

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

EVELYN LOPEZ LEITE

**ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DIFERENTES TEMPOS DE
ARMAZENAGEM E ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS EM MATERIAIS
RESTAURADORES ODONTOLÓGICOS**

**PONTA GROSSA
2016**

EVELYN LOPEZ LEITE

**ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DIFERENTES TEMPOS DE
ARMAZENAGEM E ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS EM MATERIAIS
RESTAURADORES ODONTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa no curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada – Etiologia, Diagnóstico e Tratamento das Doenças Bucais.

Orientador: Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti

Co-orientadora: Profa. Dra. Shelon Cristina Souza Bandeca

**PONTA GROSSA
2016**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Leite, Evelyn Lopez
L533 Aderência de Escherichia coli em
diferentes tempos de armazenagem e adesão
de elementos sanguíneos em materiais
restauradores odontológicos/ Evelyn Lopez
Leite. Ponta Grossa, 2016.
100f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -
Área de Concentração: Clínica Integrada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gibson Luiz
Pilatti.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Shelon
Cristina Souza Bandeca.

1.Doença periodontal. 2.Materiais
dentários. 3.Biofilmes. I.Pilatti, Gibson
Luiz. II. Bandeca, Shelon Cristina Souza.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.632

TERMO DE APROVAÇÃO

EVELYN LOPEZ LEITE

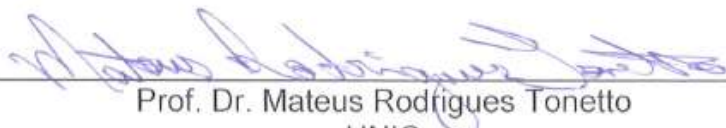
ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAGEM E ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS EM MATERIAIS RESTAURADORES ODONTOLÓGICOS

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia –
Área de Concentração em Clínica Integrada

Ponta Grossa, 15 de fevereiro de 2016



Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Mateus Rodrigues Tonetto
UNIC



Profª. Drª. Elizabete Brasil dos Santos
UEPG

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por guiar os meus passos em todo momento, estar sempre presente, por me fazer forte nos momentos difíceis e me proporcionar tantas vitórias. Por ter colocado em minha vida todas as pessoas que fazem parte dela.

Aos meus pais **Marilda e Elias**

Por serem o meu porto seguro e a minha inspiração, por sofrerem e se alegrarem comigo em todos os obstáculos e conquistas. Por serem a minha base e meus heróis. Sem vocês comigo nada disso seria possível. Obrigada por tudo, amo vocês!

Ao meu noivo **Eduardo**

Por cuidar tanto de mim, me entender e compreender nessa etapa decisiva. Por sonharmos e construirmos juntos nossas vidas. Por nunca medir esforços para realizar nossos sonhos. Obrigada meu amor, por tudo. Amo você!

Aos professores Doutores Elizabete Brasil, Gilson Franco e Mateus Rodrigues Tonetto pelas contribuições importantes no Exame de Qualificação e na Defesa.

Ao professor Doutor Fábio André dos Santos pelas oportunidades, os estágios e a contribuição neste trabalho.

Ao professor Doutor José Eduardo Cezar Sampaio, da UNESP, por sua disposição e colaboração neste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* que tornaram minha formação a melhor possível, com todo esforço e dedicação, contribuíram de forma indescritível. Muito obrigada!

Aos alunos de Graduação e Mestrado em Odontologia que tanto contribuíram para este trabalho: Jessica, Jorge e Giovanny. Obrigada!

Aos amigos do Mestrado com quem compartilhei dificuldades e alegrias, com quem aprendi e que se tornaram muito importantes nessa caminhada.

A toda minha família e amigos, por entenderem e me apoiarem nos momentos de dedicação intensa a minha formação profissional. Por torcerem e estarem ao meu lado nas conquistas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por apoiar financeiramente nesses dois anos de Mestrado.

Aos funcionários dos Laboratórios da UEPG que sempre estiveram dispostos a ajudar: Luiz, Simone, Raquel, Janaina e Vanessa.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador Professor Doutor Gibson Luiz Pilatti e a minha co-orientadora Professora Doutora Shelon Cristina Souza Bandeca, pela disposição em me ensinar e me orientar de forma excepcional. Não tenho palavras para descrever a imensa gratidão que sinto por toda dedicação e apoio constantes, pela paciência e competência. Obrigada pelas oportunidades e pelo privilégio de aprender e crescer com dois excelentes professores, a vocês minha eterna admiração!

DADOS CURRICULARES

EVELYN LOPEZ LEITE

NASCIMENTO 16.02.1990

Ponta Grossa – Paraná –Brasil

FILIAÇÃO

Marilda Terezinha Lopez Leite

Elias Lopez Leite

2008 – 2012

Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa
- UEPG

2013

Curso de Aperfeiçoamento em Estética
e Prótese Metal – Free
Associação Brasileira de Odontologia –
Ponta Grossa

2014 – 2016

Mestrado em Odontologia (em
Andamento) na área de Concentração
em Clínica Integrada – Universidade
Estadual de Ponta Grossa - UEPG

RESUMO

LEITE EL. **Aderência de *Escherichia coli* em diferentes tempos de armazenagem e adesão de elementos sanguíneos em materiais restauradores odontológicos.** [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

A escolha do material para procedimentos restauradores e protéticos em regiões subgengivais ou próximas as margens da gengiva deve considerar a capacidade de formação de biofilme e adesão de elementos sanguíneos. O acúmulo de microrganismos nesta área pode favorecer o desenvolvimento de doenças periodontais. Além disso, a adesão do coágulo é essencial para a cicatrização após terapia periodontal. Este estudo avaliou características superficiais, formação de biofilme (*Escherichia coli*) e a adesão de elementos sanguíneos em materiais odontológicos. Na formação de biofilme avaliou-se os materiais Resina Acrílica (RA) (n=20); Resina Composta (RC) (n=20); Ionômero de Vidro Autopolimerizável (IA) (n=20); Ionômero de vidro Fotopolimerizável (IF) (n=20), nos tempos de 1 ano (Grupo 1) e 24 horas (Grupo 2) de armazenagem em água destilada. Caracterização inicial: Microdureza Vickers (MV), Microscopia de Força Atômica (Rugosidade) (MFA), Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de campo (MEV-FEG). As amostras foram divididas em Grupo Controle (n=10) e Grupo Experimental (formação de biofilme) (n=10). Novas avaliações: MV; MFA; MEV-FEG – avaliação qualitativa; Espectrofotômetro e Contagem de UFC/mL – análise de formação de biofilme. Avaliou-se também a adesão sanguínea pelo Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) - MEV-FEG, em RA (n=15); RC (n=15); IF (n=15) e IA (n=15). No Grupo 1 a maior formação de biofilme foi na RA*, já no Grupo 2 foi encontrada no IF. Este último material também apresentou a maior adesão de elementos sanguíneos. Enquanto que a menor adesão foi observada na RA. Conclui-se que as características superficiais de materiais restauradores podem agir de maneira isolada, sem influenciar significativamente a formação de biofilme e que os materiais testados apresentaram adesão de elementos sanguíneos de maneira semelhante. (* Diferença estatisticamente significante $p < 0.05$).

Palavras-chave: Doença periodontal, Materiais dentários, Biofilmes

ABSTRACT

LEITE, EL. *Escherichia coli* adherence in different times of storage and blood elements adhesion in dental restorative materials. [Master's Thesis in Integrated Clinic]. Ponta Grossa: Ponta Grossa State University, 2016.

The choice of material for restorative and prosthetic procedures in subgingival or regions near the edges of the gums should consider biofilm formation and blood adhesion capacity. The accumulation of microorganisms in this area may encourage the development of periodontal disease. Moreover, the initial blood adhesion is essential for healing post periodontal therapy. This study evaluated superficial characteristics, biofilm formation (*Escherichia coli*) and blood elements adhesion in dental materials. Evaluation of materials Acrylic Resin (RA) (n = 20); Composite resin (RC) (n = 20); Self-curing glass ionomer (IA) (n = 20); Light-curing glass ionomer (IF) (n = 20) in a time of 1 year (Group 1) and 24 hours (Group 2) of storage in distilled water were performed to biofilm formation analysis. Initial characterization: Microhardness Vickers (MV), Atomic Force Microscopy (surface roughness) (AFM), scanning electron microscopy with field emission source (SEM-FEG). The samples were divided into control group (n = 10) and experimental group (biofilm formation) (n = 10). New ratings: MV; MFA; FEG-SEM - Qualitative assessment; Spectrophotometer and Count UFC/mL analysis of biofilm formation. Evaluation of blood adhesion for Index of the Blood Elements Adhesion (IAES) – FEG-SEM in RA (n=15); RC (n=15); IF (n=15) and IA (n=15). In the group 1 the greater biofilm formation was in RA*, whereas in the group 2 was found in IF. This last material showed the greater blood adhesion. Whereas the lowest blood adhesion was observed in the RA. It concludes that the surface characteristics of restorative materials may act of isolated manner, without affect significantly the biofilm formation, besides that, tested materials showed the blood elements adhesion of similar manner. (* Statistically significant difference $p < 0.05$).

Keywords: periodontal disease, dental materials, Biofilms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Materiais testados no estudo	40
Figura 2 -	Amostra no molde e aplicador para Ionômero de Vidro encapsulado	42
Figura 3 -	Diagrama do delineamento do estudo	43
Figura 4 -	Placa de Petri com amostra imersa em álcool 70° para procedimento de desinfecção	44
Figura 5 -	Inoculação de 0,1mL de suspensão contendo o microrganismo <i>E. coli</i> em caldo estéril para formação de biofilme	45
Figura 6 -	Tubos contendo caldo utilizado para inoculação	45
Figura 7 -	Placa com o meio MacConkey e realização da semeadura com “Swab” de 100µL da suspensão com microrganismos.	46
Figura 8 -	Ágar MacConkey e crescimento de <i>E. coli</i>	47
Figura 9 -	Metalização	48
Figura 10 -	Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG)	48
Figura 11 -	Microscópio de Força Atômica e representação esquemática do princípio básico do modo de análise utilizado	49
Figura 12 -	Representação esquemática da Microscopia – Microdureza Vickers	50
Figura 13 -	Deposição do sangue coletado sobre a amostra	52
Figura 14 -	Representação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no tempo 1 ano de armazenagem	55
Figura 15 -	Representação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no tempo 24 horas de armazenagem	56
Figura 16 -	Ágar MacConkey com colônias de <i>Escherichia coli</i> . Grupo – 1 ano de armazenagem	57
Figura 17 -	Ágar MacConkey com colônias de <i>Escherichia coli</i> . Grupo – 24 horas de armazenagem	58
Figura 18 -	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de	

	Emissão de Campo (MEV-FEG) do Grupo 1 ano de armazenagem	59
Figura 19 -	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) do Grupo 24 horas de armazenagem	60
Figura 20 -	Representação da Rugosidade Superficial (parâmetro Ra) de todos os grupos estudados	62
Figura 21 -	Representação da Rugosidade Superficial (parâmetro Rz) de todos os grupos estudados	64
Figura 22 -	Representação ilustrativa da Rugosidade Superficial do Grupo Controle (A, B, C e D) e Experimental (E, F, G e H) de todos os materiais do Grupo 1 ano de armazenagem	65
Figura 23 -	Representação ilustrativa da Rugosidade Superficial do Grupo Controle (A, B, C e D) e Experimental (E, F, G e H) de todos os materiais do Grupo 24 horas de armazenagem	65
Figura 24 -	Representação da Microdureza Vickers de todos os grupos testados	67
Figura 25 -	Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) da Adesão de Elementos Sanguíneos nos quatro materiais testados	69
Figura 26 -	Representação ilustrativa da Microscopia Eletrônica de Varredura da Adesão de Componentes sanguíneos dos materiais testados	70
Figura 27 -	Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Rugosidade – Ra e Contagem UFC/mL.	71
Figura 28 -	Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Microdureza Vickers e Contagem UFC/mL	71
Figura 29 -	Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Microdureza Vickers e Rugosidade Ra ..	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Material, nome comercial, fabricante e lote dos materiais restauradores selecionados	40
Tabela 2	Leitura em Espectrofotômetro dos grupos experimentais e controle	61
Tabela 3	Frequência do Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos nos grupos estudados (n=15 para cada material)	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	doença periodontal
UFC/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
C	Controle
G	Experimental
RA	resina acrílica
RC	resina composta
IA	ionômero de vidro autopolimerizável
IF	ionômero de vidro fotopolimerizável
MEV-FEG	microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo
MFA/AFM	microscópio de força atômica
IAES	índice de adesão de elementos sanguíneos
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
PGE ₂	prostaglandina E ₂
MMP	metaloproteinase de matriz
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
DNA	ácido desoxirribonucleico
KHP	keystone-pathogen hypothesis
IL-8	interleucina 8
IL-1 β	interleucina 1 beta
ICAM	molécula de adesão intercelular
TLR-1	receptor do tipo toll 1
TLR-9	receptor do tipo toll 9
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
TLR-2	receptor do tipo toll 2
TLR-4	receptor do tipo toll 4
CIV	cimento de ionômero de vidro
UV	luz ultravioleta
PBS	solução tampão fosfato

Ra	rugosidade superficial média
Rz	rugosidade superficial total
3D	três dimensões
C1	grupo controle com armazenagem em água destilada durante um ano
C2	grupo controle com 24 horas de armazenagem
G1	grupo submetido a formação de biofilme após 1 ano de armazenagem em água destilada
G2	grupo submetido a formação de biofilme após 24 horas de armazenagem em água destilada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	nanômetro
%	porcento
v	volume
mm	milímetro
s	segundo
mW/cm ²	miliwatts por centímetro quadrado
mL	mililitro
g	grama
°C	grau Celsius
µL	microlitro
h	hora
N/m	newton por metro
KHz	quilohertz
N	newton
x	aumento da lente microscópica
<	menor

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	DOENÇA PERIODONTAL	19
2.2	BIOFILME DENTAL	20
2.2.1	“PLACA NÃO ESPECÍFICA”	22
2.2.2	“PLACA ESPECÍFICA”	22
2.2.3	“PLACA ECOLÓGICA”	22
2.2.4	“PATÓGENOS-CHAVE”	23
2.3	ENTEROBACTÉRIAS NA DOENÇA PERIODONTAL	25
2.4	CARACTERÍSTICAS SUPERFICIAIS E A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS RESTAURADORES	28
2.4.1	RESINA COMPOSTA	32
2.4.2	CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO	32
2.4.3	RESINA ACRÍLICA	33
2.5	DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES	34
2.6	ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS	35
3.	PROPOSIÇÃO	38
3.1	OBJETIVOS GERAIS	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MATERIAIS RESTAURADORES UTILIZADOS.....	39
4.1	CONFEÇÃO DAS AMOSTRAS	41
4.2	GRUPOS DO ESTUDO	43
4.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME	44

4.4	MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO DE CAMPO – BIOFILME	47
4.5	ANÁLISE DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL	48
4.6	ANÁLISE DA MICRODUREZA VICKERS	49
4.7	ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS	51
4.7.1	CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS	51
4.7.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	51
4.7.3	ÍNDICE DE ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS (IAES) – MEV-FEG	52
4.8	ANÁLISE DOS DADOS	53
5.	RESULTADOS	55
5.1	FORMAÇÃO DE BIOFILME – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO	55
5.2	MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO DE CAMPO – BIOFILME	58
5.2.1	ANÁLISE QUALITATIVA DA MORFOLOGIA SUPERFICIAL	58
5.3	ESPECTROFOTÔMETRO	60
5.4	RUGOSIDADE SUPERFICIAL – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	61
5.4.1	PARÂMETRO Ra	62
5.4.2	PARÂMETRO Rz	63
5.5	MICRODUREZA VICKERS	66
5.6	ÍNDICE DE ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS (IAES)	67

5.6.1	MEV-FEG – ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS	68
5.7	CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS	70
6.	DISCUSSÃO	73
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA	94
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	97

1. INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal (DP) é caracterizada por afetar os tecidos essenciais de proteção e suporte do dente. A DP possui envolvimento de vários mediadores inflamatórios, dentre eles as citocinas, bem como o recrutamento de células de defesa (Pihlstrom, Michlowicz, Johnson¹ 2005, Zeng et al.² 2012).

O fator etiológico primário desta doença é o biofilme dental, composto por microrganismos, encontrados sob a forma de comunidades bacterianas aderidas à superfícies, sejam elas do próprio hospedeiro ou de materiais dentários e componentes de implantes (Reddy, Geurs, Gunsolley³ 2003, Rabe et al.⁴ 2015). A formação do biofilme é iniciada pela aderência de microrganismos que proporcionam novas áreas de fixação e modificam o ambiente permitindo que outras espécies se estabeleçam. A estabilização destas microcolônias ocorre por meio da síntese de polissacarídeos e proteínas, bem como o sequestro de proteínas do hospedeiro, dando origem a comunidades bacterianas complexas (Rabe et al.⁴ 2015). Os achados microscópicos mostram evidências de que a formação de biofilme ocorre também ao longo de rachaduras e defeitos no esmalte. Esse fato sugere que a formação de biofilme pode ser dependente das características da superfície em que as bactérias são aderidas. Superfícies duras, como de materiais restauradores, podem ser modificadas ao longo do tempo, tanto mecanicamente, pela escovação ou polimento, quanto quimicamente, por ácidos ou agentes clareadores. Assim, as características de superfície dos materiais dentários podem ter um efeito sobre esse mecanismo (Milleding et al.⁵ 2001, Lima et al.⁶ 2009, Ruttermann et al.⁷ 2012). Dentre essas características estão a rugosidade superficial e a microdureza (Poggio et al.⁸ 2009).

A formação do biofilme nos materiais dentários deve ser uma das características a ser avaliada no momento da escolha do material restaurador, pois tem sido associada com uma das maiores causas de desenvolvimento de doença periodontal, sendo responsável também pela formação de cárie, principalmente em restaurações subgengivais ou próximas a margem gengival (Schweikl et al.⁹ 2013).

Restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva como, por exemplo Classe V, que ocorre no terço cervical da superfície vestibular ou lingual de todos os dentes, estão ligadas a questões estéticas levando o profissional a preferir

materiais de coloração semelhante ao dente como cimentos de ionômero de vidro ou resinas compostas (Nunes, Keller, Halla Jr¹⁰ 2010, Dionysopoulos, Papadopoulos, Koliniotou-Koumpia¹¹ 2014). A relação entre os materiais restauradores utilizados em regiões subgengivais e a formação de biofilme tem sido extensivamente estudada. Pesquisas relatam que iatrogenias restauradoras podem propiciar áreas com maior quantidade de microrganismos periodontopatogênicos (Farias et al¹² 2008).

Além disso, ainda quanto a fase restauradora, resinas acrílicas utilizadas em procedimentos protéticos provisórios também servem como locais de formação de biofilme e com consequente impacto no tecido periodontal. Um dos fatores mais preocupantes com relação a resina acrílica é a alteração dimensional, com possibilidade de desadaptação aos tecidos mucosos e falta de retenção. Além disso, a ocorrência de porosidades e aumento da rugosidade tornam-se adicionalmente preocupantes, com consequente irritação dos tecidos adjacentes por meio do maior acúmulo de microrganismos (Goiato et al.¹³ 2000).

Esse acúmulo de bactérias nas superfícies de materiais restauradores serve como uma fonte de bactérias na cavidade bucal. Algumas dessas bactérias são consideradas patógenos periodontais, por estarem relacionadas ao biofilme subgengival e liberação de fatores de virulência. Entretanto, pesquisas mais recentes tem relacionado outros microrganismos presentes na cavidade bucal com participação na microflora subgengival, como *Escherichia coli* (*E. coli*), que tem sua patogênese fortemente associada a endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS) (Martin, Dailey¹⁴ 2001).

Outro fator relacionado aos materiais restauradores que pode influenciar na formação de biofilme é a degradação ao longo do tempo. A degradação constitui a dissolução e desintegração dos materiais presentes na cavidade bucal. Esses fenômenos podem ter sérias consequências nas características superficiais dos materiais e nos mecanismos de formação de biofilme, tendo grande impacto nos tecidos moles adjacentes. Na tentativa de melhorar esses aspectos e diminuir a degradação são lançados no mercado materiais com melhores propriedades e diferentes composições ou tamanhos de partículas menores como, por exemplo, compósitos nanoparticulados (Khan et al.¹⁵ 2015).

