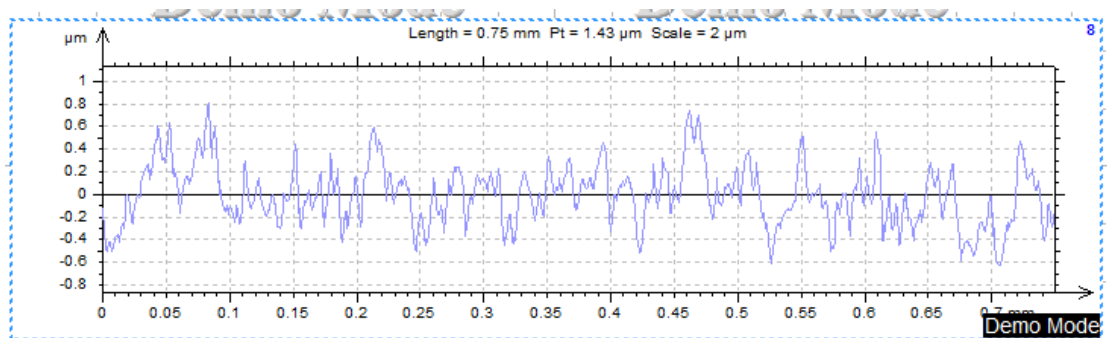


Figura 43. Perfil topográfico com forma removida

5.2 ÂNGULO DE CONTATO

A partir de uma análise estatística (One-way ANOVA) pode-se observar que o ângulo de contato foi influenciado pelo tipo de material ($p = 0,026$). O teste de Tukey (Quadro 2) mostrou que, KN apresentou ângulo de contato significativamente mais elevado do que KF. Além disso, todos os outros materiais apresentam ângulo de contato semelhante.

Quadro 2: Média \pm desvio padrão (DP) para ângulo de contato (graus)

| Grupos | Ângulo de contato | |
|-----------------|-------------------------------|--------|
| | Média \pm DP | CV (%) |
| Filtek Z350 XT | 51.0 \pm 10.9 ^{AB} | 21.4 |
| Ketac Fill Plus | 43.2 \pm 10.3 ^B | 23.8 |
| Ketac Nano | 63.3 \pm 9.4 ^A | 14.9 |
| Vitremer | 45.3 \pm 13.5 ^{AB} | 29.7 |

* Representação dos grupos heterogêneos observadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Letras diferentes significam diferenças estatísticas.

Imagens do ângulo de contato obtidas a partir da técnica da gota, para cada tipo de material restaurador.