Após a resolução do quadro inflamatório e controle do biofilme com a terapia periodontal, a etapa de cicatrização envolve diversos eventos celulares e

moleculares. Esses eventos são precedidos pela formação do coágulo inicial, considerado primordial para ancoragem de células e proteção da ferida (Polimeni, Xiropaidis, Wikesjo¹⁶ 2006). A adesão dos elementos sanguíneos presentes no coágulo, a superfície dental ou aos materiais dentários, é essencial para restabelecimento dos tecidos periodontais e para os resultados da cicatrização (Leite et al.¹⁷ 2005).

O tratamento periodontal, muitas vezes, envolve a inter-relação com procedimentos restauradores. As restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva necessitam essencialmente de um cuidado com relação as suas implicações e comportamento frente aos tecidos periodontais, seja por meio do acúmulo de biofilme com consequente doença periodontal ou após restabelecimento da saúde periodontal por meio da adesão de células e fibras (Martins et al.¹⁸ 2007).

Análises da adesão de elementos sanguíneos na superfície dental têm sido extensivamente realizadas. Porém, pesquisas envolvendo superfícies de materiais restauradores e seu impacto na adesão do coágulo inicial ainda são escassas (Guida et al.¹⁹ 2010).

A partir dessa perspectiva é possível analisar questões ainda pouco compreendidas envolvendo os mecanismos de formação de biofilme e adesão de elementos sanguíneos na relação com as características superficiais dos materiais restauradores e as possíveis alterações destas ao longo do tempo, que possam ter grande impacto no desenvolvimento de doenças periodontais. Sendo possível assim, avançar nas estratégias de formulações de materiais com propriedades físicas, químicas e mecânicas capazes de possuir boa qualidade e uma adequada relação com os tecidos periodontais, além de colaborar com a prática clínica no momento da escolha correta do material restaurador.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a formação de biofilme (*Escherichia coli*) e a adesão de elementos sanguíneos em diferentes materiais restauradores odontológicos e suas características superficiais, em diferentes tempos de armazenagem em água destilada (1 ano e 24 horas após confecção).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A Doença Periodontal (DP) pode atingir aproximadamente 90% da população mundial (Pihlstrom, Michlowicz, Johnson¹ 2005, Zeng et al.² 2012). É uma doença caracterizada por afetar tecidos essenciais responsáveis pela proteção e suporte do dente, como gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso (Li et al.²⁰ 2000, Wolf, Hassel²¹ 2006, Zeng et al.² 2012, Usher, Stockley²² 2013). Tem seu início marcado pela inflamação na gengiva adjacente aos dentes, porém ainda sem perda das estruturas de suporte, caracterizando a gengivite. A maior causa de perda dentária em adultos é a periodontite, que envolve a perda de tecido conjuntivo e osso (Pihlstrom, Michlowicz, Johnson¹ 2005). A DP envolve uma complexa inter-relação entre citocinas e variados tipos de células (Usher, Stockley²² 2013, Bhuvaneswarri, Gita, Chandrasekaran²³ 2014). O fator etiológico primário desta doença é o biofilme dental (Reddy, Geurs, Gunsolley³ 2003, Hanes, Purvis²⁴ 2003, Graves, Li, Cochran²⁵ 2011, Son, Shin, Hong²⁶ 2015).

A periodontite possui uma patogênese marcada por uma cascata de reações imunológicas e inflamatórias. Características como recrutamento de células de defesa, participação dos anticorpos e liberação de mediadores, como as citocinas, estão incluídos nessas reações e são mecanismos fundamentais de proteção do hospedeiro (Moosavijazi et al.²⁷ 2014).

A continuada agressão bacteriana nos tecidos periodontais altera os mecanismos de homeostasia da resposta do hospedeiro. A consequência desse processo é a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos (Zhang et al.²⁸ 2014). Esses mediadores pró-inflamatórios incluem as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostanoídes, como por exemplo a prostaglandina E₂ (PGE₂) (Khongkhunthian et al.²⁹ 2014) e metaloproteinases de matriz (MMPs) responsáveis pela degradação da matriz extracelular dos tecidos periodontais (Surlin et al.³⁰ 2014). Essas citocinas, principalmente a IL-6, são responsáveis também por ativar e estimular a liberação de proteínas da fase aguda, além de alterar o equilíbrio de remodelação óssea tendo como resultado a reabsorção óssea (Graves, Li, Cochran²⁵ 2011, Carvalho et al.³¹

2014).

Para controlar esse processo inflamatório é necessária uma abordagem terapêutica tanto por parte do profissional quanto remoção mecânica do biofilme pelo paciente. O tratamento fundamental da doença periodontal é baseado na redução/remoção do biofilme por meio do debridamento, com auxílio de instrumentos ultrassônicos ou instrumentação periodontal por meio da raspagem e alisamento radicular, tendo como resultados esperados o retorno da homeostasia da resposta do hospedeiro e o estado de saúde periodontal (Zare et al.³² 2014). Alguns estudos relatam ainda a indicação de terapia antibiótica como um tratamento coadjuvante a esta terapia (Yao et al.³³ 2014).

2.2 BIOFILME DENTAL

O biofilme é definido como um polímero revestido por uma comunidade de microrganismos que se acumula nas superfícies (Wilson³⁴ 2001). O biofilme dental, fator chave da doença periodontal, caracteriza-se por uma película não calcificada, composta por variadas espécies de microrganismos e componentes da saliva, fortemente aderidos em superfícies duras, como o próprio dente ou materiais restauradores. (Eto, Raslan, Cortelli³⁵ 2003)

Listgarten, Mayo e Tremblay³⁶ (1975) relataram achados em microscopia eletrônica, após 1 dia de obtenção, com uma grande variedade na morfologia de cocos. O estudo avaliou o desenvolvimento do biofilme bacteriano, em diferentes intervalos de tempo, em superfícies de resina epóxi, a fim de analisar a ultraestrutura do biofilme com o mínimo de estresse em sua estrutura interna e a participação de determinados microrganismos na patogênese da doença periodontal. Com uma semana foram encontradas poucas mudanças, com predomínio de cocos ainda, porém com algumas microcolônias distintas e o início da substituição dos cocos por formas filamentosas. As alterações mais marcantes na estrutura do biofilme em três semanas consistiram de mudanças de coco-filamentos para um biofilme predominantemente filamentoso. Além disso, encontraram também a presença de bactérias espiraladas associadas ao biofilme subgengival, presentes na região cervical da coroa. As amostras coletadas com dois meses, em geral, apresentaram maior quantidade de biofilme, com características evidentes de densa quantidade de filamentosas. Na região que se estendia subgengivalmente foram encontradas

numerosas espiroquetas e bactérias Gram-negativas. Esses achados convergem com o estudo de revisão de Khuller³⁷ (2009), no qual também é relatado que os primeiros estágios da formação de biofilme envolvem a predominância de cocos Gram-positivos, em um segundo estágio gradativamente estas espécies se relacionam com microrganismos fusiformes e em um terceiro estágio, o biofilme se torna predominantemente formado por bactérias Gram-negativas, que agem nos tecidos periodontais por meio dos seus fatores de virulência, desencadeando respostas do hospedeiro.

A quantidade e extensão do biofilme estão diretamente relacionadas com a interação entre o biofilme e o meio ambiente bucal. A composição e consistência da dieta, a inflamação gengival, a composição da saliva e as características da superfície, como a rugosidade superficial, são fortes elementos que podem alterar a microbiota bucal (Opfermann, Rosing³⁸ 2013).

Na região orofaríngea existe um equilíbrio dinâmico entre a adesão dos microrganismos e uma variedade de forças na direção de remoção dessas bactérias, como movimentos friccionais causados pela dieta, língua e higiene oral, além da ação do fluido crevicular e da saliva (Poggio et al.⁸ 2009). Inicialmente, na aderência bacteriana ocorre a formação do biofilme, que tem sido extensivamente estudada em várias áreas. A hipótese de mecanismo de formação de biofilme inicial pode ser explicada por meio de dois pontos de vista básicos, o bioquímico e o físico-químico. O modelo bioquímico envolve componentes de superfície e interações entre ligante-receptor, como por exemplo, fimbrias e flagelos presentes nas bactérias. No modelo físico-químico, os mecanismos caracterizam-se por forças eletrostáticas, de Van-der-Waals e princípios termodinâmicos (Teughels et al.³⁹ 2006, Schweikl et al.⁹ 2013). Um componente importante da matriz protéica do biofilme responsável pela formação de biofilme são as glicoproteínas salivares, que podem tanto promover a aderência quando adsorvidas na superfície dental quanto aglutinar outras bactérias (Nisengard, Newman⁴⁰ 1997).

A base da formação do biofilme para aderência dos microrganismos tem sido descrita da seguinte forma: Fase 1 – transporte para a superfície; Fase 2 – aderência inicial; Fase 3 – fixação; Fase 4 – colonização/maturação do biofilme (Teughels et al.³⁹ 2006).

2.2.1 “PLACA NÃO ESPECÍFICA”

Os estudos para determinar os agentes etiológicos das doenças periodontais iniciaram na Época de Ouro da bacteriologia médica (1880 a 1920), na qual os microrganismos de muitas infecções bacterianas foram isolados e caracterizados. Os conceitos iniciais, até aproximadamente o ano de 1970, baseavam-se na hipótese da “placa não específica”, tendo como tratamento o foco na diminuição quantitativa do biofilme (Feres et al.⁴¹ 2004).

2.2.2 “PLACA ESPECÍFICA”

Após essa época da “placa não específica”, foi sugerida a hipótese de “placa específica”, com a determinação da função de microrganismos em diferentes formas da doença (Feres et al.⁴¹ 2004).

A complexidade da ecologia do biofilme subgengival tem sido reconhecida desde a primeira análise microscópica feita por Van Leeuwenhoek em 1683 (Socransky et al.⁴² 1998).

Socransky e colaboradores⁴² em 1998 realizaram o estudo clássico com 185 indivíduos, sendo 25 com periodonto saudável e 160 com perda de inserção. Os indivíduos foram acompanhados após 3 meses de terapia periodontal por meio de medições dos parâmetros periodontais. Foram coletadas amostras do biofilme subgengival e analisadas por meio da técnica de hibridização de DNA. As espécies bacterianas foram divididas em seis níveis de cores de acordo com a associação entre elas. As espécies do complexo vermelho, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* exibiram forte relação com bolsas periodontais, além de terem sido fortemente associadas também ao sangramento a sondagem. Todas as espécies do complexo laranja, constituído por bactérias como *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*, apresentaram similar significância na associação com o aumento da profundidade de bolsa periodontal.

2.2.3 “PLACA ECOLÓGICA”

Nas últimas décadas uma hipótese que combina conceitos chaves das hipóteses anteriores tem sido proposta por Marsh⁴³ (1994): a “Hipótese da Placa

Ecológica”. Essa hipótese baseia-se na proposta de que o estado de doença é resultante de um desequilíbrio causado por estresse ecológico na microflora, tendo como consequência o aumento na quantidade de microrganismos relacionados a patogênese da doença.

2.2.4 “PATÓGENOS-CHAVE”

Em 2012 foi proposto um conceito para microbiologia bucal denominado “Hipótese dos Patógenos-Chave (The Keystone-Pathogen Hypothesis - KHP)”, por Hajishengallis e colaboradores. Essa hipótese propõe que certos patógenos, mesmo que em baixa quantidade podem desencadear um processo inflamatório de doença por meio do aumento da quantidade da microbiota normal e de uma alteração na sua composição (Rosier et al.⁴⁴ 2014). A KHP foi desenvolvida pelas observações das propriedades do microrganismo *Porphyromonas gingivalis* do complexo vermelho, estudado por Socransky et al.⁴² (1998). Estudos em animais demonstraram que *P. gingivalis* foi capaz de colonizar a cavidade bucal, porém sem a capacidade de ser o gatilho da doença periodontal na ausência de outras bactérias. Nessa hipótese, o papel do sistema imune do hospedeiro tem extrema importância, com envolvimento da expressão de mediadores como interleucinas 8 e 1-beta (IL-8 e IL-1 beta), moléculas de adesão intercelular (ICAM) e selectina-E, responsáveis pela quimiotaxia, migração e adesão dos neutrófilos nos tecidos periodontais saudáveis. É demonstrado também que existe a presença de receptores do tipo toll (TLR), principalmente TLR-1 e TLR-9, mesmo que em menor número, em condições de homeostasia. Essas explicações evidenciam três grandes mecanismos da KHP: a manipulação da resposta por meio dos receptores do tipo toll; a expressão da interleucina 8 (IL-8) e a manipulação do sistema complemento (Rosier et al.⁴⁴ 2014). A presença dessa interleucina (IL-8) em altos níveis nos tecidos periodontais saudáveis e seu importante papel como responsável pela quimiotaxia dos neutrófilos, juntamente com a ICAM-1 e selectina-E também é relatada na revisão de Curtis, Zenobia e Darveau⁴⁵ (2001).

Outra explicação interessante na revisão de Rosier et al.⁴⁴ (2014) é sobre a interação das hipóteses já estabelecidas, ressaltando fatores determinantes sobre a gengivite e a periodontite. Partindo do preceito da hipótese da “placa não específica”, foi constatado que TLR-1 e TLR-9 estão presentes no tecido

gengival, que leva a reconsideração de que qualquer colonização bacteriana em quantidade suficientes no sulco gengival pode ser capaz de desencadear um processo de gengivite. Além do fato de que bactérias Gram-negativas isoladas não foram capazes de desenvolver inflamação gengival, na ausência de microrganismos Gram-positivos. A hipótese da “placa ecológica” também possui papel relevante no desenvolvimento da gengivite. Espécies bacterianas presentes em condições de saúde podem não apresentar um papel direto na reação inflamatória, porém contribuem para condições que favorecem o crescimento de patógenos considerados pró-inflamatórios. O acúmulo de microrganismos comensais pode levar além do desenvolvimento da gengivite, um aumento no processo inflamatório, do sangramento gengival a sondagem e do volume do fluido crevicular gengival. Altos níveis de proteínas e ferro presentes no fluido gengival podem servir como fontes de nutrientes para bactérias como, por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, do complexo vermelho proposto por Socransky et al.⁴² (1998). A periodontite é resultado de interações complexas entre o sistema imune do hospedeiro e as bactérias. Um aumento na quantidade de microrganismos juntamente com os fatores de virulência dos patógenos citados na “keystone-pathogen hypothesis” podem desencadear a liberação de altas quantidades de mediadores pró-inflamatórios, alguns deles responsáveis por afetar diretamente o osso alveolar, causando reabsorção. Tem sido estabelecido que fatores ambientais e genéticos como a susceptibilidade genética, estão ligados também com o aspecto étnico, polimorfismos nos genes responsáveis pela transcrição de interleucinas, diferenças nas expressões de componentes do sistema complemento e de receptores do tipo toll. Adicionalmente, a heterogeneidade fenotípica dos microrganismos com grandes diferenças genéticas em uma mesma espécie bacteriana, pode fazer com que uma cepa produza mais leucotoxina que outra, por exemplo, aumentando o risco do indivíduo desenvolver a doença. Essa pode ser uma das explicações do motivo de alguns indivíduos apresentarem gengivite por um curto período de tempo e desencadearem um quadro de periodontite agressiva, enquanto que outros durante a vida nunca desenvolvem periodontite, mesmo tendo gengivite a longo prazo (Rosier et al.⁴⁴ 2014).

Essas hipóteses têm sido estudadas a fim de elucidar os complexos mecanismos existentes no microbioma humano. O entendimento sobre a formação de biofilme ainda possui lacunas, tanto em dentes naturais quanto em materiais

restauradores (Kawai, Urano⁴⁶ 2001). A diversidade da flora bacteriana presente na cavidade bucal, adicionalmente a variedade de nutrientes disponíveis, a presença da película adquirida, diferenças de temperatura, umidade e forças, tornam a completa explicação do processo de formação de biofilme altamente complexo (Teughels³⁹ et al. 2006, Wang et al.⁴⁷ 2014).

2.3 ENTEROBACTÉRIAS NA DOENÇA PERIODONTAL

Na revisão sistemática de Listgarten e Loomer⁴⁸ (2003) sobre a identificação da microbiota na conduta das doenças periodontais, os autores relataram que a identificação microbiológica pode ser um valioso coadjuvante no plano de tratamento e que diferentes respostas clínicas ao tratamento podem depender de microrganismos específicos. Entretanto, se um diagnóstico microbiológico tiver demasiada influência nas decisões, pode afetar o diagnóstico ou o plano de tratamento, resultando em um sobretratamento e consequências econômicas para o paciente (Listgarten e Loomer⁴⁸ 2003).

Ao longo dos anos, uma quantidade substancial de pesquisas têm sido realizada com intuito de descobrir se determinados microrganismos são capazes de serem os principais causadores de doenças periodontais, das mais variadas formas. Algumas espécies têm fortes evidências para serem consideradas bactérias envolvidas especificamente com as doenças periodontais, e são chamadas periodontopatógenos. Dentre elas pode-se citar: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* (Listgarten e Loomer⁴⁸ 2003). Porém, alguns patógenos periodontais não são considerados membros da microbiota bucal residente, dentre eles bactérias entéricas e *Pseudomonas*, que pode indicar que infecções periodontais podem ocorrer na presença de outras bactérias, mesmo que estas se encontrem em menor número (Listgarten e Loomer⁴⁸ 2003).

A quantidade de bactérias pode variar bastante, por exemplo, em um sulco gengival de pacientes saudáveis estão em número aproximado de 10^3 , enquanto que em bolsas periodontais de indivíduos com a doença pode ultrapassar 10^8 (Pihlstrom, Michlowicz, Johnson¹ 2005). A variedade de microrganismos que colonizam a região subgengival, as variáveis do hospedeiro, a resposta à infecções e o aumento da quantidade de patógenos oportunistas quando comparado com as bactérias

residentes, são motivos que podem dificultar a exata compreensão sobre a etiologia da doença periodontal. Muitos dos patógenos periodontais ainda não foram identificados, uma das razões é a complexidade dos biofilmes e seus mecanismos de sobrevivência e adaptação (Pihlstrom, Michlowicz, Johnson¹ 2005). Cada vez mais tem aumentado o interesse em identificar microrganismos não comumente encontrados na microbiota subgengival ou que possam ter relação com a etiologia da doença periodontal. Isso decorre principalmente da busca em entender o que ocorre em pacientes que respondem de maneira não esperada ou que não respondem ao tratamento periodontal (Santos et al.⁴⁹ 2002).

Desde 1960 tem sido descrito um aumento da presença de Enterobactérias na cavidade bucal (Sedgley, Samaranayake⁵⁰ 1994). Alguns microrganismos, como da família *Enterobacteriaceae*, podem agir como patógenos oportunistas e colonizar a cavidade bucal, principalmente em pacientes debilitados que necessitam de tratamentos a longo prazo com medicamentos como antibióticos ou citotóxicos (Slots, Rams, Listgarten⁵¹ 1988, Conti et al.⁵² 2009).

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* apresentam fatores de virulência que podem aumentar a gravidade da doença periodontal. O controle dos microrganismos torna-se, portanto, fundamental para o sucesso do tratamento. O estudo de Santos et al.⁴⁹ 2002 correlacionou a presença de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* presentes na cavidade bucal e em bolsas periodontais com o estado clínico periodontal de 88 pacientes. Do total de pacientes analisados, 43% apresentaram estas bactérias na cavidade bucal e em cerca de 15% dos pacientes esses microrganismos estavam presentes nas bolsas periodontais. O estudo de Slots, Feik e Rams⁵³ (1990) converge com esses dados e revela que uma grande variedade de Enterobactérias e *Pseudomonas* podem constituir uma considerável parte das espécies subgengivais em pacientes que sofrem de periodontite severa.

Uma das bactérias pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, é *Escherichia coli*, microrganismo Gram-negativo, bacilo anaeróbio facultativo. A *E. coli* foi isolada pela primeira vez por Theodor Von Escherich, em 1885 e é um dos microrganismos mais extensivamente estudado, utilizado em pesquisas nas mais diversas áreas, sendo a sua endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS), considerado o padrão clássico para utilização nos estudos (Nelson et al.⁵⁴ 1997). Em adultos saudáveis, foi

encontrado 1mg dessa endotoxina de microrganismos anaeróbicos na cavidade bucal (Leenstra et al.⁵⁵ 1996).

A chave da patogênese da *E. coli* é a liberação de endotoxinas e citotoxinas, além da indução de citocinas pró-inflamatórias de células epiteliais do hospedeiro. Seu mecanismo de aderência por meio de fímbrias envolve a interação com receptores de superfície das células (Izquierdo et al.⁵⁶ 2014).

As endotoxinas são descritas classicamente como a atividade biológica, por exemplo, do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas. O LPS, um dos principais fatores de virulência da *E. coli* acopla-se a molécula de expressão CD-14 na superfície de macrófagos e monócitos. Além disso, pode ligar-se a receptores do tipo toll 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4), também expressos nas superfícies celulares, dando início a uma cascata de múltiplas vias de sinalização intracelular. Essa relação entre o LPS e as células do hospedeiro resulta em um aumento da transcrição de numerosos genes, induzindo a produção elevada de quimiocinas, citocinas e vários outros mediadores que formarão a resposta inflamatória aguda e crônica no controle da infecção. Uma situação de bacteremia sistêmica com bactérias Gram-negativas pode resultar na presença de LPS na circulação, com consequente liberação de citocinas e reações da fase aguda. Esse processo pode levar a coagulação nas vias intravasculares, resultando em falência múltipla dos órgãos (Ebersole et al.⁵⁷ 2010). As endotoxinas podem ainda prejudicar o processo de cicatrização, tendo um papel-chave nos tecidos periodontais (Martin, Dailey¹⁴ 2001).

O lipopolissacarídeo (LPS) produzido por *Escherichia coli* e outras bactérias como *Porphyromonas gingivalis* possui consideráveis evidências da sua presença em dentes com doença periodontal, tendo forte influência na patogênese da doença.

O LPS é caracterizado por apresentar um efeito marcante em células como linfócitos, osteoblastos, macrófagos e fibroblastos. Esse mecanismo de ação nas células pode causar inflamação, atraso na cicatrização, osteoclastogênese e inibição do crescimento celular. A inflamação nos tecidos periodontais pode resultar da interação entre materiais restauradores e o LPS produzido pelas bactérias Gram-negativas. Estudos indicam que o LPS de *Escherichia coli* parece ter uma afinidade por esses materiais, que pode ser afetada, por exemplo, pelas características superficiais e pH. Se a interação entre o LPS e os materiais restauradores, presentes na região subgengival ou próximas as margens da gengiva, aumentar os

níveis dessa toxina no fluido gengival pode haver um impacto desfavorável nas respostas biológicas (Nelson et al.⁵⁴ 1997).

2.4 CARACTERÍSTICAS SUPERFICIAIS E A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MATERIAIS RESTAURADORES

A cavidade bucal fornece um ambiente propício ao crescimento e formação de um biofilme complexo, ou seja, a presença de espécies bacterianas com uma grande densidade de células (aproximadamente 10^9 células/mL em amostras de saliva humana). Em superfícies onde ocorre descamação, como o epitélio oral, o mecanismo de formação de biofilme é reduzido. Enquanto que nas superfícies em que esse processo não ocorre, por exemplo, dentes e materiais restauradores, existe uma maior susceptibilidade para essa formação de biofilme, tendo como consequência maior chance de ocorrência de doenças periodontais (Song, Koo, Ren⁵⁸ 2015).

A dinâmica do processo de formação de biofilme é dependente de variáveis do hospedeiro, tais como dieta, higiene oral, composição da microbiota. A composição do biofilme pode variar de acordo com a superfície, entretanto, os exatos efeitos que as características superficiais podem exercer sobre a formação de biofilme ainda não estão bem esclarecidos. Atualmente está bem determinado que a formação de biofilme tem como fator chave inicial a aderência dos microrganismos a superfície, porém a descrição precisa da fisiologia, das interações e da influência das propriedades de superfície ainda necessitam de mais pesquisas (Song, Koo, Ren⁵⁸ 2015).

Recentemente, tem aumentado o interesse em potenciais interações entre a formação de biofilme e os materiais dentários. É de extrema importância conhecer e entender a quantidade ou a composição dos biofilmes que aderem nos diferentes materiais restauradores, de acordo com as suas propriedades mecânicas, físicas e químicas (Rudney et al.⁵⁹ 2012).

Um fator chave e um determinante potencial para aumentar a gravidade da inflamação gengival na presença de margens subgengivais de restaurações é a impossibilidade de uma higienização bucal efetiva nessas áreas (Reeves⁶⁰ 1991).

Por muitos anos os materiais restauradores com margens subgengivais foram associados com a inflamação nas doenças periodontais, principalmente porque

existe uma alteração na microbiota subgengival a partir de um perfil de saúde para um estado de doença. No entanto, segundo Oppermann e Rosing³⁸ (2013) estudos recentes sobre a inter-relação entre Periodontia e Odontologia Restauradora demonstraram novas perspectivas para o entendimento dessa relação, com foco na manutenção da estrutura dental com condições apropriadas. Uma das premissas mais importantes nessa dinâmica é o diagnóstico das distâncias biológicas. Para realização de restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva é necessária uma avaliação meticulosa da condição do controle de biofilme pelo paciente; o estado de saúde periodontal e os princípios fundamentais dos procedimentos restauradores, dentre eles a adaptação correta das margens da restauração e a escolha adequada do material restaurador. (Opperman, Rosing³⁸ 2013)

Existem quatro fatores relacionados aos materiais que podem influenciar a extensão e o grau de inflamação gengival: dificuldade em manter um perfil de emergência adequado, término da restauração/prótese inadequado, avanço da margem da restauração subgengival para uma região com pouca ou nenhuma gengiva inserida e, um dos principais, invasão do espaço biológico sem um correto exame e diagnóstico. A prevenção desses quatro fatores é essencial para reduzir o impacto negativo das margens localizadas subgengivalmente (Reeves⁶⁰ 1991).

A correlação entre a formação de biofilme e as características da superfície dos materiais, tais como: rugosidade superficial, energia livre de superfície, microdureza e composição química, tem sido extensivamente investigada com o propósito de diminuir e prevenir a formação de biofilme por meio da modificação da superfície (Gyo et al.⁶¹ 2008). A rugosidade superficial é caracterizada como uma medida de topografia da superfície de interesse. A microdureza, outra característica de superfície de igual importância e bastante estudada, é a propriedade de um material caracterizada pela resistência a uma penetração permanente.

Análises microscópicas mostram que a colonização bacteriana ocorre primeiramente em trincas e microrachaduras no esmalte, o que sugere que as propriedades da superfície podem interferir na formação de biofilme. Vale ressaltar que a formação de biofilme, na cavidade bucal, ocorre em todas as superfícies duras, sejam elas do próprio dente ou de materiais restauradores ou componentes de implantes (Carlén et al.⁶² 2001).

Tanto as características de superfície das resinas compostas, quanto sua composição têm sido amplamente estudadas na relação com a formação de biofilme. Uma das principais características que pode ter grande influência nesse processo de aderência é a rugosidade superficial, com base em resultados de estudos que encontraram maior formação de biofilme em superfícies mais rugosas (Ono et al.⁶³ 2007, Kantorski, Pagani⁶⁴ 2007, Seabra et al.⁶⁵ 2011).

Regiões críticas para essa formação de biofilme são as que necessitam de restaurações cervicais (Classe V), que podem estar situadas em áreas subgengivais ou próximas as margens da gengiva. O controle de biofilme por parte do paciente deve ser meticulosamente acompanhado, pois as restaurações presentes não devem agir como fatores retentivos de microrganismos, tendo consequências graves de inflamação dos tecidos periodontais. Existe uma grande divergência com relação ao efeito que restaurações localizadas em regiões subgengivais podem causar no periodonto (Abboud et al.⁶⁶ 2008, Dionysopoulos, Papadopoulos, Koliniotou-Koumpia¹¹ 2014).

No estudo de Kawai e Urano⁴⁶ (2011) é relatado que embora já existam estudos que encontraram menor formação de biofilme em porcelanas quando comparadas a resinas compostas ou amálgamas, quando a porcelana é polida de forma inadequada sua superfície se torna mais rugosa, com isso os autores sugerem que a superfície torna-se mais propensa a maior formação de biofilme. Por fim, relatam que a rugosidade de superfície, assim como outras características superficiais dos materiais, podem ser considerados fatores que influenciam na quantidade do acúmulo de microrganismos.

Entretanto, a inflamação gengival, consequência da presença dos microrganismos, não teve relação significativa com a rugosidade superficial no estudo de Abboud et al.⁶⁶ (2008).

Em um estudo realizado por Carlén et al.⁶² (2001) que analisou resina composta e ionômero de vidro, quanto a formação de biofilme antes e após polimento, foi encontrado um aumento marcante na formação de biofilme em resinas compostas após polimento. Os autores sugerem que a maior exposição das partículas inorgânicas após polimento pode levar ao aumento de irregularidades de superfície aumentando a formação de biofilme, enquanto que esse fato apresentou menor intensidade no ionômero de vidro testado.

No estudo de Montanaro et al.⁶⁷ (2004) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na formação de biofilme entre resinas compostas e ionômero de vidro, os achados foram similares quanto a susceptibilidade a formação de biofilme em todos os materiais. Os dados do estudo apontam que a colonização na superfície de materiais restauradores pode ocorrer na ausência de proteínas salivares e que as propriedades dos materiais podem influenciar durante a formação de biofilme em situações de uma imersão inicial em meio aquoso. Outro aspecto importante encontrado é que esse mecanismo de formação de biofilme com pré-exposição a fluidos fisiológicos, como a saliva, pode ter um efeito protetor, diminuindo a fixação bacteriana. Esse processo foi encontrado também em estudo de Steinberg et al.⁶⁸ (1999), que relatou um papel importante da saliva no controle dos depósitos de placa dental em materiais restauradores na cavidade bucal.

Em contrapartida com os estudos que encontraram associação entre formação de biofilme e rugosidade, Feng et al.⁶⁹ (2015) relataram que a diminuição encontrada na rugosidade superficial do cimento de ionômero testado no estudo teve baixa influência na formação de biofilme.

No estudo de Poggio et al.⁸ (2009) foi demonstrado que a formação de biofilme também não foi influenciada pela rugosidade superficial nos materiais Ionômero de Vidro e Resina Composta. Os materiais diferiram entre si quanto ao valor de rugosidade, porém não correlacionando com a formação de biofilme. Os autores relatam também que, mesmo o Ionômero de Vidro apresentando uma quantidade significativa de flúor, a formação de biofilme ocorreu de maneira isolada, sem apresentar redução na presença desse íon. E, por fim o estudo ressalta que os menores valores de formação de biofilme encontrados para a Resina Composta pode aumentar a longevidade das restaurações e prevenir o risco de doença periodontal.

Esse fato foi encontrado também por Lima et al.⁶ (2009), em que foram avaliados dentes bovinos e a relação de manchas brancas provenientes da formação de biofilme com a rugosidade superficial. Não foram encontradas associações entre os valores de formação de biofilme e a rugosidade.

Segundo Bollen, Lambrechts e Quirynen⁷⁰ (1997) o impacto da rugosidade de superfície subgengivalmente é muito menor, comparado a região supragengival, porque a bolsa periodontal por si só oferece um ambiente protetor.

No estudo de Nelson et al.⁵⁴ (1997) foi realizada uma investigação sobre a afinidade de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) por materiais utilizados na cavidade bucal e a interferência da rugosidade superficial nesse processo. Não foi encontrada influência significativa da rugosidade superficial na afinidade do LPS nos materiais. Os autores relatam também que materiais duros, que apresentam uma elevada microdureza, tendem a ser mais lisos na cavidade bucal, pela tendência a apresentarem mais resistência a abrasão e consequentemente podem apresentar menor afinidade ao LPS.

2.4.1 RESINA COMPOSTA

Um dos materiais restauradores mais extensivamente utilizados, tanto em regiões anteriores quanto posteriores, na prática clínica, é a resina composta. Este tipo de material possui um grande destaque também com relação a tratamentos ortodônticos, estéticos e de reabilitação, especialmente em restaurações minimamente invasivas. Entretanto, uma das maiores causas de substituição destes materiais é a formação de biofilme em sua superfície ou nas margens, podendo comprometer a longevidade das restaurações, além de causar danos aos tecidos periodontais (Suljak et al.⁷¹ 1995, Ono et al.⁶³ 2007, Rudney et al.⁵⁹ 2012).

A rugosidade da superfície da resina composta é geralmente influenciada pelo tamanho das partículas, microdureza e composição da matriz. Após polimento, as irregularidades formadas ocorrem em torno das partículas de quartzo, como consequência estas partículas podem aumentar a rugosidade do material (Sarac et al.⁷² 2006).

Em estudos que comparam a microdureza dos Cimentos de Ionômero de Vidro com a Resina Composta, o compósito resinoso demonstrou maior microdureza, com diferenças estatisticamente significativas entre os valores (Fatima et al.⁷³ 2013).

2.4.2 CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Wilson e Kent criaram o Cimento de Ionômero de Vidro (CIV) em 1971 e desde então este material tem sido cada vez mais utilizado. Dentre suas vantagens estão: biocompatibilidade e interação a longo prazo com os tecidos dentários e com

outros materiais; fácil utilização e baixo coeficiente de expansão térmica. Além disso, ainda tem como característica marcante a liberação e recarga de flúor, que sugere um efeito remineralizante e antimicrobiano (Leite et al.⁷⁴ 2013). Assim como a resina composta, uma das razões para substituição da restauração com CIV é o dano causado pela formação de biofilme, com consequente formação de cárie e desenvolvimento de doença periodontal. Portanto, um material que propicie um meio com capacidade de inibir o crescimento bacteriano seria de grande interesse clínico para restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva (Feng et al.⁶⁹ 2015).

A composição básica dos CIV's é o pó de vidro misturado com o ácido alquenóico. Sua adesão a estrutura dentária ocorre por meio de um processo químico (Nunes, Keller, Halla Jr¹⁰ 2010)

Características de superfície de restaurações de ionômeros de vidro são particularmente importantes, devido ao fato destes materiais serem considerados mais rugosos e menos duros em comparação com a resina composta (Silva, Zuanon⁷⁵ 2006, Fatima et al⁷³ 2013).

2.4.3 RESINA ACRÍLICA

Um dos procedimentos mais importantes na confecção de próteses parciais fixas é a realização de coroas provisórias. É um aspecto importante que, mesmo que a indicação dessas peças protéticas seja para uma vida clínica curta, em muitas situações pode permanecer por um longo prazo na cavidade bucal. Essas situações podem ser encontradas, por exemplo, na relação Periodontia e Prótese, em que para muitos casos a confecção de próteses provisórias torna-se necessária previamente ao procedimento cirúrgico. Em casos de relação com a Ortodontia, nos quais são necessárias restaurações provisórias para manutenção de espaços até finalização do tratamento ortodôntico. Além de reabilitações protéticas extensas, que podem exigir um longo tempo até sua finalização (Seabra et al⁶⁵ 2011).

Radford et al.⁷⁶ (1999) afirmaram que o material menos frequentemente estudado quanto a rugosidade superficial e formação de biofilme em comparação com outros materiais tem sido a resina acrílica. Portanto, são necessários mais estudos sobre as características desse material para melhor entendimento sobre sua

influência no processo de formação de biofilme, com consequências nos tecidos periodontais.

2.5 DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS RESTAURADORES

É de extrema importância identificar o efeito que a formação de biofilme exerce nos materiais dentários na cavidade bucal, seja diretamente, por meio da degradação ou alteração nas propriedades desses materiais, ou indiretamente, pela influência entre o material e os tecidos adjacentes. Por meio de estudos e pesquisas com foco no entendimento desses complexos mecanismos de formação de biofilme, é possível desenvolver materiais que possuam propriedades desejáveis, com características próprias que limitem o crescimento bacteriano e aumentem o tempo de vida dos tratamentos restauradores. (Rudney et al.⁵⁹ 2012).

A degradação dos materiais restauradores na cavidade bucal é um aspecto que pode influenciar na formação de biofilme, um fenômeno complexo que envolve a desintegração e dissolução dos materiais. Fatores que envolvem a degradação físico-química como, por exemplo, mudanças de temperatura e presença de forças, podem ter efeito deletério sobre as propriedades mecânicas. Na tentativa de superar essas influências nos materiais, uma nova classe de materiais tem sido introduzida, denominada nanocompósitos. As vantagens desses novos materiais são a melhora nas propriedades químicas e físicas, a boa resistência a compressão e propriedades mecânicas avançadas (Khan et al.¹⁵ 2015).

No estudo de Fatima et al.⁷³ (2013) os autores concluíram com seus resultados que o armazenamento em água destilada de Ionômero de Vidro e Resina Composta não alterou a microdureza Vickers dos dois materiais.

Para longevidade das restaurações é fundamental a resistência a degradação dos materiais restauradores em ambiente bucal. Estudos relatam que uma maior rugosidade pode causar uma diminuição na resistência ao desgaste desses materiais tornando a superfície significativamente mais porosa e com isso, susceptível a formação de biofilme. Esse desgaste pode levar a infiltração marginal e degradação da superfície, tendo impacto direto na longevidade da restauração (Yanikoglu, Duymus, Yilmaz⁷⁷ 2009, Braga et al.⁷⁸ 2010, Munchow et al.⁷⁹ 2014).

2.6 ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS

A remoção do cálculo por meio do tratamento periodontal básico, com adequado controle do biofilme pelo paciente, propicia um ambiente favorável ao retorno da saúde periodontal, sendo a próxima etapa a cicatrização dos tecidos, considerada um passo crucial para restabelecimento da função e estética periodontal. Fatores como o grau de contaminação da raiz e a interação entre o coágulo e o tecido conjuntivo são extremamente importantes para formação dos tecidos nessa etapa e se opõem a formação de um epitélio juncional longo (Leite et al.¹⁷ 2005, Dantas et al.⁸⁰ 2012). Posteriormente a maturação da ferida pode ocorrer uma inserção fibrosa funcional com cemento e osso alveolar (Leite et al.¹⁷ 2005). Porém, atualmente ainda existe uma lacuna quanto a interação entre as fibras colágenas e o coágulo e também sobre o mecanismo da adesão dos elementos sanguíneos presentes no coágulo em diferentes superfícies na cavidade bucal, dentre elas os materiais restauradores.

A cicatrização envolve uma série de processos biológicos controlados perfeitamente, com início na quimioatração de células, finalizando na formação e maturação de uma nova matriz extracelular. No processo de cicatrização periodontal, em primeiro lugar, os vários tipos de tecidos agem coordenadamente. Atualmente, o modelo de cicatrização periodontal baseia-se na hipótese de Melcher de 1976, a qual propõe que a natureza da inserção, estabelecida entre o dente e os tecidos periodontais, depende da origem das células (epitelial, tecido conjuntivo, osso alveolar, ligamento periodontal) que irão repovoar a ferida e que as únicas células capazes de promover uma regeneração completa são células provenientes do ligamento periodontal e células ósseas perivasculares (Illueca et al.⁸¹ 2006).

No momento inicial, após a resolução do tratamento, o coágulo formado é extremamente importante para regeneração periodontal, porque previne a migração apical do epitélio durante o processo de cura (Dantas et al.⁸⁰ 2012).

A formação do coágulo inicialmente é essencial para uma resposta imediata a qualquer trauma. O coágulo sanguíneo tem duas funções básicas: proteger temporariamente os tecidos e atuar como uma matriz provisória para migração celular. É composto por todos os componentes celulares do sangue (incluindo células brancas, vermelhas e plaquetas) em uma matriz de fibrina, fibronectina do plasma, vitronectina e trombosporina (Polimeni, Xiropaidis, Wikesjo¹⁶ 2006).

Nesses eventos iniciais ocorre a precipitação de proteínas do plasma, como fibrinogênio, que promovem uma base inicial para adesão do coágulo rico em fibrina. Ocorre então a infiltração de neutrófilos no coágulo e a fagocitose do tecido necrótico e injuriado. Na fase mais tardia o número de neutrófilos diminui e dá lugar aos macrófagos que removerão as células vermelhas do sangue, restos teciduais e neutrófilos, além de liberarem fatores estimuladores e de crescimento (Oda e Carvalho⁸² 2004).

A adesão de elementos sanguíneos, por exemplo, após cirurgias periodontais, é fundamental para os resultados da cicatrização do trauma. A ligação da fibrina recém formada com as fibras de colágeno, durante a primeira etapa desse processo, será essencial para o restante dos eventos que serão responsáveis pela inserção dos tecidos (Leite et al.¹⁷ 2005, Preeja, Janam, Nayar⁸³ 2013). Nessa etapa cicatricial as plaquetas também tem um papel-chave, pois são responsáveis pela hemostasia, além de produzirem moléculas sinalizadoras que modulam a inflamação e a cicatrização tecidual (Dantas et al.⁸⁰ 2012).