Filtek Z350 XT

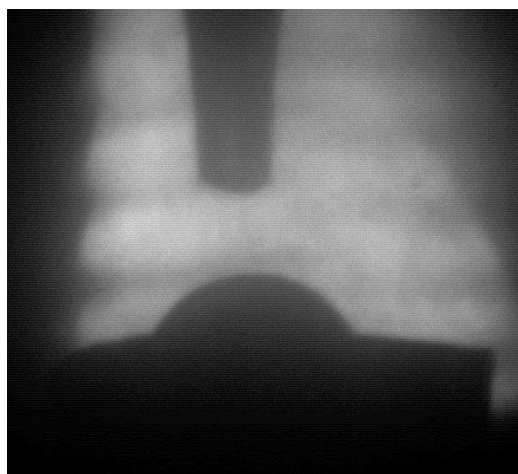


Figura 44. 0 segundos

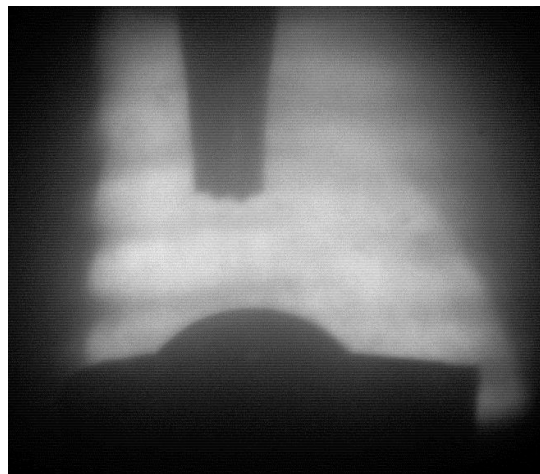


Figura 45. 20 segundos

Ketac Fill Plus

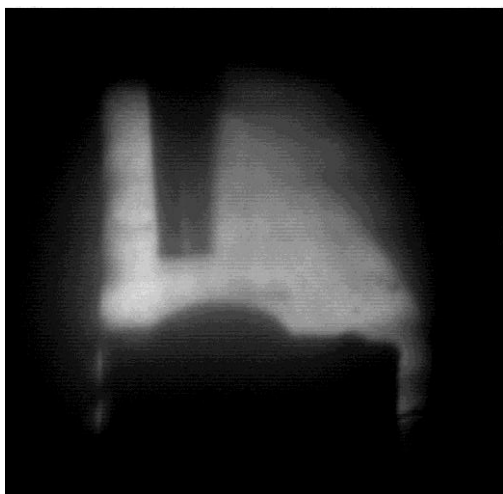


Figura 46. 0 segundos



Figura 47. 20 segundos

Ketac Nano

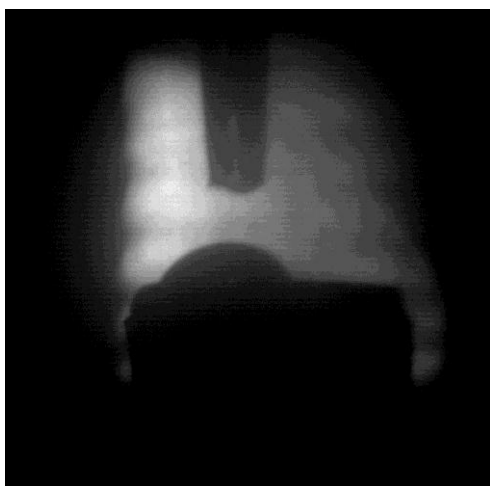


Figura 48. 0 segundos

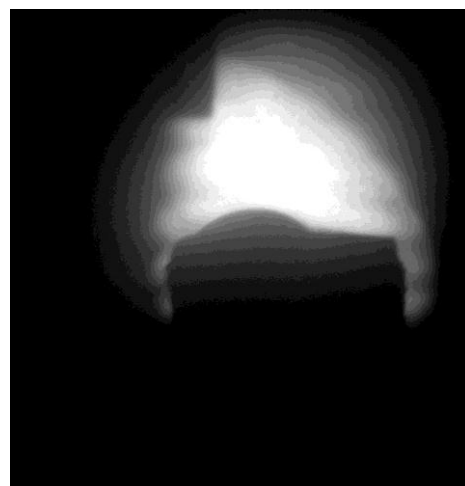


Figura 49. 20 segundos

Vitremer



Figura 50. 0 segundos



Figura 51. 20 segundos

5.3 BIOFILME

Em uma análise descritiva, o biofilme em KN e FZ pareceu apresentar uma menor quantidade de células bacterianas, uma vez que foi possível observar na superfície do material. No VT e KF, o biofilme parecia cobrir a maior parte da superfície do material. Pela análise usando ANOVA verificou-se que o tipo de material influenciou significativamente a espessura média ($p < 0,001$) e biovolume ($p < 0,001$). O teste de Tukey (Quadro 3) demonstrou que a KN e FZ eram semelhantes uns aos outros e apresentou valores significativamente mais baixos do que KF e VT para a espessura média e biovolume, que eram semelhantes uns aos outros.

Quadro 3: Média \pm desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para a espessura média (μm) e biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)

| Grupos | Espessura (μm) | | Biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) | |
|----------------|-----------------------------|--------|---|--------|
| | Média \pm DP | CV (%) | Média \pm DP | CV (%) |
| Filtek Z350 XT | 1.1 ± 0.8^A | 72.7 | 1.5 ± 0.4^a | 26.7 |
| Ketac Fil Plus | 7.4 ± 4.8^B | 64.9 | 10.2 ± 7.5^b | 73.5 |
| Ketac Nano | 0.6 ± 0.2^A | 33.3 | 0.6 ± 0.2^a | 33.3 |
| Vitremer | 10.3 ± 4.7^B | 45.6 | 18.5 ± 7.4^b | 40.0 |

* Representação dos grupos heterogêneos observadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Letras diferentes significam diferenças estatísticas. (Letras maiúsculas para espessura média; letras minúsculas representam biovolume).

Imagens representativas da formação do biofilme sobre as amostras são apresentados nas figuras que seguem:

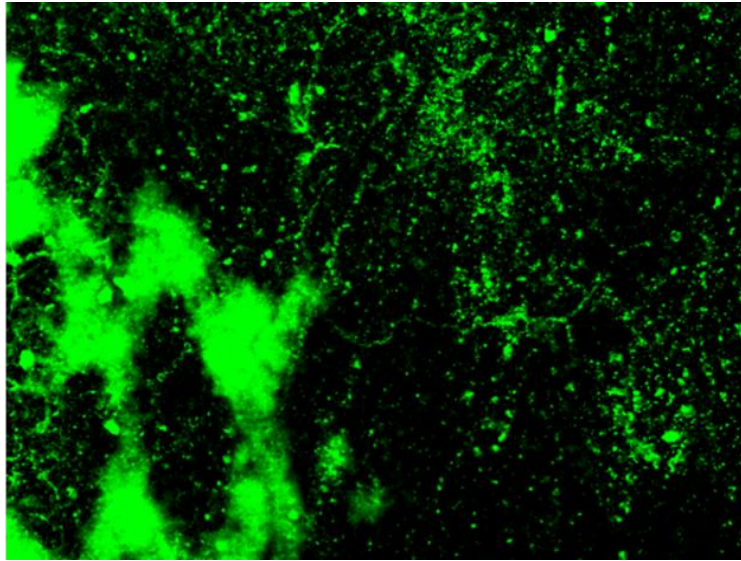


Figura 52. Biofilme formado sobre Ketac Fil Plus

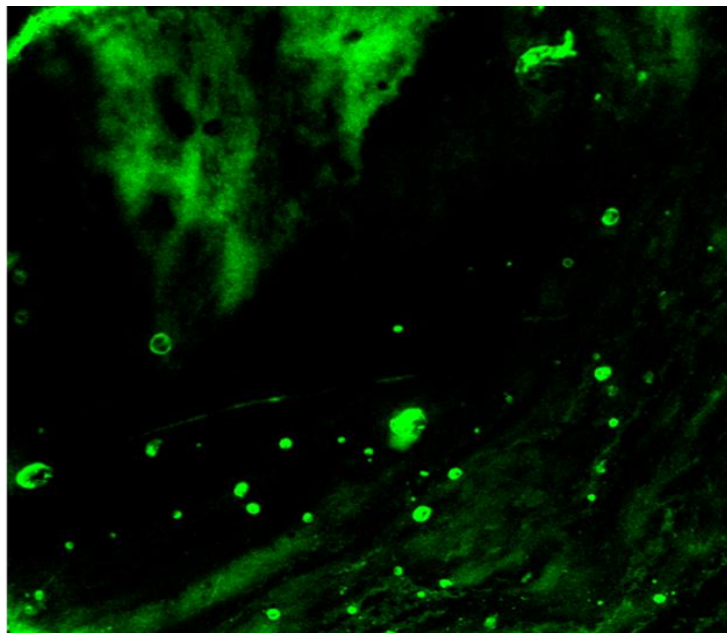


Figura 53. Biofilme formado sobre Vitremer

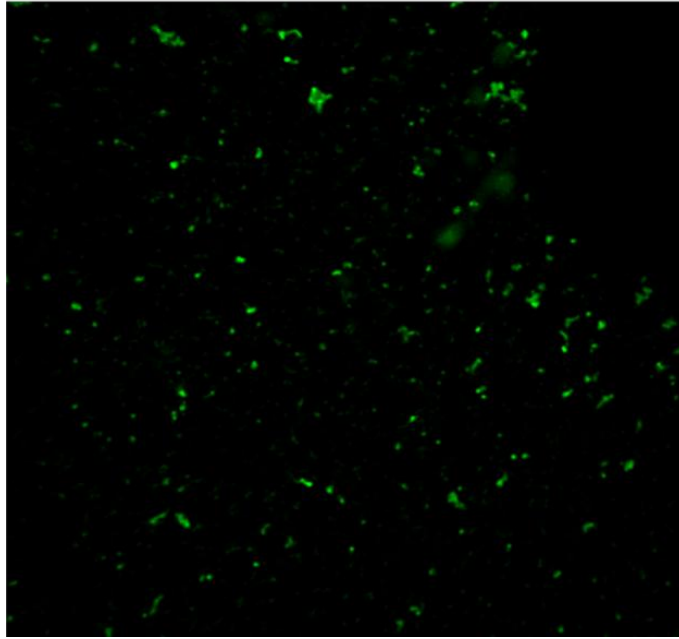


Figura 54. Biofilme formado sobre Ketac Nano

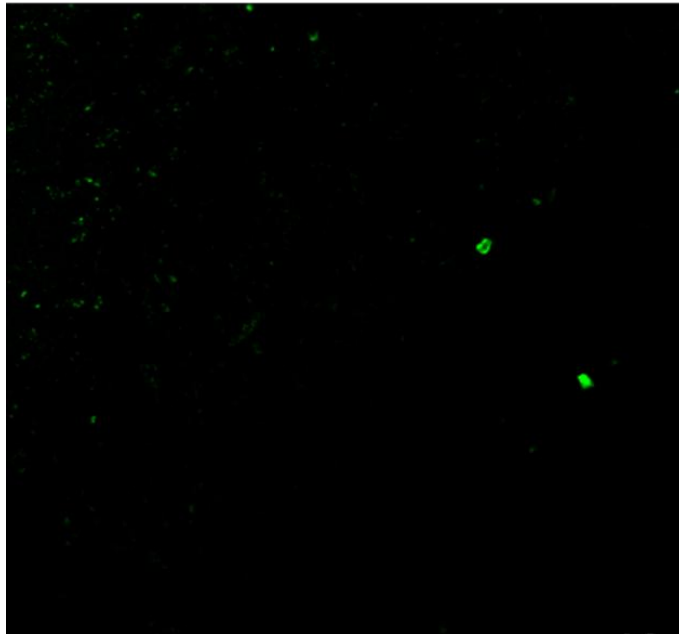
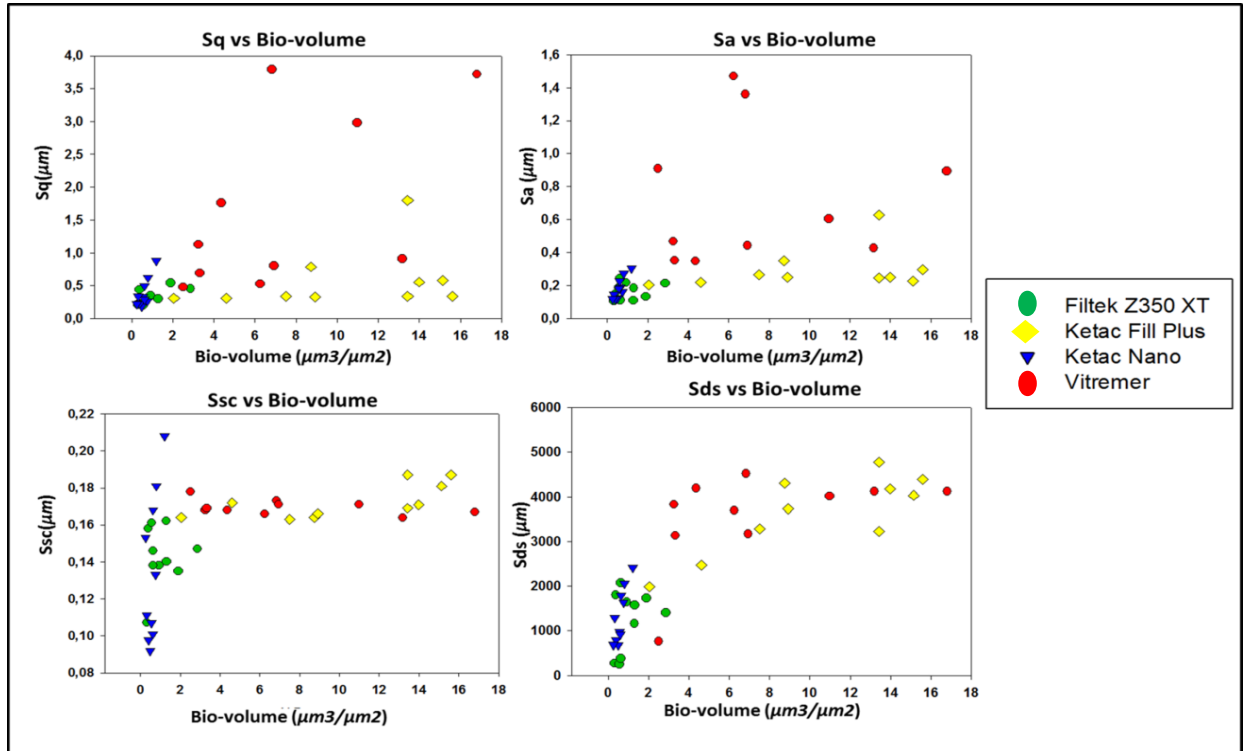


Figura 55. Biofilme formado sobre Filtek Z350 XT

A correlação linear de Pearson mostrou uma relação estatisticamente significativa entre os parâmetros de amplitude (Sa, $p = 0,02$; Sq, $p = 0,002$), parâmetro espacial (Sds, $p < 0,0001$), parâmetro híbrido (Sds, $p < 0,001$) e biovolume (Figura 56).