O processo cicatricial dos tecidos periodontais pode ocorrer em diversos casos, por exemplo, recobrimentos radiculares de recessões gengivais ou lesões de abrasão, procedimentos cirúrgicos para correção de alterações ou patologias, cirurgias periodontais para restabelecimento da distância biológica, além da etapa pós terapia periodontal básica. Em muitos casos a combinação da técnica cirúrgica com o tratamento restaurador pode ser a solução. Restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva podem causar uma alteração direta nos tecidos periodontais, em casos de trauma local por excesso ou falta de restauração, ou promover o acúmulo de biofilme tendo como consequência a inflamação e a doença periodontal (Martins et al.¹⁸ 2007).

Ainda é pouco esclarecida a relação entre estas restaurações subgengivais e o mecanismo de cicatrização nos mais diversos materiais que podem ser utilizados nessas áreas, sendo essencial a busca por esse entendimento, para manutenção da integridade periodontal. No estudo de Drago⁸⁴ (1997) os achados histológicos sugeriram aderência epitelial e de tecido conjuntivo em restaurações subgengivais com Ionômero de Vidro modificado por resina durante o processo de cicatrização. Entretanto, Martins et al.¹⁸ (2007) não encontraram inserção de tecido ósseo ou conjuntivo nos materiais restauradores testados.

A interação entre componentes do sangue e implantes também é de extrema importância e já está bem documentada sua influência na formação do coágulo inicial, com migração e diferenciação celular, fato que pode ser observado na adesão de elementos sanguíneos com demais superfícies presentes na cavidade bucal. No estudo de Park e Davies⁸⁵ (2000) foi observada a presença de fibrina e plaquetas na interface entre o sangue depositado e a superfície dos implantes testados, com predominância de células vermelhas em comparação com plaquetas e leucócitos. Os autores analisaram diferentes tipos de superfície de implante e concluíram que a topografia de superfície pode influenciar na distribuição de células sanguíneas, o que sugere um particular interesse em estudos que demonstrem esse mecanismo de distribuição das fibras e células nos mais variados tipos de superfícies dos materiais.

Na superfície dental já está bem documentada a inserção de fibrina e células sanguíneas, porém ainda faltam observações desses componentes nas superfícies dos materiais restauradores, para proporcionar o melhor entendimento do impacto nos tecidos periodontais das restaurações nas regiões subgengivais ou próximas as margens da gengiva.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar *in vitro* a formação de biofilme (*Escherichia coli*) e a adesão de elementos sanguíneos em diferentes materiais restauradores odontológicos e suas características superficiais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a formação de biofilme de *Escherichia coli* entre os materiais: resina composta, resina acrílica, cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável e ionômero de vidro autopolimerizável.
- Observar se a Rugosidade Superficial, avaliada por meio de Microscópio de Força Atômica, e a Microdureza Vickers dos materiais odontológicos terão influência na formação de biofilme.
- Avaliar a formação de biofilme de *Escherichia coli* nos materiais testados nos tempos de 1 ano e 24 horas de armazenagem em água destilada.
- Analisar as características superficiais dos materiais testados nos tempos de 1 ano e 24 horas de armazenagem em água destilada.
- Avaliar qualitativamente por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo a presença de *E. coli* nos diferentes materiais.
- Analisar quantitativamente a liberação de bactérias/partículas desprendidas dos materiais por meio de Espectrofotômetro.
- Investigar a Correlação das características superficiais com a formação de biofilme nos diferentes materiais testados e entre a Rugosidade Superficial e a Microdureza Vickers.
- Comparar a adesão dos componentes sanguíneos por meio do Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) entre Resina Composta, Resina Acrílica, Ionômero de Vidro Fotopolimerizável e Ionômero de Vidro Autopolimerizável.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS RESTAURADORES UTILIZADOS

Os materiais restauradores utilizados nesse estudo, para o ensaio de formação de biofilme, foram: Resina Composta, indicada para restaurações em dentes posteriores e anteriores (Empress direct, Ivoclar[®] Vivadent, São Paulo, Brasil) (n=20); Resina Acrílica Autopolimerizável (Dencôr[®], Clássico, São Paulo, Brasil) (n=20); Ionômero de Vidro Autopolimerizável (Riva self cure, SDI, São Paulo, Brasil) (n=20) e Ionômero de Vidro Fotopolimerizável (Riva light cure, SDI, São Paulo, Brasil) (n=20), como apresentados na Tabela 1 e Figura 1.

A resina composta Empress direct[®] é um compósito nanohíbrido, fotopolimerizável, utilizada em procedimentos de restauração direta nas regiões anterior e posterior. Apresenta tamanho médio de partículas da carga inorgânica de 550nm. Compõem a sua porção orgânica: dimetacrilatos (20-21,5% peso; opalescente 17% peso); copolímero (77,5-79% peso; opalescente 83%); aditivos, catalisadores e pigmentos. Na fase inorgânica possui: vidro de bário, trifluoreto de itérbio, óxidos mistos, dióxido de silício, 75%-79 peso, 52-59% volume (opalescente 60,5% peso ou 45% v.). Uma das suas indicações é para casos de restaurações Classe V (3M/ESPE, 2013).

A resina acrílica Dencôr[®] (Clássico) é um acrílico autopolimerizante com indicações, segundo os fabricantes, para coroas e facetas, confecção direta de próteses provisórias e reembasamentos, sua mistura ocorre por meio de um pó e de um líquido.

Os cimentos de ionômero de vidro, tanto o autopolimerizável (Riva self cure[®]) quanto o fotopolimerizável (Riva light cure[®]) em razão de suas propriedades, compostos por um pó de silicato de vidro juntamente com uma solução de copolímero de poliacrílico, são indicados para restaurações classes V, erosões e abrasões cervicais (Sasaki et al.⁸⁶ 2000)

Tabela 1. Material, nome comercial, fabricante e lote dos materiais restauradores selecionados.

Material	Nome Comercial	Fabricante	Lote
Resina Composta	Empress direct®	Ivoclar, Vivadent	R67351
Resina Acrílica	Dencôr®	Clássico	920121
Ionômero de Vidro Autopolimerizável	Riva self cure®	SDI	454213EG
Ionômero de Vidro Fotopolimerizável	Riva light cure®	SDI	J1405201EG



Figura 1: Materiais testados no estudo.

Nota: A – Resina Composta; B – Resina Acrílica; C – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável.

4.1.1 CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram confeccionadas 20 amostras para cada material em moldes de silicone cilíndricos (medindo 10 x 1,5 mm), seguindo as orientações dos fabricantes por um mesmo operador, com equipamentos de proteção individual (luvas de procedimento, máscara, óculos de proteção e gorro).

Para o procedimento de confecção das amostras foram utilizadas placas de vidro e tiras de poliéster. Uma matriz de silicone foi posicionada sobre uma tira de poliéster sobre a placa de vidro. O preenchimento do molde foi realizado de acordo com as instruções do fabricante para cada material. O molde foi preenchido com Resina Composta com o auxílio de uma espátula em incrementos de 2 mm, medidos por meio de uma sonda periodontal. A fotopolimerização foi realizada durante 40 s, uma segunda tira de poliéster e a placa foram posicionadas sobre o molde e o conjunto foi fotopolimerizado durante 40 s novamente nos dois lados. Os cimentos de ionômero de vidro encapsulados foram agitados em amalgamador (Ultramat S, SDI) durante 10s. Após, foram colocados nos moldes com auxílio do Riva Applicator (SDI) até preenchimento total da matriz em incremento único (Figura 2). Para o ionômero de vidro fotopolimerizável foi utilizado um tempo de 20 s de exposição ao aparelho de luz em cada lado.

Os materiais foram fotopolimerizados com o aparelho de luz LED Raddi (SDI, Austrália), com intensidade de luz de 1200 mW/cm².

Para evitar sinérese e embebição o cimento de ionômero de vidro autopolimerizável foi protegido com vaselina sólida (Rioquímica – Indústria Farmacêutica Ltda).

A resina acrílica foi preparada com a mistura de polímero, por meio da pesagem em balança analítica de precisão e monômero, medido com auxílio de uma pipeta, na proporção equivalente ao volume de 3:1, de acordo com as instruções do fabricante. O líquido (monômero) foi depositado em pote Dappen e em seguida o pó (polímero) foi adicionado, os componentes foram misturados com auxílio de espátula e a resina acrílica foi inserida na matriz. O conjunto foi pressionado sob uma placa de vidro até completa polimerização.

Após 24 horas, o polimento das superfícies foi realizado em uma politriz com refrigeração a água utilizando lixas de papel (carbeto de silício) granulação 600, 1200, 1500 e 2000 (Lima et al.⁶ 2009). A lavagem das amostras foi realizada em

cuba ultrassônica durante 10 minutos.

As amostras para o ensaio de formação de biofilme foram então utilizadas após 24 horas ou armazenadas em água destilada durante um ano.

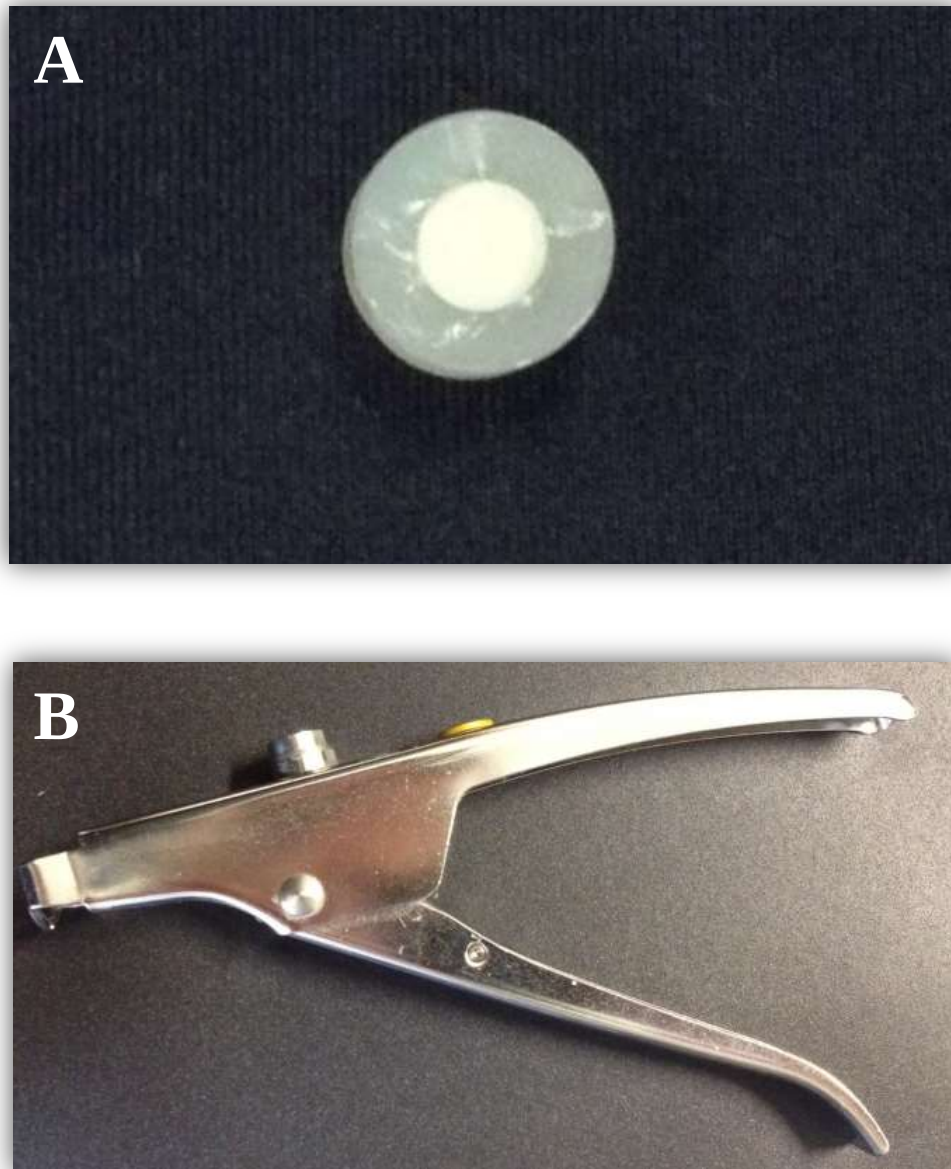


Figura 2: Amostra no molde e aplicador para Ionômero de Vidro encapsulado.

Nota: Em A - amostra no interior do molde de silicone após confecção e em B - a imagem do Riva Applicator (SDI) utilizado para os Ionômeros de Vidro encapsulados.

4.2 GRUPOS DO ESTUDO

Para o ensaio de formação de biofilme os materiais foram divididos em dois grupos, de acordo com o tempo de armazenagem (Figura 3):

- Grupo 1: amostras armazenadas durante um ano em água destilada
- Grupo 2: amostras utilizadas após 24 horas em água destilada.

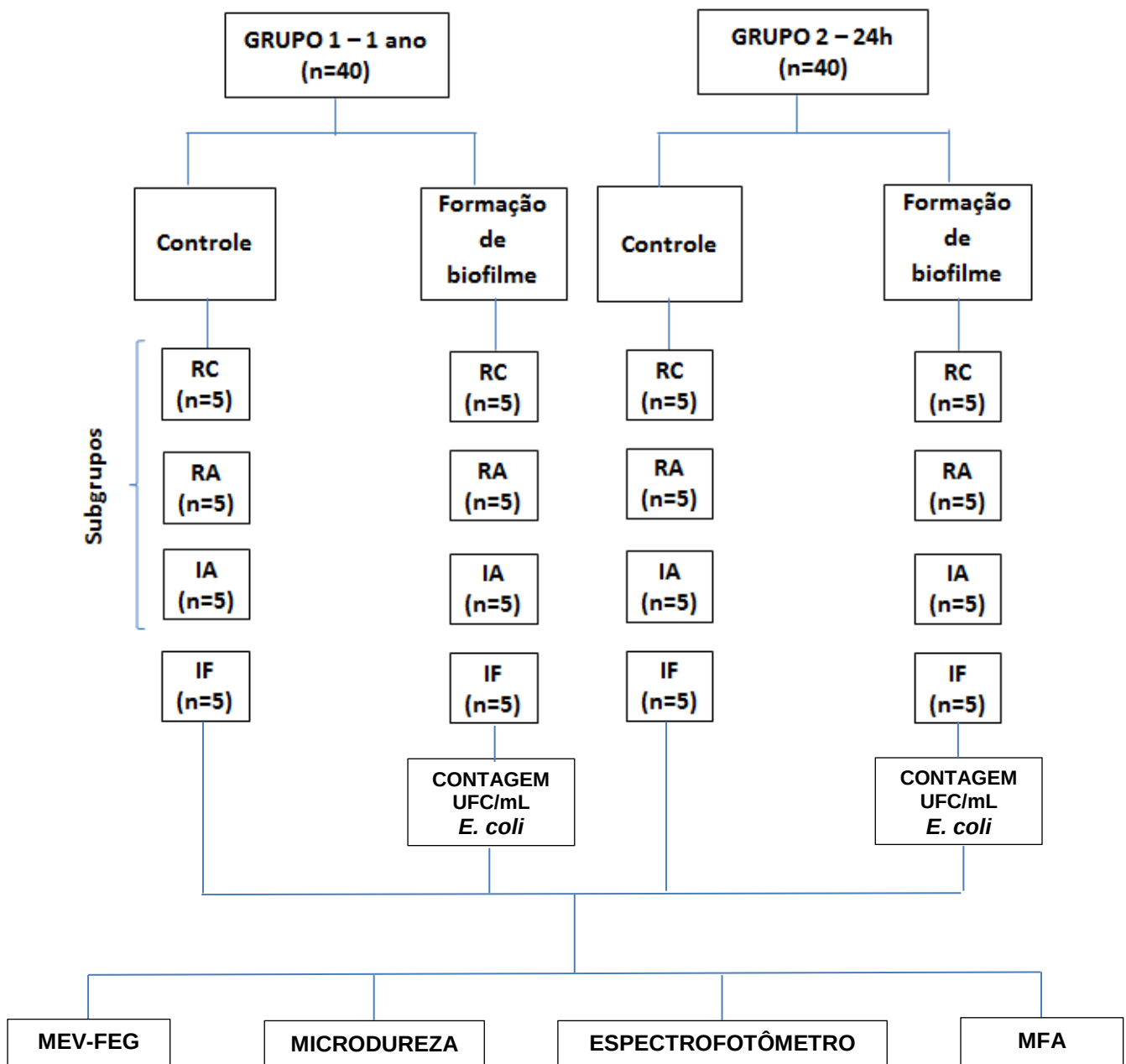


Figura 3: Diagrama do delineamento do estudo.

Nota: RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF –

Ionômero de Vidro Fotopolimerizável; MEV-FEG – Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo; MFA – Microscópio de Força Atômica.

4.3. FORMAÇÃO DE BIOFILME

Para realização do ensaio de formação de biofilme as amostras imersas em água destilada foram retiradas dos tubos e submetidas a desinfecção.

Os procedimentos de desinfecção foram realizados no interior da câmara de fluxo laminar. O protocolo para desinfecção foi seguido de acordo com o estudo de Wang et al⁴⁷ (2014). As amostras foram submetidas aos seguintes procedimentos de desinfecção: foram posicionadas em placas de vidro estéreis contendo solução de etanol 70% para desinfecção durante 10 min, e em seguida as mesmas amostras foram mantidas em hipoclorito de sódio a 1% por 1 min, novamente expostas a solução de etanol 70% durante 10 minutos e então lavadas em solução salina por 1 min (Figura 4). Em todas as soluções durante o tempo de desinfecção as amostras foram levemente agitadas. Posteriormente, as amostras foram mantidas sob a luz ultravioleta (UV) acionada durante 45 minutos de cada lado.



Figura 4: Placa de Petri com amostra imersa em álcool 70° para procedimento de desinfecção.

As amostras foram inseridas de forma asséptica em tubos de vidro contendo caldo estéril (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas para avaliar o processo de desinfecção. Caso houvesse crescimento microbiano,

nova desinfecção era então realizada. Neste momento os tubos de ensaio contendo o meio de cultura (caldo BHI) e a amostra foram preenchidos com 1mL de suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) contendo 10^8 células/mL de acordo com leitura em espectrofotômetro (Figura 5).



Figura 5: Inoculação da alíquota de 1mL de suspensão contendo o microrganismo *E. coli* em caldo estéril para formação de biofilme.

Esta suspensão foi obtida a partir de colônias de *E. coli* cultivadas em meio de cultura ágar MacConkey (HIMEDIA, 0000110500). Os tubos que continham as amostras imersas em *E. coli* foram levados a estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas, com o objetivo de proporcionar a formação de biofilme (Park et al.⁸⁷ 2012) (Figura 6).

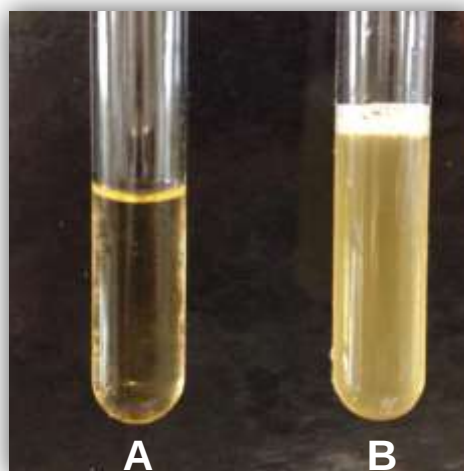


Figura 6: Tubos contendo caldo utilizado para inoculação.

Nota: O tubo da esquerda (A) não contaminado, enquanto que o do lado direito (B) apresenta turbidez

demonstrando crescimento bacteriano.

Após as 24 horas de incubação, dentro da câmara de fluxo laminar as amostras foram retiradas dos tubos e posicionadas em placas de Petri estéreis onde foram lavadas por 40s em solução fisiológica estéril para remoção das células bacterianas não aderidas. Após, as amostras foram colocadas em tubos contendo 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) e os tubos foram agitados vigorosamente durante 1 min em agitador Vortex para que as células aderidas se desprendessem.

O tampão fosfato (PBS) foi preparado e esterilizado previamente nas seguintes proporções para 1000mL de água destilada: 8g de NaCl (cloreto de sódio), 0,2g de KCl (cloreto de potássio), 1,44g de Na_2HPO_4 (fosfato dissódico) e 0,24g de KH_2PO_4 (fosfato monopotássico). Todas as substâncias foram pesadas em balança analítica de precisão e inseridas em Erlenmeyer com a água destilada, posteriormente a solução foi esterilizada.

Em seguida as amostras foram devolvidas aos respectivos caldos. O número de células de *E. coli* recuperado de cada material foi determinado por meio de Espectrofotômetro (MICRONAL) e contagem de UFC/mL. A leitura em Espectrofotômetro foi feita em comprimento de onda de 520nm por meio de absorbância. O número de UFC/mL foi determinado após diluição até 10^{-2} . Alíquotas de 0,1 mL da suspensão pura e de cada diluição (10^{-1} e 10^{-2}) foram semeadas em triplicata em ágar MacConkey (Figura 7). As placas foram então incubadas a 37°C/24h (Nelson et al.⁵⁴ 1997).



Figura 7: Placa com o meio MacConkey e realização da semeadura com “Swab” de 100µL da

suspensão com microrganismos.

Em seguida, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL), por meio de um contador de colônias, com crescimento entre 30 e 300 colônias (Figura 8).



Figura 8: Ágar MacConkey e crescimento de *E. coli*.

Nota: Formação de colônias de *E. coli*, após 24 horas incubadas em estufa a 37°, para contagem de UFC/mL.

Para os grupos Controle foram realizados os mesmos procedimentos do grupo Experimental com exceção da inoculação com *E. coli*. A leitura em Espectrofotômetro foi realizada para posterior comparação dos valores entre os grupos Experimental e Controle.

4.4 MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO DE CAMPO - BIOFILME

A formação de biofilme tem sido analisada por meio de diferentes métodos. O Microscópio Eletrônico de Varredura é considerado padrão ouro para exploração da ultraestrutura de complexos bacterianos (Feng et al.⁶⁹ 2015).

Após as amostras serem submetidas a formação de biofilme, foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de emissão de Campo (MEV-FEG – Field Emission Gun) (MIRA 3 LMH, TESCAN). As amostras foram previamente fixadas com glutaraldeído 2,5% durante 4 horas, após foram lavadas quatro vezes com PBS, seguidos de dois banhos com água destilada, então foram desidratadas em soluções de etanol de 60%, 70%, 80%, 90% e três vezes em 100% por 10 minutos cada. Posteriormente, foram armazenadas em dessecador por

um período de 48 horas (Arroyo et al.⁸⁹ 2014). As amostras foram metalizadas previamente a análise, revestidas com uma camada de ouro em metalizador (SC7620 – Quorum, Inglaterra) (Figura 9).



Figura 9: Metalização.

Nota: Amostras posicionadas na parte interna do metalizador para receberem o revestimento da camada de ouro, previamente a análise em MEV-FEG.

A análise da morfologia superficial dos materiais testados foi realizada em 3 regiões de cada amostra com aumentos de 1000x, 5000x e 10000x. As superfícies, tanto das amostras controle quanto dos grupos submetidos a formação de biofilme foram avaliadas qualitativamente, para caracterização superficial e visualização da formação de biofilme por meio de registros feitos como observações (Figura 10).



Figura 10: Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG).

Nota: Amostras metalizadas posicionadas nos stubs no interior do Microscópio para análise.

4.5. ANÁLISE DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A análise da rugosidade superficial, para avaliar alterações na superfície dos materiais, foi realizada por meio do escaneamento das amostras em Microscópio de Força Atômica (AFM) (SHIMADZU SPM 9600). Foram utilizadas 3 diferentes áreas para obter 15 medidas de rugosidade para cada grupo (Beyth et al.⁸⁸ 2008).

Os parâmetros de rugosidade superficial utilizados foram Ra e Rz e os valores de cada amostra foram determinados pela média aritmética das três leituras nas diferentes áreas, expressos em μm .

Para utilização do AFM foram utilizadas áreas de $2 \times 2 \mu\text{m}$ no modo dinâmico. A ponta utilizada para realização das leituras é a Ponta Analítica para Modo Dinâmico com Revestimento em Alumínio (SHIMADZU) com uma força constante de 42N/m e uma frequência de uso de 320m KHZ . Esse modo escolhido causa uma vibração em um dos componentes do AFM, o cantilever, que vibra perto da sua frequência de ressonância. Por meio das mudanças de amplitude do cantilever quando se aproxima da amostra, é criada uma imagem dos deslocamentos de altura da amostra, com movimentações da sonda para manter uma amplitude constante (Figura 11).

O software utilizado para leitura SPM 9600 (SHIMADZU) fornece imagens 3D. A resolução utilizada foi de 512×512 pixels.

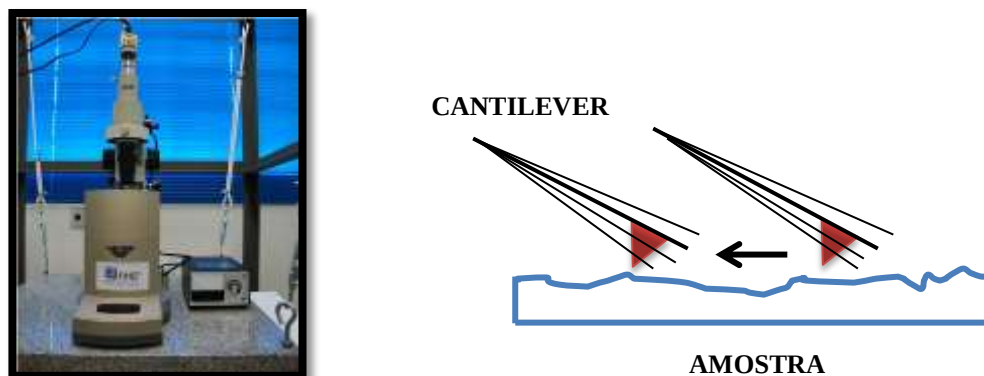


Figura 11: Microscópio de Força Atômica e representação esquemática do princípio básico do modo de análise utilizado.

4.6 ANÁLISE DA MICRODUREZA VICKERS

Uma carga de 0.98N foi utilizada para medidas de Microdureza Vickers (Fischerscope H100C) em 3 posições diferentes para cada amostra. Durante 10

segundos a carga foi aplicada e cada indentação foi medida por meio de microscópio óptico. O cálculo dos dados foi obtido por meio da média do comprimento das duas linhas formadas em cada uma das 3 indentações para cada material (Figura 12). As análises de microdureza Vickers foram realizadas previamente aos procedimentos de formação de biofilme e logo após para comparação (Beyth et al.⁸⁸ 2008).

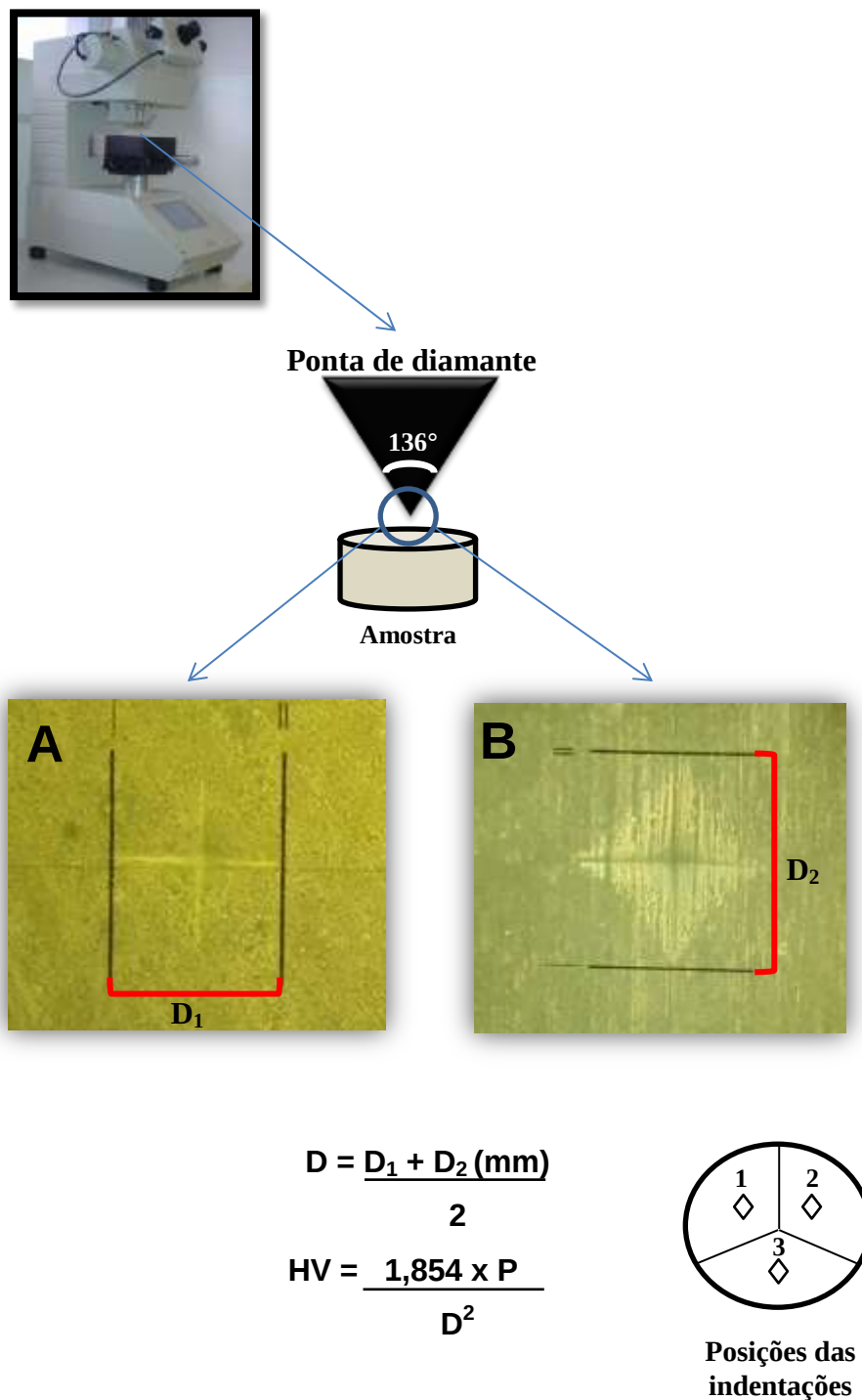


Figura 12: Representação esquemática da Microscopia - Microdureza Vickers.

Nota: As medições de cada indentação são realizadas no sentido horizontal (A) representado esquematicamente na fórmula por D_1 e no sentido vertical (B) representado por D_2 , sendo a média das duas representada pela letra D. A Microdureza Vickers de cada região (total de 3 regiões por amostra) é representada pela fórmula de HV.

4.7 ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS

A presente análise teve início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o Protocolo CEP - 1.302.601.

4.7.1. CONFECÇÃO DAS AMOSTRAS

Os materiais utilizados nessa análise foram: Resina Acrílica autopolimerizável (Dencôr[®], Clássico, São Paulo, Brasil) (n=15); Resina Composta, indicada para restaurações em dentes posteriores e anteriores (Empress direct, Ivoclar[®] Vivadent, São Paulo, Brasil) (n=15); Ionômero de Vidro Autopolimerizável (Riva self cure, SDI, São Paulo, Brasil) (n=15); Ionômero de Vidro Fotopolimerizável (Riva light cure, SDI, São Paulo, Brasil) (n=15).

As amostras foram confeccionadas como descrito anteriormente no tópico 4.1.1.

4.7.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo para Análise do Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) foi seguido conforme estudo de Tsurumaki et al⁹⁰ (2013).

A coleta do sangue do doador foi realizada por meio de punção de 10mL de sangue com seringa e agulha descartável. O paciente, um dos pesquisadores, realizou a leitura e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os exames de coagulação e a coleta do sangue foram realizados no Laboratório Farmácia Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa, por equipe capacitada.

As amostras foram previamente preparadas em potes pequenos circulares e identificadas de acordo com o grupo. Os potes foram preenchidos com cera e a amostra foi fixada para exposição apenas da superfície a ser analisada.

O sangue foi depositado sobre as amostras (1 gota por espécime), em todos os grupos experimentais, por meio de seringa hipodérmica e agulha (Figura 13).

As amostras foram lavadas, após 20 minutos, 3 vezes durante 5 minutos com PBS (tampão fosfatado) pH 7,0 sobre uma plataforma vibratória. Após, as amostras foram identificadas e foi realizada a fixação do componente sanguíneo no material com solução de formaldeído 1% em PBS durante 15 minutos. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens com tempos de 5 minutos de solução de tampão fosfatado. Em seguida, as amostras foram incubadas em 0,02M de glicina em PBS durante 10 minutos e lavadas novamente. A fixação foi feita com glutaraldeído 2,5% em solução tampão fosfatado por 30 minutos e novamente as amostras foram lavadas. Após, foi realizada a desidratação das amostras com etanol 25%, 50%, 75%, 95% e 100% por 10 minutos em cada solução. Posteriormente, as amostras foram então armazenadas em dessecador no mínimo durante 24 horas.



Figura 13: Deposição do sangue coletado sobre a amostra.

4.7.3 ÍNDICE DE ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS (IAES) – MEV-FEG

Após fixação e armazenagem em dessecador, as amostras foram colocadas em *stubs* metálicos e metalizadas por meio do recobrimento com uma camada de ouro em metalizador (SC7620 – Quorum, Inglaterra).

O MEV-FEG foi operado a 15 kV e obteve-se fotomicrografias nos aumentos de 1000x, 2000x, 5000x e 10000x.

As imagens obtidas foram analisadas por 1 examinador calibrado, experiente e “cego” quanto a identificação das amostras. O examinador realizou a descrição morfológica da superfície (“Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos” - IAES) como descrita a seguir (Dantas et al.⁸⁰ 2012, Tsurumaki et al.⁹⁰ 2013):

- 0 - Ausência de rede de fibrina e de células sanguíneas;
- 1 - Escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas;
- 2 - Moderada quantidade de células sanguíneas e rede de fibrina
- 3 - Densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sanguíneas aprisionadas.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados da formação de biofilme foram expressos em UFC/mL. Após verificação de normalidade e homogeneidade dos dados (Teste Kolmogorov-Smirnov; Teste D’Agostino e Pearson; Teste Shapiro-Wilk), foram analisados por meio dos Testes ANOVA um critério e Teste Tukey para Comparação Múltipla com $p < 0,05$ e apresentados em gráficos.

Os resultados de confirmação microscópica da formação de biofilme do Microscópio Eletrônico de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) foram obtidos por meio de imagens em aumentos de 1000x, 5000x e 10000x. Para o MEV-FEG a análise qualitativa está representada por meio de registros e observações.

Os dados da leitura em Espectrofotômetro estão apresentados em tabela.

Para os resultados da Microdureza Vickers e Rugosidade Superficial foram aplicados os Testes ANOVA um critério e Tukey para Comparação Múltipla, com representações em gráficos. A Rugosidade Superficial foi representada também com imagens obtidas no Microscópio de Força Atômica.

Para análise de Correlação entre as variáveis, os dados foram primeiramente submetidos a verificação de Normalidade (Teste Kolmogorov-Smirnov; Teste D’Agostino e Pearson; Teste Shapiro-Wilk). Os dados para correlação entre Rugosidade Ra e Contagem UFC/mL e para correlação entre Microdureza Vickers e Contagem UFC/mL foram analisados por meio do Teste Correlação de Spearman,

pois foram considerados não-paramétricos. Já a correlação entre as duas características superficiais Rugosidade Ra e Microdureza Vickers foi analisada por meio do Teste de Correlação de Pearson, pois os dados foram considerados paramétricos.

Os resultados da Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo para o Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos foram expressos em escores de 0 a 3.

O teste estatístico utilizado para o Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos foi o Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e em caso de valor de $p \leq 0,05$ a comparação entre os pontos médios das amostras era realizada utilizando-se o teste de Mann-Whitney.

5. RESULTADOS

5.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS POR MILILITRO

O Ionômero de Vidro Autopolimerizável foi o material que apresentou a menor média entre todos os materiais e nos dois tempos avaliados. A Resina Acrílica foi o material que apresentou a maior contagem de UFC/mL na comparação entre os materiais armazenados durante um 1 ano em água destilada, demonstrando diferença estatisticamente significativa com os outros três materiais. Houve diferença estatisticamente significativa ainda, nesse tempo avaliado, entre os dois Ionômeros de Vidro testados (Figura 14).

Enquanto que dos materiais armazenados 24 horas, o Ionômero de Vidro Fotopolimerizável obteve a maior média, porém sem diferenças estatisticamente significantes entre os materiais (Figura 15).

Foi observada formação de biofilme em todos os materiais restauradores testados (Figuras 16 e 17).

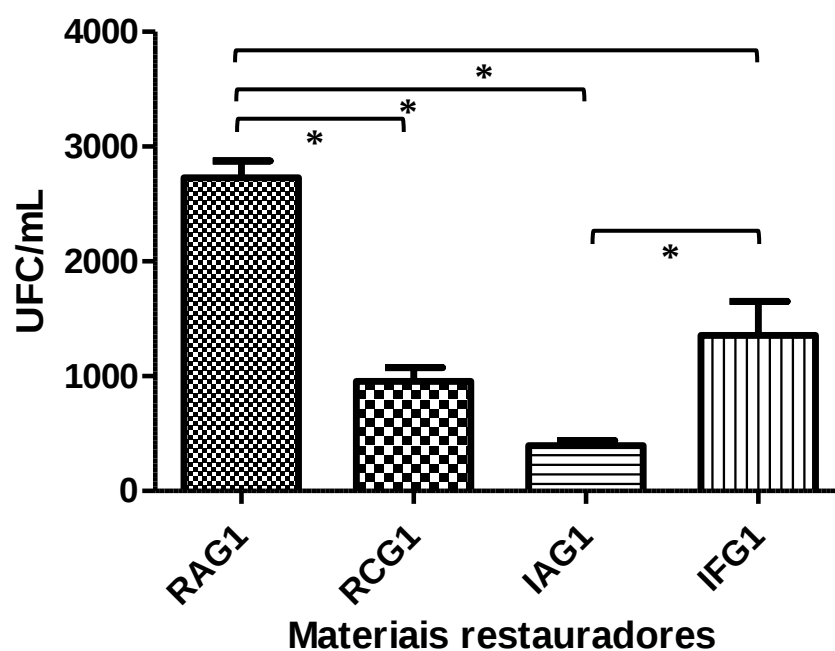


Figura 14: Representação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no tempo 1 ano de

armazenagem.

Nota: A maior média de UFC/mL foi encontrada na Resina Acrílica. Enquanto que a menor pode ser observada no Ionômero de Vidro Autopolimerizável. As barras representam a média e as linhas acima das barras representam o erro padrão das médias, para análise de formação de biofilme, de acordo com o tipo de material restaurador e o tempo. RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. G1 – grupo armazenado 1 ano em água destilada; Diferenças estatisticamente significativas estão representadas por [*]. Valor de $p < 0,05$ considerada diferença estatisticamente significativa.

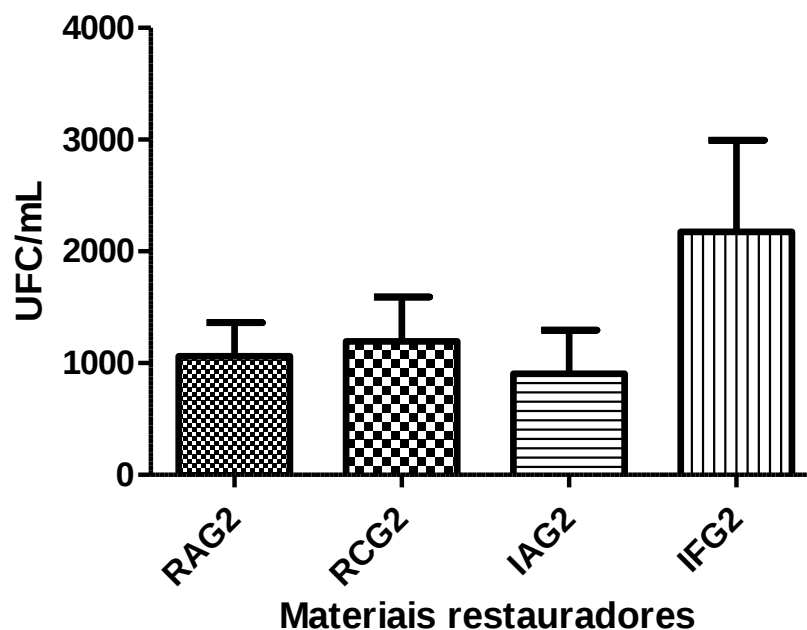


Figura 15: Representação das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no tempo 24 horas de armazenagem.