A correlação linear de Pearson mostrou uma relação estatisticamente significativa entre os parâmetros de amplitude (Sa, $p = 0,02$; Sq, $p < 0,001$), o parâmetro espacial (Sds, $p < 0,0001$), parâmetro híbrido (Sds, $p < 0,001$) e a espessura do biofilme (Figura 57).

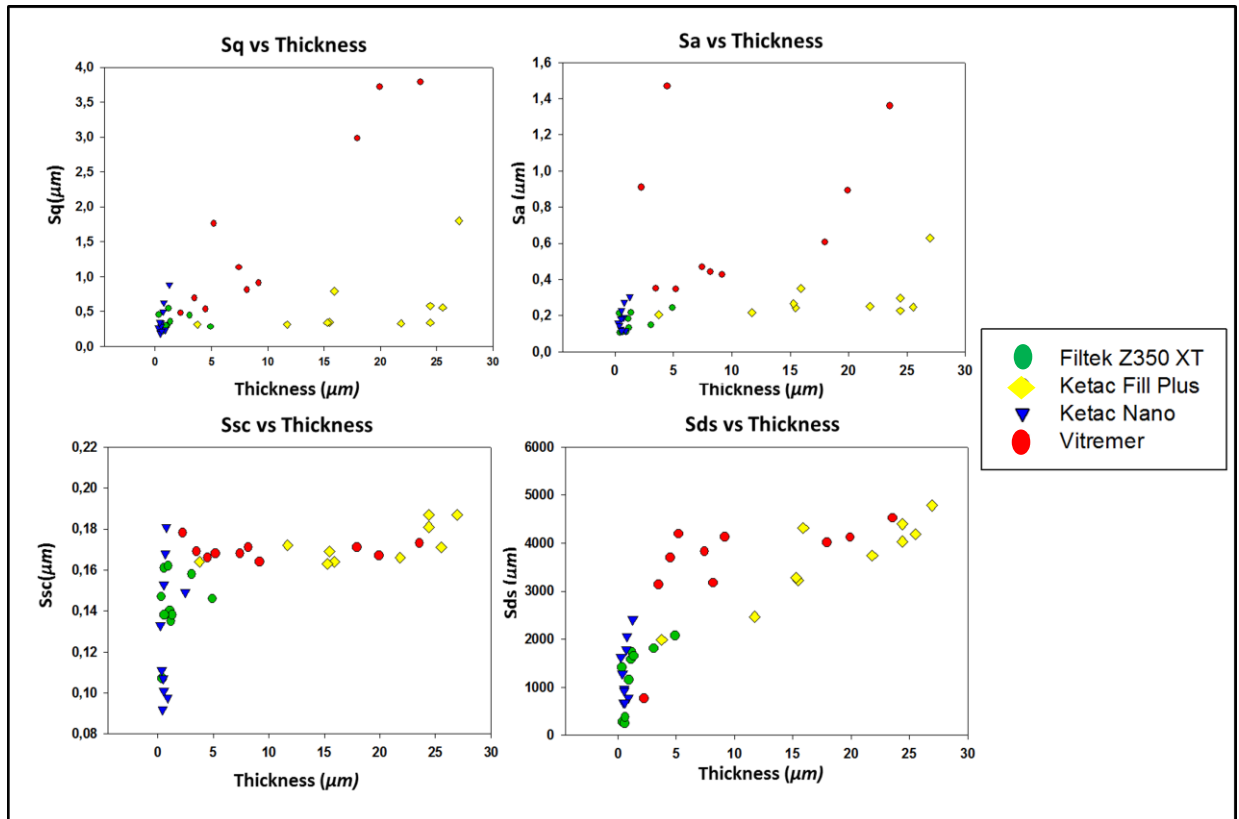


Figura 57. Gráfico da correlação entre os parâmetros da rugosidade de superfície (μm) e espessura do biofilme ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) entre os diferentes grupos

Vários estudos sobre rugosidade da superfície, hidrofobicidade e biofilme em diferentes materiais restauradores tem estabelecido correlação entre suas propriedades. Em relação à análise topográfica, os parâmetros de rugosidade podem ser calculados de forma 2D ou 3D (Gadelmawla et al. 2002). A topografia da superfície de natureza 3D representa características mais naturais de uma superfície, quando comparada à 2D (Kakaboura et al., 2007, Ereifej et al., 2012). A perfilometria de contato 2D é o método de medição mais comum, sendo amplamente disponível e relativamente barato, porém, limitada pela dimensão espacial, e os resultados da superfície rugosa, geralmente, são subestimados. (Kakaboura et al., 2007, Ereifej et al., 2012, Al-Shammery et al. 2007). Entretanto, a perfilometria a laser 3D fornece a possibilidade da análise de área tridimensional sem contato na superfície. A realização de análises digitais associadas a uma leitura sem contato, por meio de instrumentos a laser, exclui possíveis danos na superfície causados pelo sensor mecânico, que consequentemente, criaria viés nos resultados (Janus et al., 2010).