Nota: A maior média de UFC/mL foi encontrada no Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. Enquanto que a menor pode ser observada no Ionômero de Vidro Autopolimerizável. Não houve diferença estatisticamente significante entre os materiais. As barras representam a média e as linhas acima das barras representam o erro padrão das médias, para análise de formação de biofilme, de acordo com o tipo de material restaurador e o tempo. RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. G2 – grupo armazenado 24 horas em água destilada. Valor de $p < 0,05$ considerada diferença estatisticamente significativa.

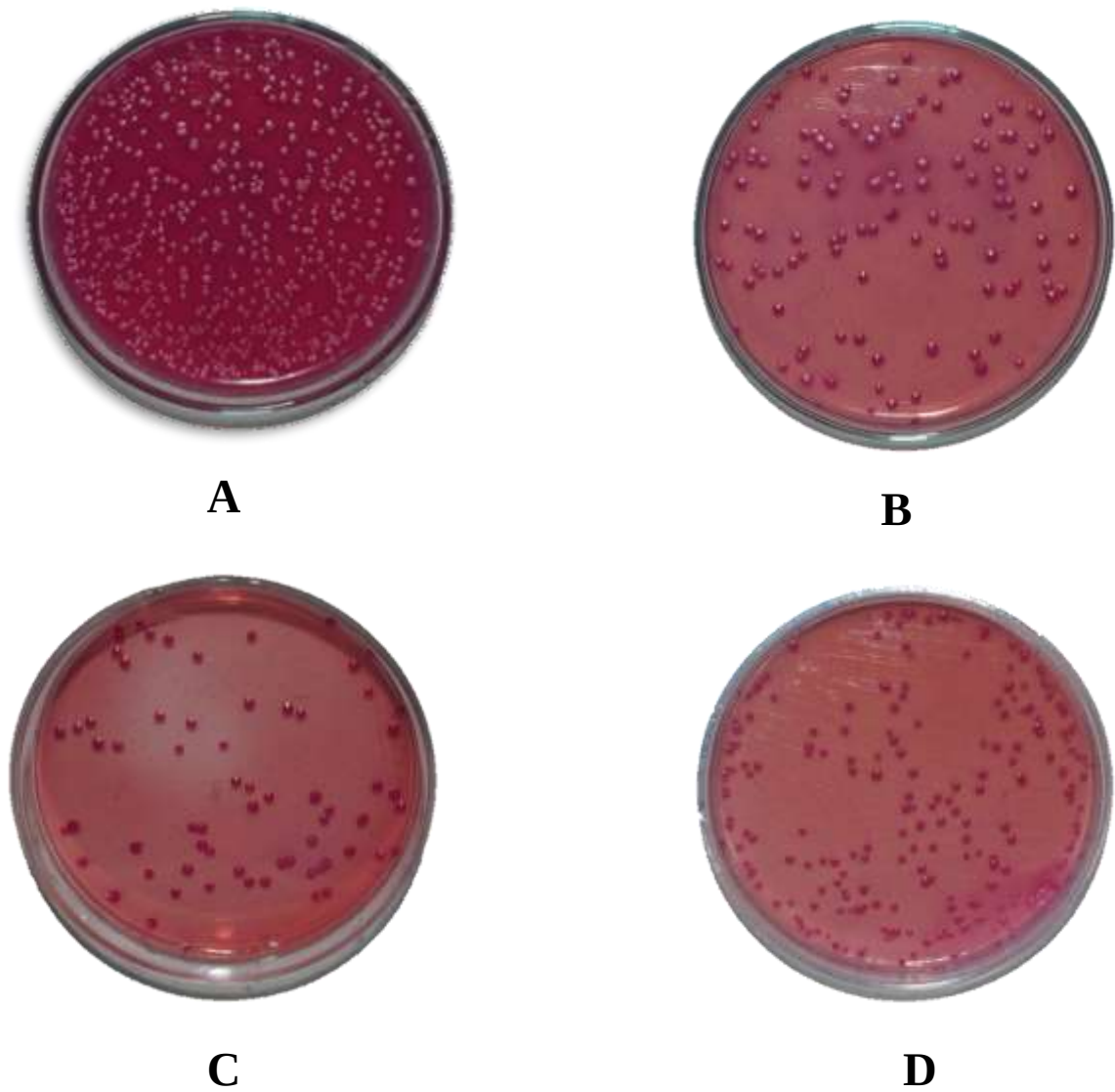


Figura16: Ágar MacConkey com colônias de *Escherichia coli*. Grupo - 1 ano de armazenagem.

Nota: A – Resina Acrílica; B – Resina Composta C – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável.

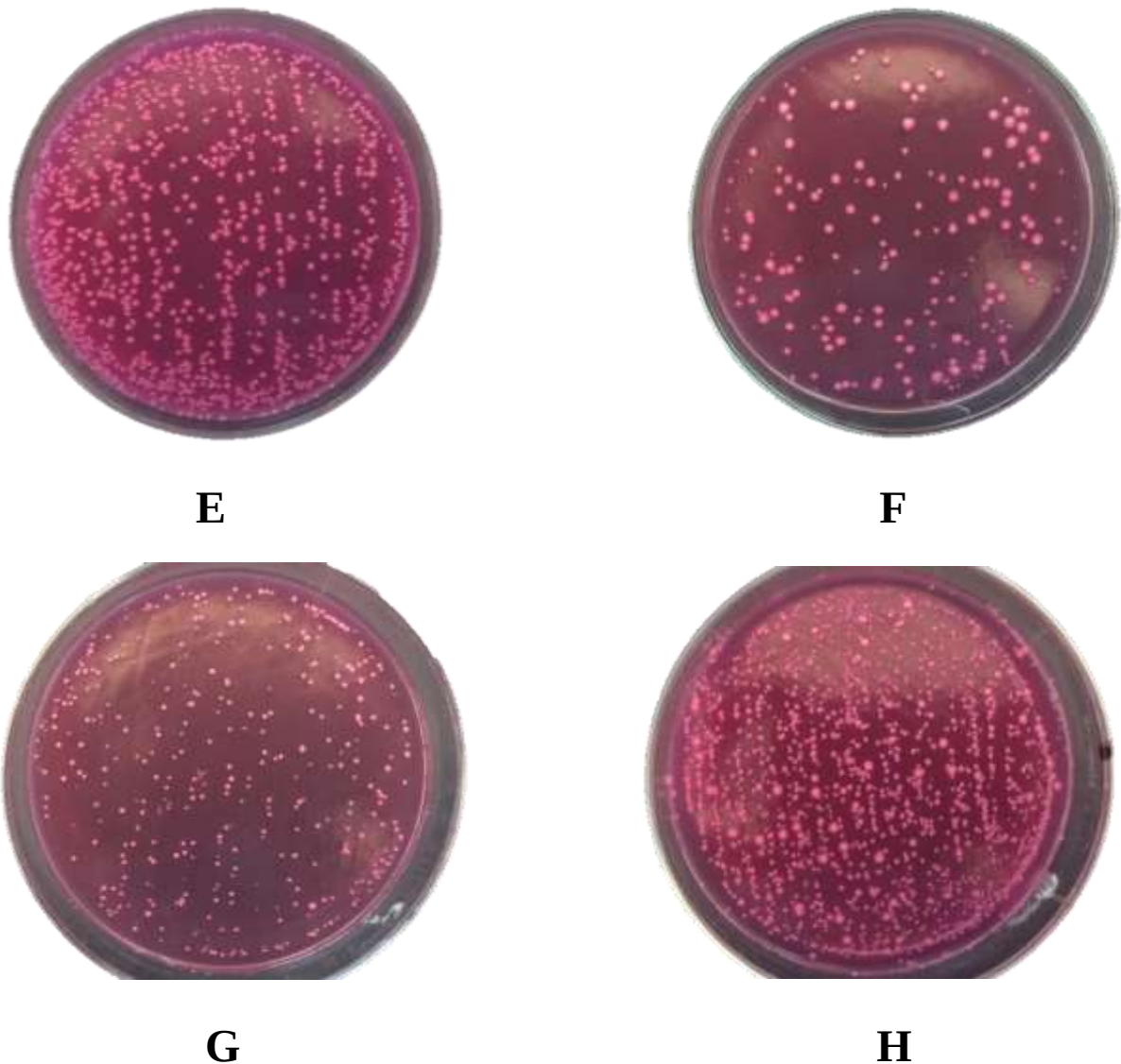


Figura 17: Ágar MacConkey com colônias de *Escherichia coli*. Grupo – 24 horas de armazenagem.
Nota: E – Resina Acrílica; F – Resina Composta; G – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; H – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável.

5.2 MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA COM FONTE DE EMISSÃO DE CAMPO - BIOFILME

5.2.1 Análise Qualitativa da Morfologia Superficial

Na análise qualitativa do MEV-FEG é possível observar nas imagens que o material com a menor quantidade de irregularidades na superfície é a Resina Composta. Os materiais Resina Acrílica, Ionômero de Vidro Autopolimerizável e o Fotopolimerizável do grupo 2, apresentaram médias bastante elevadas de

rugosidade superficial após serem submetidos a formação de biofilme, com a confirmação da presença de irregularidades topográficas nas imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo. Para melhor visualização da formação de biofilme foram realizadas imagens em aumento de 10000x nas amostras do grupo Experimental. As imagens das amostras dos grupos Controle de cada material foram selecionadas com o aumento de 1000x a fim de caracterização da superfície (Figuras 18 e 19).

Identifica-se nas imagens dos materiais com 1 ano de armazenagem, que existe uma semelhança nas características de superfície dos grupos Controle e dos grupos Experimentais.

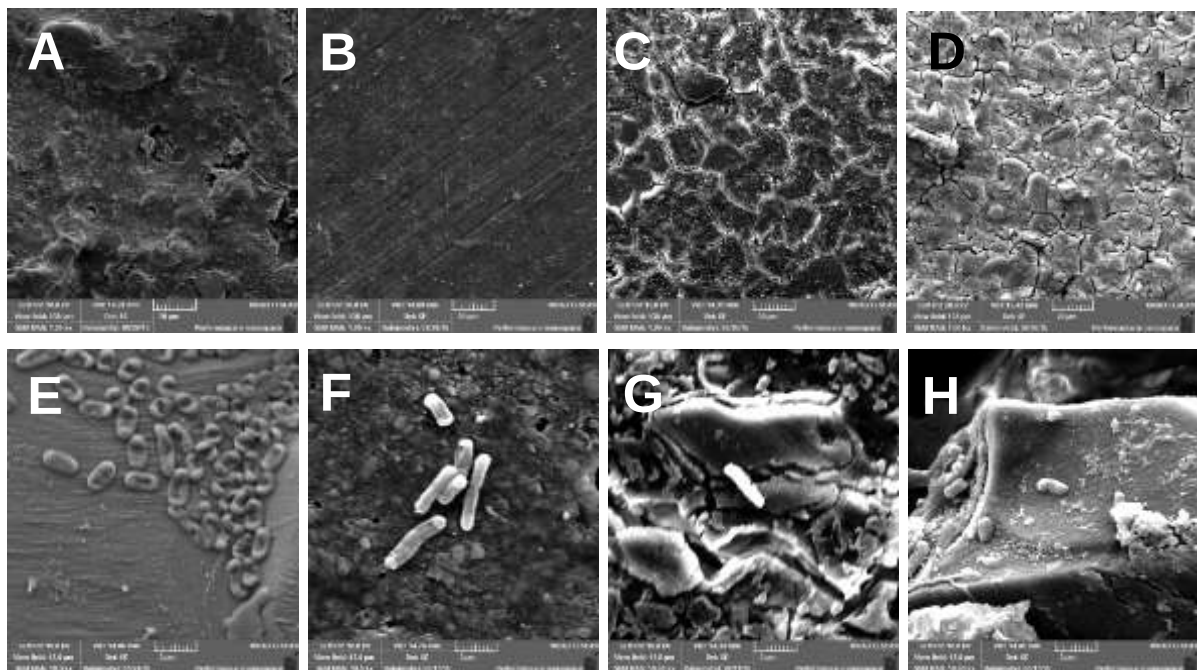


Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) do Grupo 1 ano de armazenagem

Nota: Imagens A, B, C e D (Grupo Controle) com aumento de 1000x. Imagens E, F, G e H (Grupo Experimental) com aumento de 10000x. A e E – Resina Acrílica; B e F - Resina Composta; C e G – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D e H – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável.

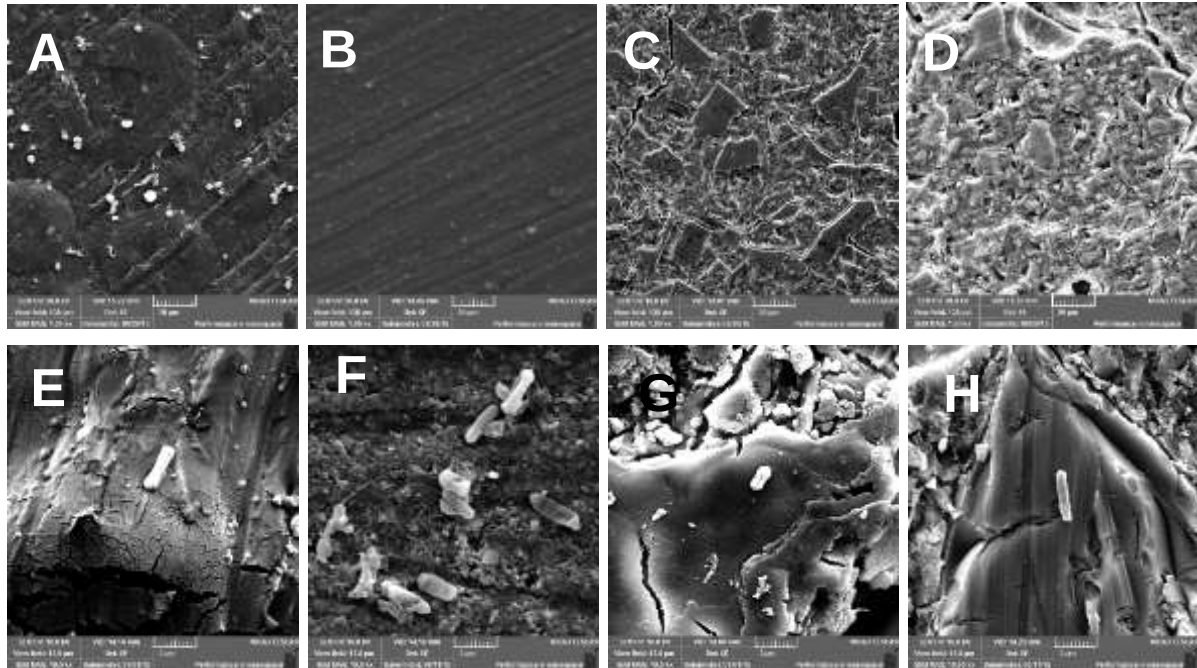


Figura 19: Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) do Grupo 24 horas de armazenagem

Nota: Imagens A, B, C e D (Grupo Controle) com aumento de 1000x. Imagens E, F, G e H (Grupo Experimental) com aumento de 10000x. A e E – Resina Acrílica; B e F - Resina Composta; C e G – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D e H – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável.

5.3 ESPECTROFOTÔMETRO

Na análise de Espectrofotometria, a Resina Acrílica armazenada por um ano em água destilada foi o material que apresentou a menor liberação de células e partículas em PBS, com leituras equivalentes a zero, em ambos tempos de armazenagem analisados. Enquanto que o material que teve maiores leituras foi o Ionômero de Vidro Fotopolimerizável, também nos dois tempos testados (Tabela 2).

Tabela 2 : Leitura em Espectrofotômetro dos grupos experimentais e controle.

GRUPO 1		GRUPO 2	
RA C1	0.000	RA C2	0.000
RA G1	0.000	RA G2	0.007
RC C1	0.005	RC C2	0.004
RC G1	0.018	RC G2	0.021
IA C1	0.055	IA C2	0.090
IA G1	0.061	IA G2	0.095
IF C1	0.062	IF C2	0.111
IF G1	0.075	IF G2	0.155

5.4 RUGOSIDADE SUPERFICIAL – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A análise da rugosidade superficial em Microscópio de Força Atômica (MFA) permitiu a quantificação das irregularidades da topografia das superfícies dos materiais, além da observação de aspectos tridimensionais tanto dos grupos controle, quanto dos grupos experimentais nos dois tempos testados.

Foi possível observar que os materiais do tempo 1 ano de armazenagem que apresentaram-se mais rugosos tanto no parâmetro Ra, quanto no parâmetro Rz foram os Cimentos de Ionômero de Vidro, o Fotopolimerizável para o parâmetro Ra e Autopolimerizável para o parâmetro Rz. Já para o tempo de 24 horas, o material com maior rugosidade superficial foi a Resina Acrílica, tanto nos valores de Ra, quanto Rz. Enquanto que os menores valores de rugosidade superficial encontrados foram relativos a Resina Composta em ambos tempos estudados (Figuras 20 e 21).

5.4.1 PARÂMETRO Ra

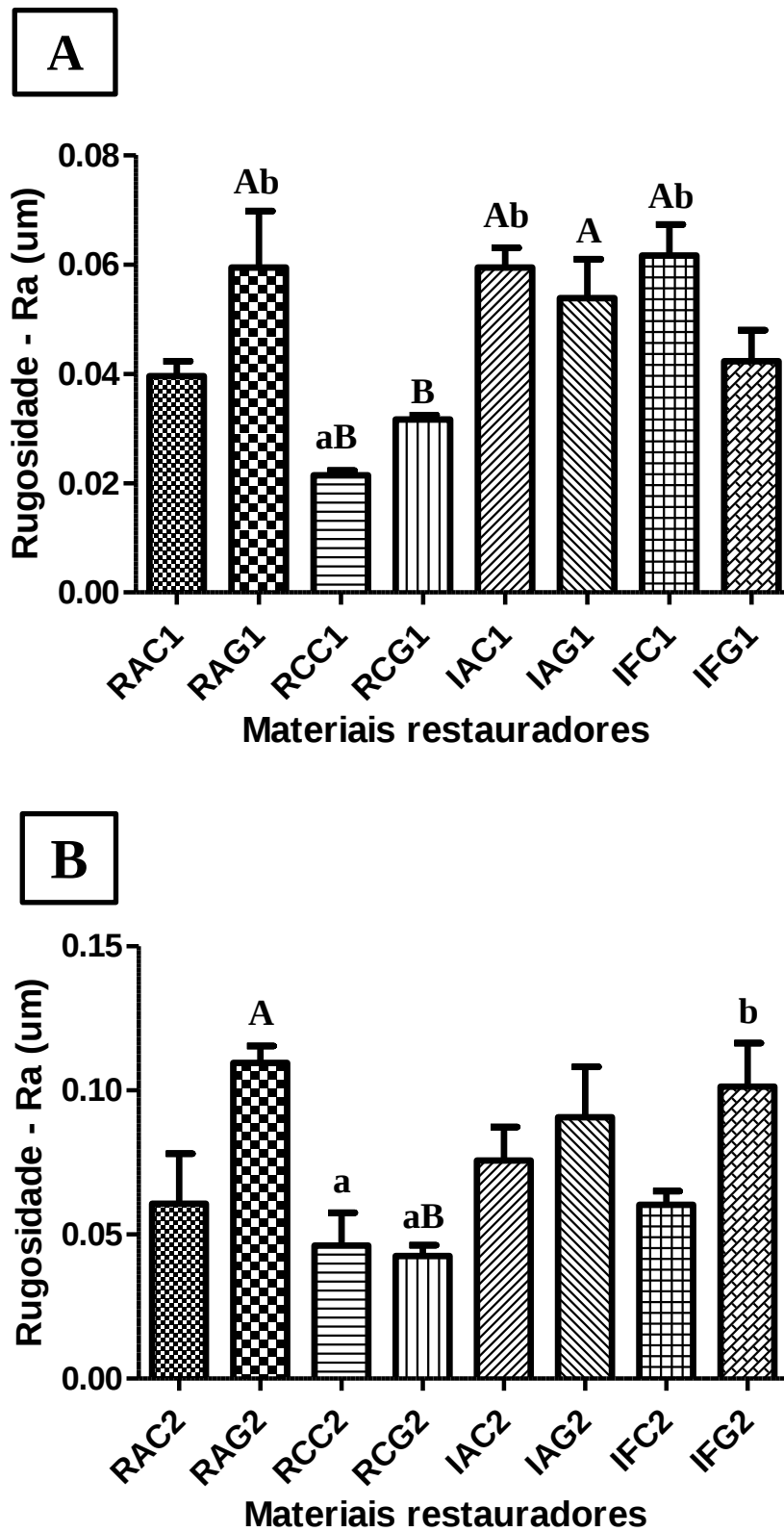


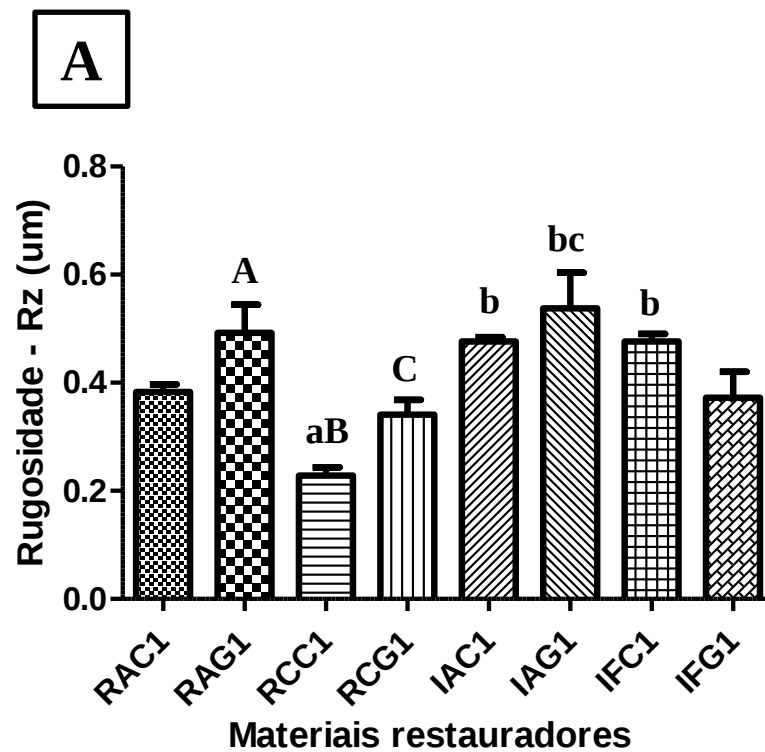
Figura 20: Representação da Rugosidade Superficial (parâmetro Ra) de todos os grupos estudados.

Nota: No gráfico A os materiais do tempo 1 de armazenagem e gráfico B do tempo 24 horas de

armazenagem.

As barras representam a média e as linhas acima das barras representam o erro padrão das médias, para análise de Rugosidade Superficial (parâmetro Ra), de acordo com o tipo de material restaurador e o tempo. RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. G1 – grupo submetido formação de biofilme um ano de armazenamento em água destilada; G2 – grupo submetido a formação de biofilme 24 horas após confecção. Letras iguais acima dos materiais, minúsculas e maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.4.2 PARÂMETRO Rz



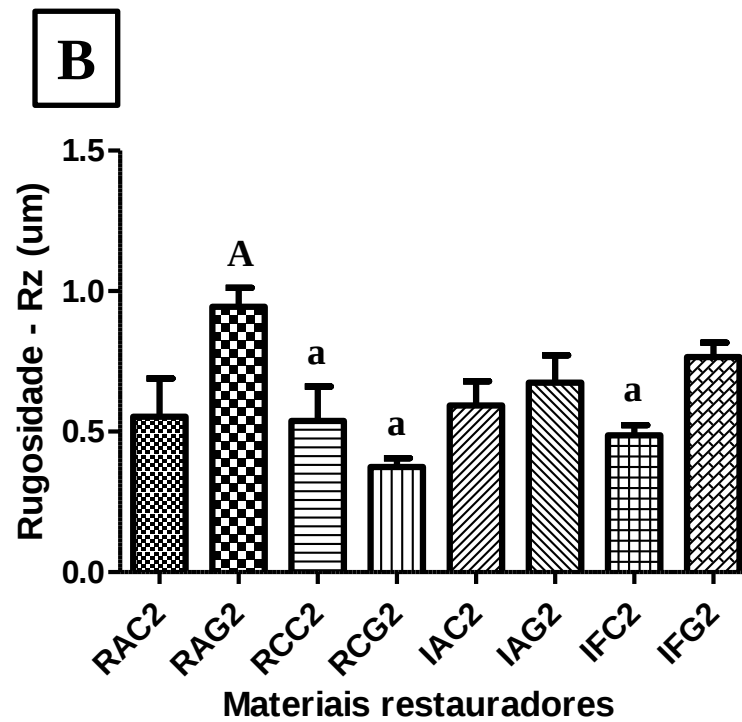
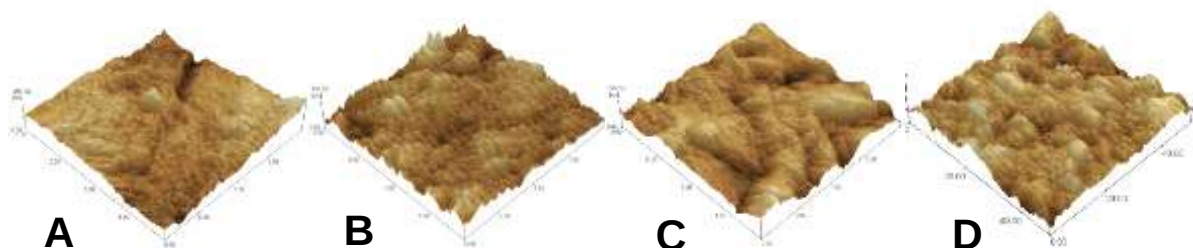


Figura 21: Representação da Rugosidade Superficial (parâmetro Rz) de todos os grupos estudados.

Nota: No gráfico A os materiais do tempo 1 de armazenagem e gráfico B do tempo 24 horas de armazenagem.

As barras representam a média e as linhas acima das barras representam o erro padrão das médias, para análise de Rugosidade Superficial (parâmetro Rz), de acordo com o tipo de material restaurador e o tempo. RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. G1 – grupo submetido formação de biofilme um ano de armazenamento em água destilada; G2 – grupo submetido a formação de biofilme 24 horas após confecção. Letras iguais acima dos materiais, minúsculas e maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

As imagens em Microscopia de Força Atômica dos materiais testados estão representadas a seguir (Figuras 22 e 23):



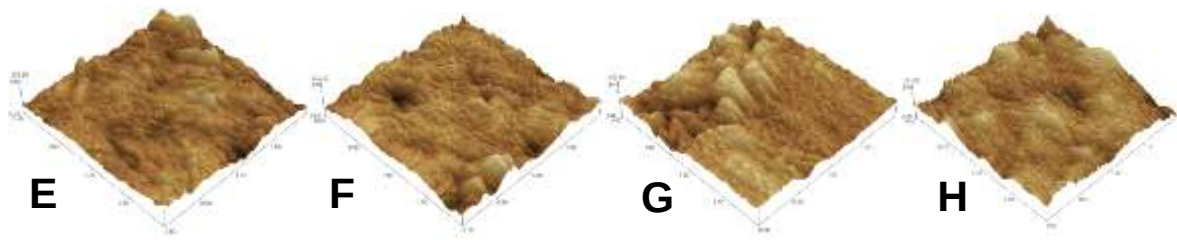


Figura 22: Representação ilustrativa da Rugosidade Superficial do Grupo Controle (A, B, C e D) e Experimental (E, F, G e H) de todos os materiais do Grupo 1 ano de armazenagem.

Nota: A e E - Resina Acrílica; B e F - Resina Composta; C e G – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D e H – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. Observa-se maior presença de irregularidades em C e D. Identifica-se um padrão bastante semelhante entre as superfícies de E, G e H, porém o material F é o que apresenta a superfície menos rugosa em comparação com os demais materiais.

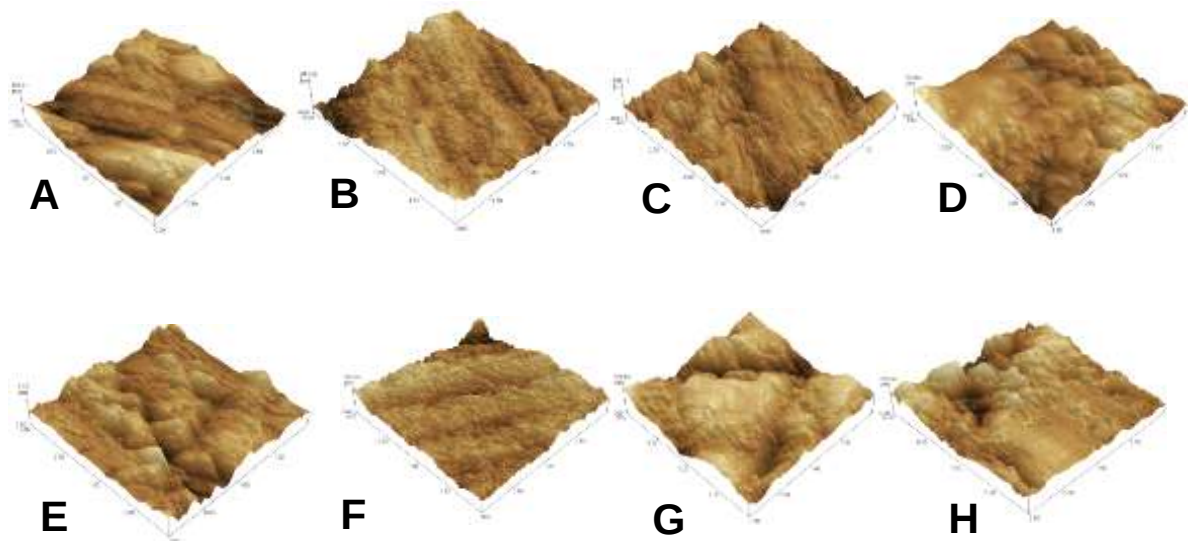


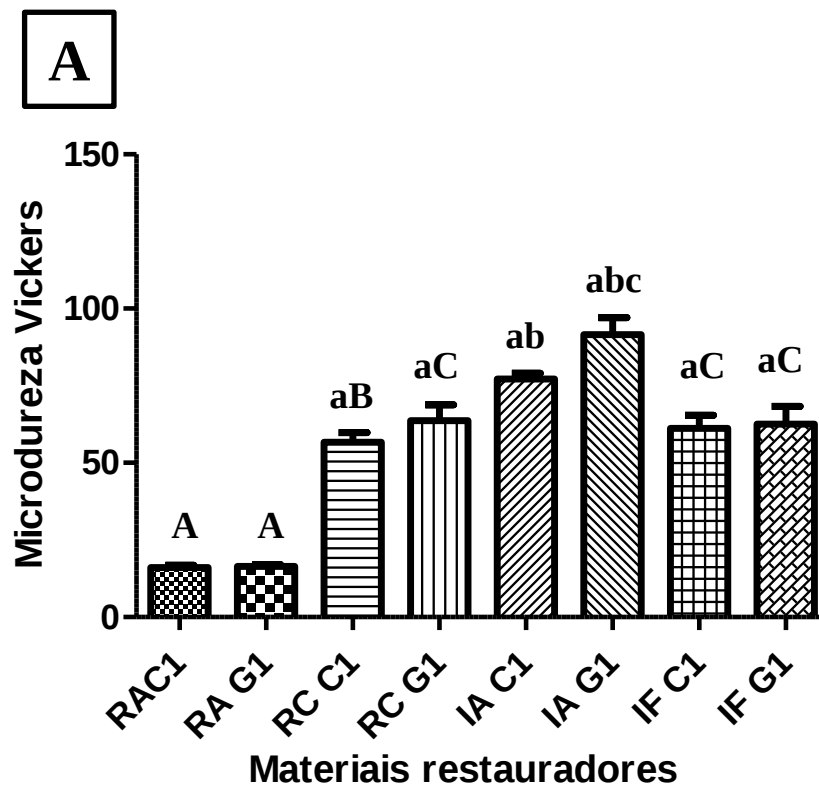
Figura 23: Representação ilustrativa da Rugosidade Superficial do Grupo Controle (A, B, C e D) e Experimental (E, F, G e H) de todos os materiais do Grupo 24 horas de armazenagem.

Nota: A - Resina Acrílica; B- Resina Composta; C – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; D – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. . Pode-se observar semelhança no padrão de picos e vales entre os materiais A, B, C e D. Observa-se maior quantidade de picos e vales no materiais E, G e H em comparação com o material F, no qual identifica-se uma superfície mais lisa.

5.5 MICRODUREZA VICKERS

Em relação aos dados de microdureza Vickers a análise de variância demonstrou que houve diferença significativa entre os tipos de materiais testados, porém não houve diferença estatística na comparação dos valores do mesmo material entre Grupo Experimental e Controle em ambos tempos analisados.

O material que apresentou maior valor de microdureza Vickers foi o Ionômero de Vidro Autopolimerizável, enquanto que o material que revelou menor microdureza Vickers foi a Resina Acrílica, também tanto para 1 ano quanto para 24 horas de armazenagem em água destilada (Figura 24).



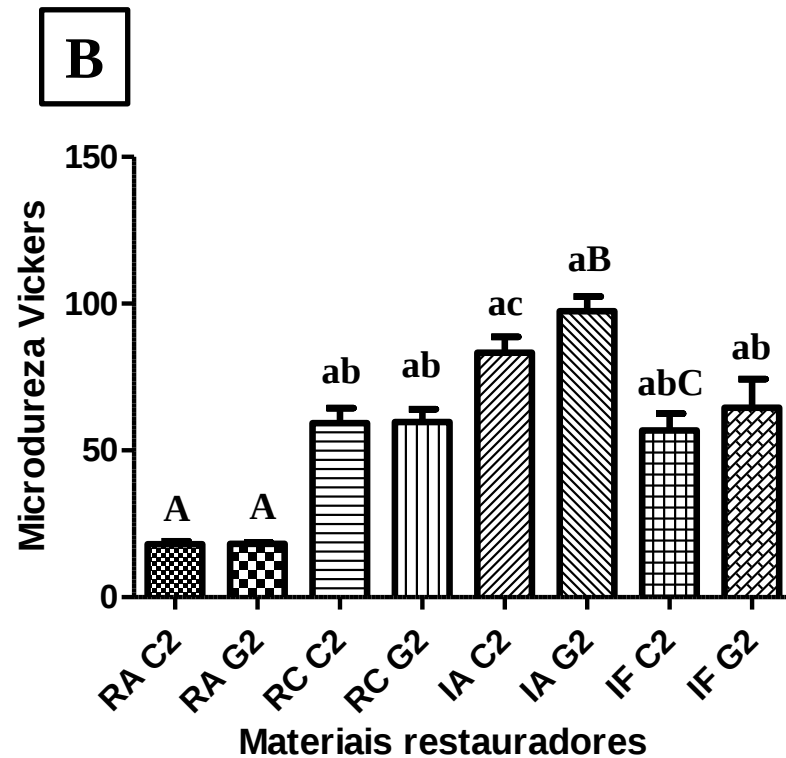


Figura 24: Representação da Microdureza Vickers de todos os grupos estudados.

Nota: No gráfico A os materiais do tempo 1 de armazenagem e gráfico B do tempo 24 horas de armazenagem.

As barras representam a média e as linhas acima das barras representam o erro padrão das médias, para análise de Microdureza Vickers, de acordo com o tipo de material restaurador e o tempo. RA – Resina Acrílica; RC – Resina Composta; IA – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; IF – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. G1 – grupo submetido formação de biofilme um ano de armazenamento em água destilada; G2 – grupo submetido a formação de biofilme 24 horas após confecção. Letras iguais acima dos materiais, minúsculas e maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.6 ÍNDICE DE ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS (IAES)

Todos os materiais testados apresentaram adesão de elementos sanguíneos nas suas superfícies.

O material que demonstrou maior adesão de elementos sanguíneos foi o Ionômero de Vidro Fotopolimerizável, enquanto que a menor adesão ocorreu na Resina Acrílica, de acordo com as médias apresentadas de cada material (Médias: IF= 1,47; IA= 1,27; RA= 1,13; RC= 1,40).

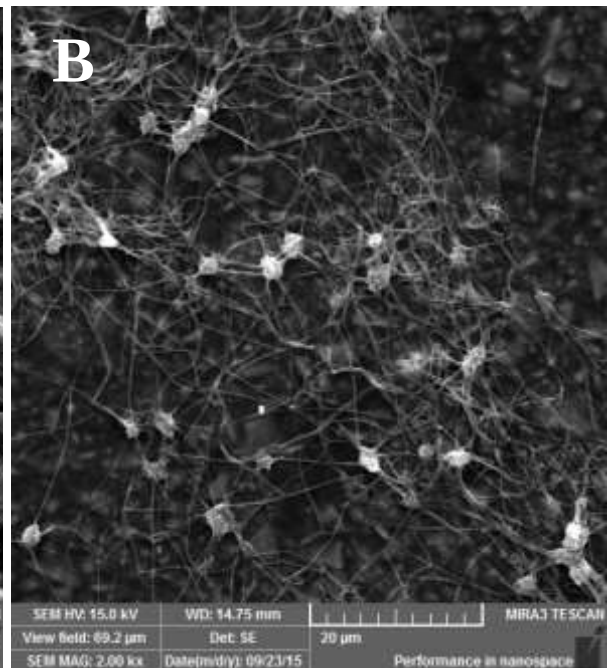
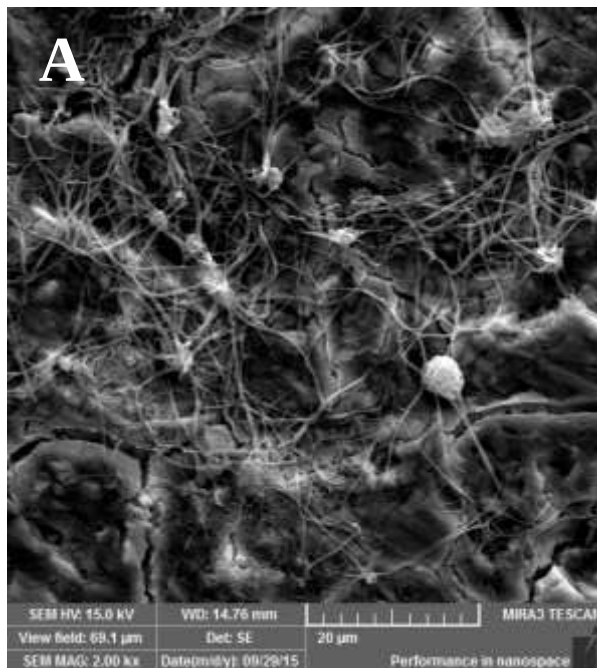
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais no Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos, as médias entre os materiais foram muito semelhantes.

O escore com maior frequência entre os materiais foi o escore 1 (71,7%), que indica escassa rede de fibrina e de células sanguíneas (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência do Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos nos grupos estudados (n=15 para cada material).