A associação de parâmetros de amplitude (S_a e S_q) com caracterização do parâmetro espacial (S_{ds}) e parâmetro híbrido (S_{sc}) usado neste estudo demonstrou ser o mais adequado para correlacionar a formação de biofilme, do que utilizar apenas os parâmetros de amplitude. Estes parâmetros consistem em avaliar a amostra nas formas espaciais, textura e propriedades híbridas que capturam o volume e rolamento / propriedades de retenção de líquidos de uma superfície. Todos os parâmetros são designados com um símbolo S, para diferenciar com os parâmetros do perfil 2D.

Os parâmetros de rugosidade são dependentes de vários fatores, tais como, o tamanho das partículas de enchimento, a porcentagem de área da superfície ocupada pelas partículas de carga, a dureza, o grau de conversão para o polímero da resina e a interação da matriz de enchimento (Marghalani, 2010; Kooi et al., 2012), Alguns estudos registraram os maiores valores de rugosidade superficial para os materiais com tamanhos maiores de partículas (Kooi et al., 2012, Bala et al., 2012),

No presente estudo, este achado foi confirmado. Os materiais com tamanhos de partículas maiores (3 μm) de VT e KF demonstraram a rugosidade da superfície significativamente maior em comparação com a média dos tamanhos pequenos de partículas encontradas no FZ (5–20 nm para nanopartículas) e no KN (5-25 nm para nanopartícula, 0.6-

1.4 μm). Um dos desenvolvimentos mais recentes em cimento de ionômero de vidro é a nanopartícula, que na constituição do seu pó contém nanopartículas e fluorapatita. O benefício obtido pelos cimentos de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMRs) e tecnologia ligada a nanopartícula é que eles podem fornecer o ionômero de vidro com propriedade melhor de polimento, (Bala et al., 2012) melhoria que foi confirmado no presente estudo.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma ferramenta utilizada para avaliar a formação de biofilme em diferentes materiais (Ereifej et al., 2012). Usando MEV, a análise do biofilme é representada pela fixação e desidratação, fatores que poderiam alterar suas características (Brentel et al., 2011). No presente estudo utilizou-se microscopia confocal, em que o biofilme pode ser avaliado sem a necessidade de fixação e desidratação, mantendo a sua arquitetura original (Brentel et al., 2011). É um método não invasivo e não destrutivo, na verdade, considerado a ferramenta de escolha para o estudo da formação do biofilme (Palmer & Sternberg, 1999; Brentel et al., 2011). Apesar das muitas tentativas para quantificar o biofilme, a reprodutibilidade dos experimentos é difícil de ser abordada (Heydron et al., 2000a).

Após análise do biofilme, as imagens devem ser trabalhadas no programa chamado COMSTAT. Ele representa um método geral para a comparação quantitativa das estruturas de biofilme e de avaliação da reprodutibilidade experimental entre experimentos independentes. Usando ferramentas comumente utilizadas para avaliar o biofilme, de acordo com a literatura, (Heydron et al., 2000a, Brentel et al., 2011), as estruturas do biofilme pode ser quantificado e posteriormente analisados estatisticamente por uma análise de modelo de variância (Heydron et al. 2000b).

Além da rugosidade, a energia livre de superfície, definida pela hidrofobicidade dos materiais restauradores podem influenciar a formação de biofilme. Energia livre de superfície elevada (hidrofílico) os substratos estão associados com maior formação de biofilme do que substratos de energia livre de superfície baixa (hidrofóbica) (Quirynen et al., 1989, Rimondini et al. 2002,). O presente estudo demonstrou que os materiais com similares hidrofobicidade resultaram em diferentes formações de biofilme.

Quirynen et al. em 1990 verificaram pequena quantidade de biofilme, em materiais de superfície lisa com baixa energia livre de superfície, porém, não encontraram diferenças entre os dois materiais na superfície irregular das amostras, sugerindo que a rugosidade é mais importante do que a energia livre de superfície, no que diz respeito à formação de biofilme.

Entretanto, enquanto in vitro as bactérias aderem virtualmente a qualquer superfície, independentemente das suas propriedades, as superfícies supragengivais hidrofóbicas, na cavidade oral, atraem menos placa do que as hidrófilas (Quirynen et al., 1989). Bactérias orais aderem nas superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, como demonstrado neste estudo pelo KN e FZ.

A formação de biofilme em compósitos de resina e os cimentos ionoméricos leva a um ciclo negativo de eventos. Beyth et al, (2008), em que os organismos colonizadores causam deterioração da superfície que, por sua vez, promove maior formação de biofilme gerando ainda mais deterioração da superfície (Busscher et al., 1984). A manifestação clínica deste ciclo negativo é o desenvolvimento de cárie ao redor ou abaixo de uma restauração (Sousa et al., 2009). Apesar da liberação de flúor pelo cimento de ionômero de vidro, o KF e VT resultou em maior formação de biofilme do que o FZ.

Al-Naimi et al., (2008) mostraram que os cimentos ionoméricos contendo flúor não reduz a quantidade de crescimento de bactérias e formação de biofilme nas superfícies banhadas pela saliva. Busscher et al. (2010) sugerem que o flúor não é um fator dominante no controle da formação de biofilme, ou que a sua concentração é muito baixa para ser eficaz, dependendo da proporção entre a área do cimento e o volume de fluido que os ensaios foram realizados. Assim, os benefícios de libertação de fluoreto podem ser confinados à inibição da desmineralização. Além disso, KN é um ionômero pasta / pasta, enquanto VT e KF exigem a mistura convencional entre pó / líquido promovendo a incorporação de bolhas de ar (de Paula et al., 2011). Este aspecto pode contribuir com a retenção de mais de biofilme.

Seja para prevenir a sensibilidade ou por estética, a restauração em área desgastada em uma lesão não cariosa é viável. Entretanto, de antemão é necessário à identificação de sua causa e o controle dos seus fatores etiológicos. Caso contrário, o tratamento restaurador terá grande chance de fracassar. Além disso, é necessário conhecer as características da superfície de cada material indicado para restaurar tais lesões, o que irá determinar a escolha do processo reabilitador.