Escore	IA	IF	RA	RC
0	0	0	0	0
1	12	9	13	9
2	2	5	2	6
3	1	1	0	0

5.6.1 MEV-FEG – ADESÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS



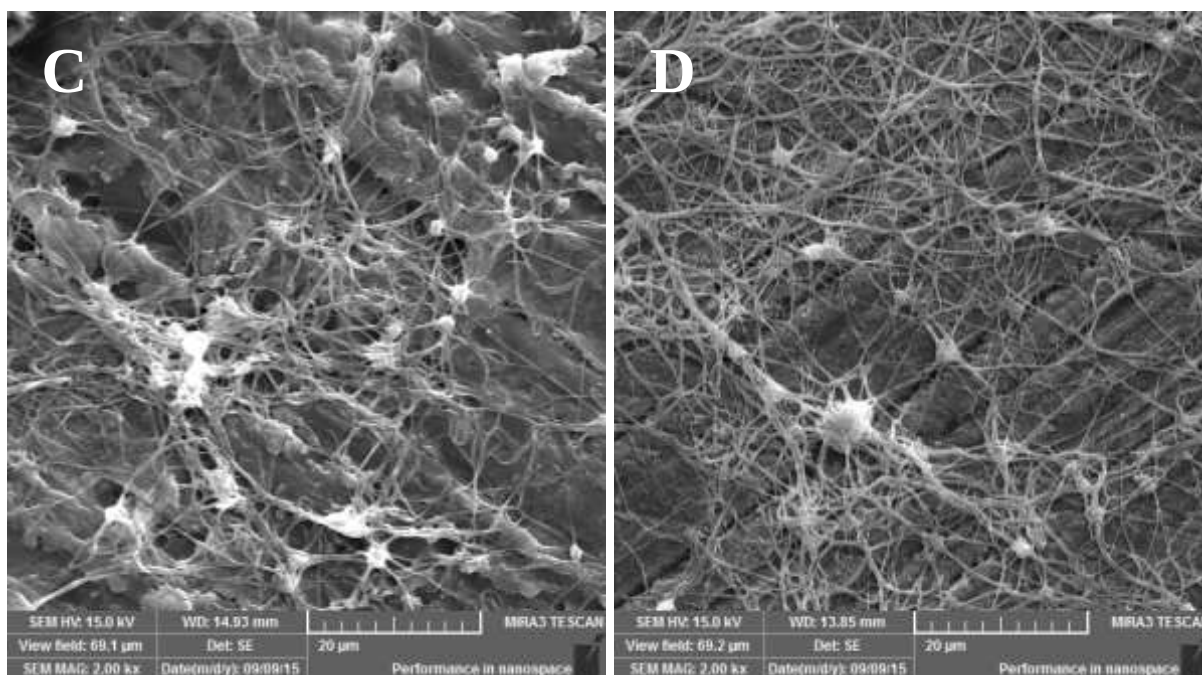
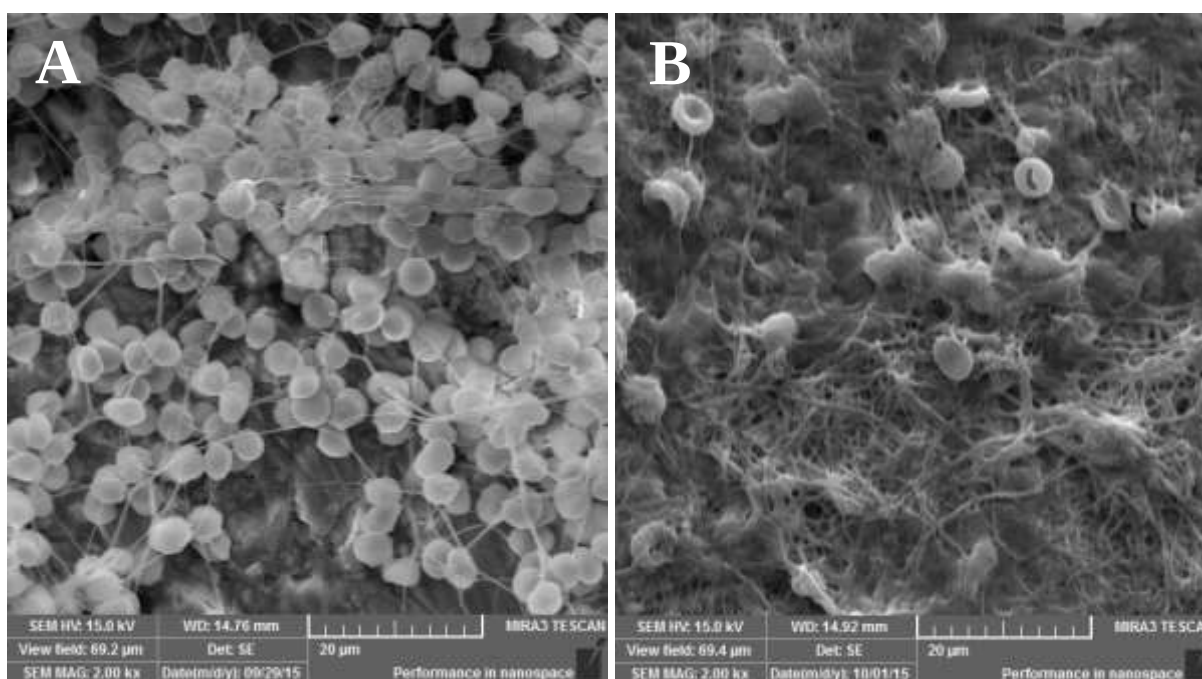


Figura 25: Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) da Adesão de Elementos Sanguíneos nos quatro materiais testados.

Nota: Imagens com aumento de 2000x. A – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; B – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável; C – Resina Acrílica; D – Resina Composta.



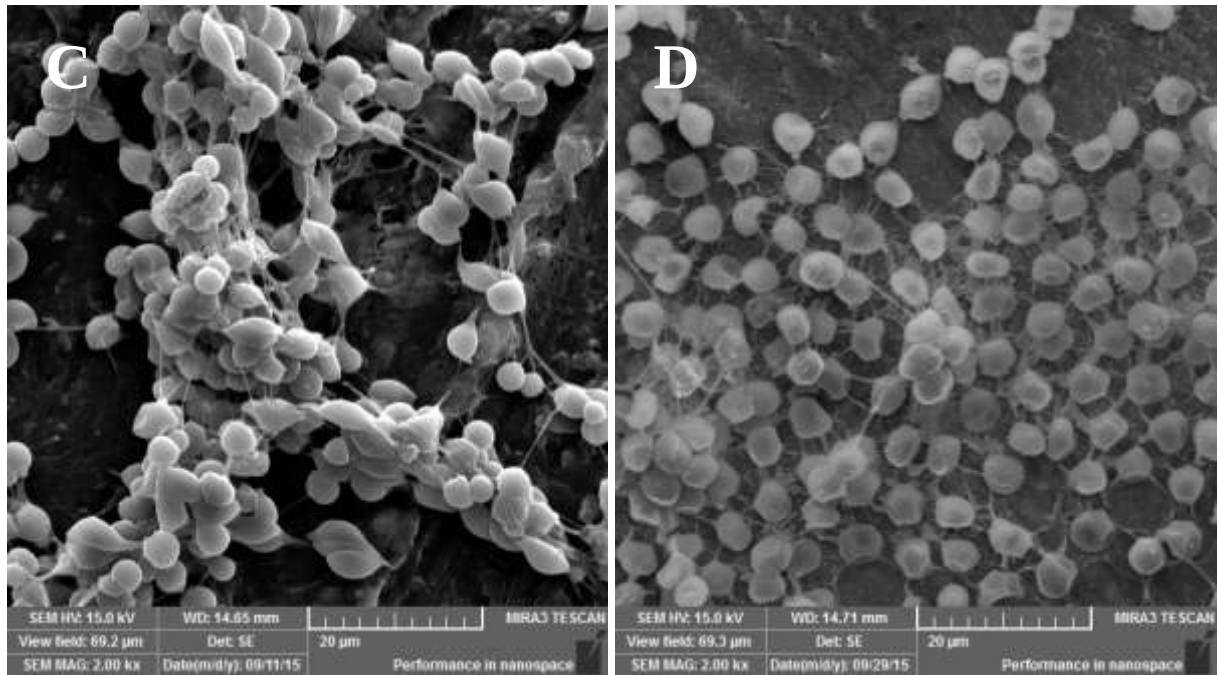


Figura 26: Representação ilustrativa da Microscopia Eletrônica de Varredura da Adesão de Componentes sanguíneos dos materiais testados.

Nota: Imagens com aumento de 2000x. A – Ionômero de Vidro Autopolimerizável; B – Ionômero de Vidro Fotopolimerizável; C – Resina Acrílica; D – Resina Composta. É possível notar a presença de plaquetas em algumas amostras de cada material.

5.7 CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS

Para verificar correlação entre as variáveis do estudo, entre as características superficiais e a formação de biofilme foi aplicado um teste estatístico de Correlação.

Na análise entre as variáveis Rugosidade – Ra e Contagem UFC/mL não foi observada correlação (Figura 27). Entretanto na análise das variáveis Microdureza Vickers e Contagem/mL houve correlação estatisticamente significativa (Figura 28).

Foi realizada ainda, uma análise entre Rugosidade – Ra e Microdureza Vickers, para avaliar possível correlação entre as próprias características dos materiais (Figura 29). Não foi identificada correlação estatisticamente significativa entre as duas propriedades.

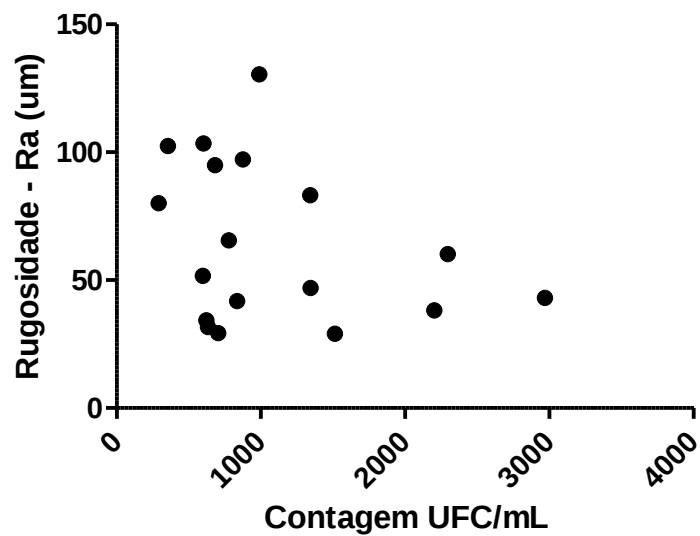


Figura 27: Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Rugosidade – Ra e Contagem UFC/mL.

Nota: Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p=0,3155$). Valor de $p<0,05$ considerada diferença estatisticamente significativa.

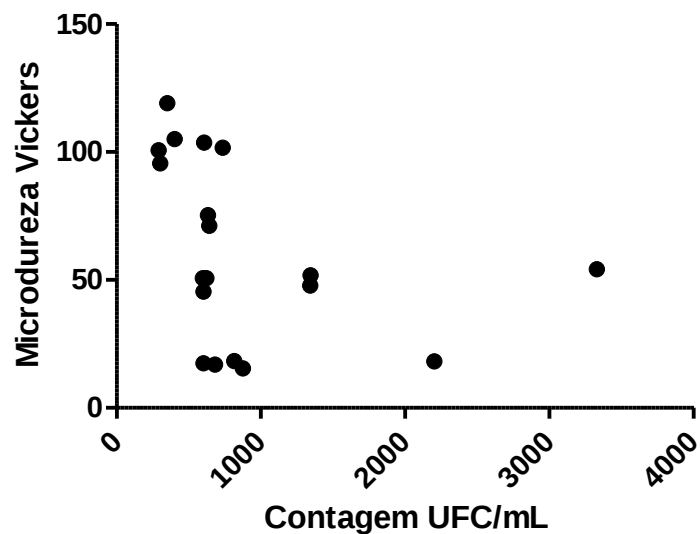


Figura 28: Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Microdureza Vickers e Contagem UFC/mL.

Nota: Foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p=0,0380$). Valor de $p<0,05$ considerada diferença estatisticamente significativa.

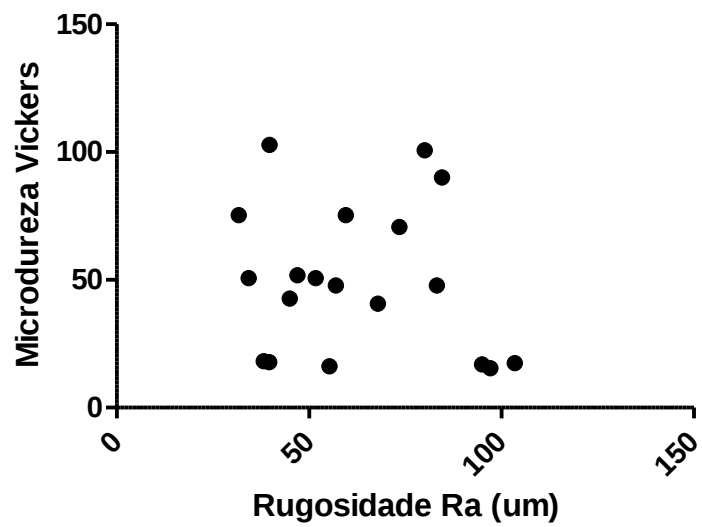


Figura 29: Representação da análise de Correlação entre as variáveis testadas Microdureza Vickers e Rugosidade - Ra.

Nota: Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p=0,5164$). Valor de $p<0,05$ considerada diferença estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

A complexa relação entre os microrganismos presentes na cavidade bucal e sua aderência nos diferentes tipos de superfície tem sido associada a variados processos infecciosos e inflamatórios, tanto em tecidos moles quanto duros (Rashid⁹¹ 2014).

O mecanismo de formação de biofilme inicial possibilita um ambiente propício a fixação e crescimento de diversas espécies consideradas patogênicas, as quais possuem fatores de virulência. Essa comunidade bacteriana, denominada biofilme, é o fator etiológico primário ligado a destruição dos tecidos periodontais (Rabe et al.⁴ 2015).

Como descrito, essa característica patogênica marcada pela liberação de fatores de virulência e toxinas pode desencadear respostas do hospedeiro ou destruir diretamente os tecidos adjacentes. Um dos fatores de virulência mais extensivamente utilizado nas pesquisas é o lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria *Escherichia coli* (Nelson et al.⁵⁴ 1997). O LPS está fortemente relacionado a alterações celulares e moleculares na doença periodontal. Segundo achados na pesquisa clínica de Santos et al.⁴⁹ (2002), microrganismos da família das Enterobactérias, como a *E. coli*, podem estar presentes na cavidade bucal, inclusive em bolsas periodontais, sendo que neste último apresenta-se em número aproximado de 15%. Este microrganismo tem sido altamente relacionado com pacientes debilitados que necessitam de tratamentos a longo prazo com medicamentos como antibióticos ou citotóxicos (Slots, Rams, Listgarten⁵¹ 1988, Conti et al.⁵² 2009). Com isso, essa bactéria foi escolhida para o presente estudo, pois o avanço nas pesquisas demonstra um grande interesse na descoberta de novas espécies bacterianas presentes na cavidade bucal, como a *E. coli*, que podem estar relacionadas a processos patológicos, como a doença periodontal.

Existem diversos métodos para identificação, caracterização e análise dos microrganismos e sua aderência nas superfícies, porém em razão de suas limitações e da diversidade são considerados de difícil comparação. Neste estudo foi utilizado o método de contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro e para observação fotomicroscópica a Microscopia Eletrônica de Varredura com fonte de emissão de campo, para comparação quantitativa e qualitativa, respectivamente, da formação de biofilme de *Escherichia coli* nos materiais estudados. Esta análise de

UFC/mL é classicamente utilizada na Microbiologia e tem sido descrita em vários estudos (Castilho et al.⁹² 2012, Park et al.⁸⁷ 2012, Li et al.⁹³ 2014). Embora mais trabalhosa e demorada, ela enumera e fornece diretamente a quantidade celular sem ser afetada pelo estado metabólico das células como, por exemplo, no caso do ensaio de XTT (Pellizzaro et al.⁹⁴ 2012, Zamperini et al.⁹⁵ 2013).

A análise por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura tem sido descrita como padrão ouro para visualização de microrganismos aderidos a superfícies, enquanto que a Microscopia Eletrônica de Transmissão é considerada padrão ouro para observação e análise da estrutura da película adquirida (Al-Ahmad et al.⁹⁶ 2009, Feng et al.⁶⁹ 2015).

Os dados obtidos neste estudo quanto a contagem de UFC/mL indicam que a maior formação de biofilme foi encontrada na Resina Acrílica, quando armazenada durante um ano em água destilada. Enquanto que para o grupo armazenado durante 24 horas a maior formação de biofilme foi observada no Ionômero de Vidro Fotopolimerizável, pode-se sugerir que deve-se ao fato da maior quantidade de irregularidades de superfície na análise por Microscopia de Força Atômica, que apesar de não ter sido estatisticamente significativa, foi maior com relação aos outros grupos testados 24 horas após confecção. Nos dois tempos estudados o material que apresentou menor formação de biofilme em sua superfície foi o Ionômero de Vidro Autopolimerizável, podendo estar relacionado com o fato do selamento para proteção superficial deste material com vaselina sólida logo após sua confecção, o que pode ter se tornado uma barreira superficial, tornando a superfície com menor quantidade de irregularidades e porosidades. Essa barreira mecânica reduz a absorção de água e solubilidade dos componentes químicos do material restaurador, o que estaria associado a degradação e a perda de propriedades (Izumida⁹⁷ 2013). Uma possível explicação seria de que esse selamento superficial pode estar associado com a diminuição na formação de biofilme. Além do fato de que no presente estudo não foram realizadas as medições de rugosidade superficial e microdureza Vickers anteriormente a aplicação da vaselina para comparação.

As características das superfícies em que ocorre a formação de biofilme podem interferir no crescimento e composição da comunidade bacteriana, porém a exata compreensão do efeito das propriedades superficiais de materiais presentes na cavidade bucal sobre o mecanismo de formação de biofilme ainda é pouco

compreendido. Com isso, as características dos materiais restauradores analisadas nesse estudo foram escolhidas com base em estudos prévios a fim de relacionar algumas das principais características superficiais com a formação de biofilme, dentre elas a rugosidade de superfície e a microdureza (Henriques, Azeredo, Oliveira⁹⁸ 2004, Lazarin et al⁹⁹ 2012, Erdemir et al¹⁰⁰ 2013, Leal et al¹⁰¹ 2015).

Para medição da rugosidade superficial podem ser utilizados diversos aparelhos como perfilômetro, rugosímetro, microscópios, entre outros (Sasaki et al.⁸⁶ 2000, Maganur et al¹⁰² 2015). Para o presente estudo determinou-se a utilização do Microscópio de Força Atômica. O MFA foi escolhido por permitir, além dos valores precisos da rugosidade superficial, também imagens tridimensionais da topografia de superfície dos materiais (Kakaboura et al¹⁰³ 2007). O modo intermitente escolhido foi utilizado por se tratar do mais indicado para materiais sólidos, polímeros e materiais biológicos, nos quais a ponta utilizada não altera a superfície do material e não necessita de procedimentos de preparação da amostra.

Os parâmetros Ra e Rz foram escolhidos com intuito de comparação com resultados dos demais estudos, nos quais esta medida foi empregada para análise (Sasaki et al.⁸⁶ 2000, Nagem-Filho et al.¹⁰⁴ 2003, Vieira et al.¹⁰⁵ 2014). O valor do parâmetro vertical Ra, expresso pelo AFM em nanômetros e micrômetros, traduz a média aritmética das distâncias absolutas de perfil de rugosidade da superfície, ou seja, entre os picos e vales registrados. O parâmetro Rz indica, de acordo com a norma ISO 4287, a distância média entre os 5 vales mais profundos e os 5 picos mais altos dentro do perfil.

O material com maior rugosidade superficial foi a Resina Acrílica submetida a formação de biofilme após 24 horas de confecção, enquanto que o material menos rugoso foi a Resina Composta em ambos tempos estudados. Apesar de a maior rugosidade ter sido encontrada na Resina Acrílica, o valor máximo do Ra para Resina Acrílica neste estudo permaneceu entre 0.10 e 0.15 (μm), valor muito próximo do estudo de Izumida⁹⁷ (2013) em que foi comparada uma superfície extremamente lisa e polida com valor de Ra de 0.17 com uma superfície rugosa com média de 3,45. Isso sugere que mesmo com a maior média, a Resina Acrílica deste estudo apresentou uma superfície lisa e polida. Outra característica superficial que pode ter influência na formação de biofilme, porém não analisada neste estudo, é a porosidade. O estudo de Hiramatsu¹⁰⁶ (2009) demonstrou que a Resina Acrílica confeccionada em matriz de silicone possui alta porosidade, o que pode ser

indicativo de maior área de irregularidades para retenção bacteriana. Contudo, essa hipótese necessita de mais estudos para sua comprovação. Quanto aos baixos valores de rugosidade apresentados pela Resina Composta, este material quando comparado ao Cimento de Ionômero de Vidro, em diversos estudos também é relatada uma menor rugosidade superficial da Resina Composta que pode apresentar maior resistência ao desgaste e uma lisura superficial superior ao CIV (Silva, Zuanon⁷⁵ 2006, Braga et al.⁷⁸ 2010, Fatima et al.⁷³ 2013).

Verran e Maryan¹⁰⁷ (1997) sugerem que superfícies com rugosidades acima de 1,26 micrômetros podem ter uma maior adesão de microrganismos. A ausência de correlação significativa entre formação de biofilme e rugosidade superficial encontrada neste estudo também foi observada no estudo de Izumida¹⁰⁵ (2013) que revelou que superfícies lisas e rugosas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto a formação de biofilme. Esta observação quanto a rugosidade e a formação de biofilme agirem de maneira isolada foi relatada também em demais estudos (Poggio et al.⁸ 2009, Lima et al.⁶ 2009, Feng et al.⁶⁹ 2015). Em contrapartida, Ono et al.⁶³ (2007), Kantorski e Pagani⁶⁴ (2007) e Seabra et al.⁶⁵ (2