Portanto, as diferenças relacionadas ao biovolume e a espessura média do biofilme, formado in vitro, entre os dois grupos no presente estudo pode ser atribuída a diferenças na rugosidade da superfície (Brentel et al., 2011). Para indicar um material restaurador para restaurar LCNC, o clínico deve levar em conta mais do que a estética, a longevidade desta restauração. Como demonstrado no presente estudo, à nanotecnologia incorporada em

materiais restauradores, como em compósitos resinosos (FZ) e ionômero de vidro modificado por resina (KN), promovem melhor superfície topográfica e menor formação de biofilme.

7. CONCLUSÃO

1. O tipo de material restaurador é fator importante que afeta a rugosidade da superfície influenciando diretamente na formação de biofilme
2. A utilização de parâmetros híbrido e espacial da rugosidade da superfície é mais apropriada para correlacionar com a formação de biofilme sobre os materiais restauradores
3. Rugosidade superficial tende a ser o parâmetro mais importante que a hidrofobicidade para correlacionar com a formação de biofilme
4. Materiais restauradores com nano-cargas na composição resultaram em rugosidade significativamente mais baixa e menor formação de biofilme

1. Agra CM, Vieira GF. Quantitative analysis of dental porcelain surfaces following different treatments: correlation between parameters obtained by a surface profiling instrument. **Dent Mater J.** 2002;21:44-52.
2. 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; 53:254-59.
3. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. **J Mater Sci Mater Med.** 2008 Mar;19(3):1243-8. Epub 2007 Aug 15.
4. Al-Shammery HAO, Bubb NL, Youngson CC, Fasbinder DJ, Wood DJ. The use of confocal microscopy to assess surface roughness of two milled CAD–CAM ceramics following two polishing techniques. **Dent Mater.** 2007 Jun;23(6):736-41 Epub 2006 Aug 17.
5. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effects of dental restorative materials on dental biofilm. **Eur J Oral Sci.** 2002 Feb;110(1):48-53.
6. Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. **Arch Oral Biol.** 2001 May;46(5):471-76.
7. Bader JD, McClure F, Scurria MS, Shugars DA, Heymann HO. Case-control study of non-carious cervical lesions. **Community Dent Oral Epidemiol** 1996 Aug;24(4):286-91.
8. Baier RE, Glantz POJ. Characterization of oral in vivo films for on different types of solid surfaces . **Acta Odontol Scand.** 1978; 36(5):289-301.
9. Bala O, Arisu HD, Yikilgan I, Arslan S, Gullu A. Evaluation of surface roughness and hardness of different glass ionomer cements. **Eur J Dent.** 2012 Jan;6(1):79-86.
10. Barbosa LPB, Prado Junior RR, Mendes RF. Lesões cervicais não-cariosas: etiologia e opções de tratamento restaurador. **Revista Dentística on line.** 2009 Jan-Mar;8(18).
11. Bartlett DW, Shah P. A Critical Review of Non-carious Cervical (Wear) Lesions and the Role of Abfraction, Erosion, and Abrasion. **Journal of Dental Research.** 2006 Abr;85(4):306-312.
12. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. Streptococcus mutans biofilm changes surface topography of resin composites. **Dent Mater.** 2008 Jun;24(6):732-6. Epub 2007 Sep 25.

13. Bollen C M, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. **Dent Mater**. 1997;13(4):258-69.
14. Brex M, Theilade J, Attström R. An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. **J Periodontol Res**. 1983 Mar;18(2):177-86.
15. Brentel A S, Kantorski K Z, Valandro L F, Fúcio S B, Puppini-Rontani R M, Bottino M A. Confocal Laser Microscopic Analysis of Biofilm on Newer Feldspar Ceramic. **Operative Dentistry**. 2011 Jan-Feb;36(1):43-51.
16. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Appl Environ Microbiol**. 1984 Nov;48(5):980-3.
17. Busscher HJ, Jager D, Finger G, Schaefer N, Van der Mei HC. Energy transfer, volumetric expansion, and removal of oral biofilms by non-contact brushing. **Eur J Oral Sci**. 2010 Apr;118(2):177-82.
18. Carlsson K, Liljeborg A. A confocal laser microscope scanner for digital recording of optical serial sections. **J. Microsc**. 1989 Feb;111(153):171-80.
19. Chan C, Weber H. Plaque retention on teeth restored with fullceramic crowns: a comparative study. **J Prosthet Dent**. 1986 Dec;56(6): 666-71.
20. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999 May;284(5418):1318-22.
21. Costerton J.W, Lewandowski Z, de Beer D, Caldwell DE, Korber DR, Jørgensen KA. Biofilms, the customized microniche **J. Bacteriol**. 1994 Apr;176(8):2137-42.
22. de Paula AB, Fúcio SB, Ambrosano GM, Alonso RC, Sardi JC, Puppini-Rontani RM. Biodegradation and abrasive wear of nano restorative materials. **Oper Dent**. 2011 Nov-Dec;36(6):670-7.
23. Dong SP, Mainsah E, Sullivan PJ, Stout KJ. Instruments and measurement techniques of 3-dimensional surface topography. In: Three Dimensional Surface Topography: Measurement, Interpretation and Applications, por Stout KJ, 3-63. London: **Penton Press**, 1994.
24. Ereifej N, Oweis Y, Eliades G. The Effect of Polishing Technique on 3-D Surface Roughness and Gloss of Dental Restorative Resin Composites. **Oper Dent**. 2012 Aug 23 [Epub ahead of print].
25. Francisconi LF, Scaffa PMC, Barros VRSP, Coutinho M, Francisconi PAS. Glass ionomer cements and their role in the restoration of non-carious cervical lesions. **J Appl Oral Sci**. 2009;17(5):364-69.
26. Fúcio SB, Carvalho FG, Sobrinho LC, Sinhoreti MA, Puppini-Rontani RM. The influence of 30-day-old *Streptococcus mutans* biofilm on the surface of esthetic

- restorative materials--an in vitro study. **J Dent**. 2008 Oct;36(10):833-9. Epub 2008 Jul 14.
27. Gadelmawla E S, Koura M M, Makoud TMA, Elewa IM, Soliman HH. Roughness parameters. **J Materials Processing Technology**. 2002;1:133-45.
 28. 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.
 29. Hanning M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. **Eur J Oral Sci**. 1997 Oct;105(5): 422-33.
 30. Hanning M. Transmission electron microscopic of early plaque formation on dental materials in vivo. **Eur J Oral Sci**. 1999 Feb;107(1):55-64.
 31. Hengtrakool C, Pearson GJ, Wilson M. Interaction between GIC and *S. sanguis* biofilms: antibacterial properties and changes of surface hardness. **J Dent**. 2006 Sep;34(8):588-97. Epub 2006 Mar 15.
 32. Heydorn A, Nielsen AT, Hetzer M, Sternberg C, Kjaer B, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiol**. 2000;146:2395-407.
 33. Heydorn A, Ersboll B K, Hentzer M, Parsek M R, Givskov M, Molin S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**. 2000a. 146:2409–15.
 34. Heydorn A, Nielsen A T, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M; Ersboll B K, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**. Jul. 2000b;146:2409–15.
 35. Janus J, Fauxpointa G, Arntzc Y, Pelletier H, Etienne O. Surface roughness and morphology of three nanocomposites after two different polishing treatments by a multitechnique approach. **Dent Mater**. 2010 May;26(5):416-25.
 36. Jendresen M D, Glantz PO. Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in vivo study. **Acta Odontol Scand**. 1981;39(1):39-45.
 37. Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. **Trends Microbiol**. 2001 Jan;9(1):9-10.
 38. Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N. Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. **J Mater Sci Mater Med**. 2007 Jan; 18(1):155-163.
 39. Konishi. N, Toril Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiama. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. **J Oral Rehabil**. 2003 Aug;30(8):790-95.
 40. Kooi T, Tan Q, Yap A, Guo W, Tay K, Soh M. Effects of Food-simulating Liquids on Surface Properties of Giomer Restoratives. **Oper Dent**. 2012 Nov-Dec;37(6):665-71.

41. Kuhar M, Nenad F. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. **J Prosthet Dent.** 2005; 93(1):76-8
42. Levitch LC, Bader JD, Shugars DA, Heymann HO. Non-carious cervical lesions. **J Dent** 1994 Aug;22(4):195-207.
43. Listgarten MA. The structure of dental plaque. **Periodontol** 2000. 1994 Jun;5:52-65.
44. Löe, H. Theilade E, Jensen, S B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol.** 1965 May-Jun;36:177-87.
45. Lucchesi JA, Santos VR, Amaral CM, Peruzzo DC, Duarte PM. Coronally positioned flap for restored root surfaces: a 6-month clinical evaluation. **J Periodontol.** 2007 Apr;78(4):615-23.
46. Maneenut C, Tyas MJ. Clinical evaluation of resin-modified glass-ionomer restorative cements in cervical 'abrasion' lesions: one-year results. **Quintessence Int.** 1995 Oct;26(10):739-43.
47. Marghalani HY. Effect of filler particles on surface roughness of experimental composite series. **J Appl Oral Sci.** 2010 Jan-Feb;18(1):59-67.
48. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv Dent Res.** 1994 Jul;8(2):263-271.
49. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol** 2000. 1994 Jun;(5):66-77.
50. Mummery L. **Surface texture analysis the handbook.** Hommelwerke GmbH: Alte Tuttinger; 1990.
51. Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. **Dent Mater.** 2009 Jun; 25(6):703-8. Epub 2009 Jan 15.
52. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. **Arch Oral Biol.** 1998 Apr;43(4):277-85.
53. Neu TR, Lawrence JR. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. **FEMS Microbiol Ecol.** 1997;24:11-25.
54. Nicholson JW, Aggarwal A, Czarnecka B, Limanowska-Shaw H. The rate of change of pH of lactic acid exposed to glass-ionomer dental cements. **Biomaterials.** 2000 Oct;21(19):1989-93.
55. Palmer RJ; Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. **Environmental biotechnol.** 1999;10:263-6.

56. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol.** 2001 Jun;183(12):3770-83.
57. Peumans M, Munck J, Van Landutk K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Three-year clinical effectiveness of a two-step self-etch adhesive in cervical lesions. **Eur J Oral Sci.** 2005 Dec;113(6):512-8.
58. Pikdoken L, Akca E, Gurbuzer B, Aydil B, Tasdelen B. Cervical wear and occlusal wear from a periodontal perspective. **Journal of Oral Rehabilitation.** 2011 Feb;38(2):95-100.
59. Pratt-Terpstra H, Weerkamp AH, Busscher HJ. The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. **J Dent Res.** 1989 Mar;68(3):463-67.
60. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, et al. The influence of surface free on planimetric plaque growth in man. **J Dent Res.** 1989 May;68(5):796-99.
61. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface- free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of literature. **J Clin Periodontol.** 1995 Jan;22(1):1-14.
62. Quirynen M, Marechal M., Busscher H J, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early formation . **J Clin Periodontol** 1990 Mar;17(3):138-44.
63. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbronder PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trend Microbiol.** 2003 Feb;11(2):94-100.
64. Rimondini L, Fare S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. **J Periodontol.** 1997 Jun;68(6):556-62.
65. Rimondini L, Fare S, Branbilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002 Nov-Dec;17(6):793-98.
66. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. **Microbes Infect.** 2000 Nov;2(13):1599-607.
67. Sbordone L, Boryolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin Oral Investig.** 2003 Dec;7(4):181-188. Epub 2003 Nov 4.
68. Seppä L, Korhonen A, Nuutinen A. Inhibitory effect on *S. mutans* by fluoride-treated conventional and resin-reinforced glass ionomer cements. **Eur J Oral Sci.** 1995 Jun;103(3):182-5.

69. Soares CJ, Soares PBF, Santos Filho PCF, Soares PV, Menezes MS. Lesões de Abfração: Análise dos fatores etiológicos. **International Journal of Brazilian Dentistry**. 2006 Jul-Set;2(3):280-286.
70. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontol** 2000. 1994 Jun;(5):7-25.
71. Souza RP, Zani IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralization. **J Dent**. 2009 Jan;37(1):44-51. Epub 2008 Nov 20.
72. Stenberg R, Matsson L. Clinical evaluation of glass ceramic inlays (DICOR). **Acta Odontol Scand**. 1993;51(2):91-7.
73. Stout KJ, Sullivan PJ, Dong WP, Mainsah E, Luo N, Mathia T, Zahouani H. The Development of methods for the characterization of roughness in three dimensions. Birmingham: University of Birminhan: **European Community Contract No 3374/0/170/90/2**, 1993.
74. Tanner J, Robinson C, Söderling E, Vallitu P. Early plaque formation on fibre-reinforced composites in vivo. **Clin Oral Invest**.2005; 9:154- 60.
75. Terry DA, Mcguire MK, McLaren CE, Fulton UR, Swift EJ JR. Perioesthetic approach to the diagnosis and treatment of carious and noncarious cervical lesions: Part I. **J Esthet Restor Dent**. 2003;15(4):217-32.
76. Van Pelt AWJ, Mei HC, Bussher HJ, Arends J, Weerkamp AH. Surface free energies of oral streptococcus sanguis. **FEM microbiol**. 1984;25:279-82.
77. Weerkamp AH, Van der Mei HC, Bussher HJ. The surface free energy of oral Streptococci after being coated with salia and its relation to adhesion in the mouth **J Dental Res**. 1985 Oct; 64(10):164-72.
78. 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.
79. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dent Mater**. 2007 Mar;23(3):343-62. Epub 2006 Apr 17.
80. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. **Sci Prog**. 2001;84,(Pt 3):235-54.
81. Wilson MJ, Weightmen AJ, Wade WG. Applications of molecular ecology in the characterisation of uncultured microorganisms associated with human disease. **Rev Med Microbiol**. 1997;(8):91-101.
82. Woldringh, CL, de Jong MA, van den Berg W, Koppes L. Morphological analysis of the division cycle of two Escherichia coli substrains during slow growth. **J Bacteriol**. 1977;131:270-9.

83. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. **J Dent Res.** 2000 Jan;79(1):21-7.
84. Yerly J, Hu Y, Jones SM, Martinuzzi RJ. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm image. **J. Microbiol Methods.** 2007. in press.

APÊNDICE A –

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **“Efeitos de diferentes materiais restauradores na formação de biofilme e adesão de fibroblastos”**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Ms. Priscilla Barbosa Ferreira Soares e Dr. Carlos José Soares.

Nesta pesquisa nós estamos buscando avaliar a efetividade de diferentes tipos de materiais restauradores para a reabilitação de dentes com lesões cervicais não cariosas. Juntamente a isso serão avaliados a formação de biofilme e adesão de fibroblastos para a manutenção de tecido gengival saudável sobre esses dentes. Na sua participação você doará placa bacteriana. Este material será analisado em testes de laboratórios, para avaliar o crescimento e viabilidade celular sobre os diferentes tipos de materiais restauradores.

Durante a coleta do material, o participante não poderá realizar medidas de higiene oral por um período de oito (8) horas. Posteriormente a doação do resíduo bucal, este será analisado em testes de laboratórios, para avaliar o crescimento e viabilidade celular.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Você não terá riscos adicionais por participar da pesquisa doando resíduo bucal (placa bacteriana), e o projeto não trará riscos para comunidade. Os benefícios serão que poderemos definir qual o melhor material restaurador que permitirá a reabilitação de dentes com lesões cervicais não cariosas e a manutenção do tecido gengival saudável sobre essas lesões, beneficiando assim os pacientes com indicação de realização desta terapia.

Você é livre para deixar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para o senhor (a).

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa você poderá entrar em contato com: Prof. Ms Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Av. Pará, 1720 - Bloco 2G - Campus Umuarama - 38.400-902 Uberlândia-MG – Fone/Fax: 3218.2431

Pelo presente documento eu, _____, faço a doação do fluido e resíduo bucal (placa bacteriana) colhido por meio do swab, para ser usado exclusivamente no protocolo de pesquisa acima referido. Certifico ter lido as informações acima

citadas e ter sido suficientemente esclarecido pelos pesquisadores responsáveis. Declaro-me consciente do meu envolvimento no projeto e ciente de que nenhum auxílio financeiro será feito.

Uberlândia, ____ de _____ de 20__

Participante da pesquisa

CPF: _____

RG: _____

ATENÇÃO: Sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva ou telefone para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFU. Endereço: CEP/UFU- Comitê de Ética em Pesquisa, Campus Santa Mônica, - Bloco J. Fone: 3239-4531. Uberlândia – MG

1a. via – instituição

2a. via - doador



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Neves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 841/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
287/11

Projeto Pesquisa: "Efeito de diferentes materiais restauradores na formação de biofilme adesão de fibroblastos".

Pesquisador Responsável: Priscilla Barbosa Ferreira Soares

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.
O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data de entrega do Relatório Parcial: **dezembro de 2012.**

Data de entrega do Relatório Final: **dezembro de 2013.**

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 09 de dezembro de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU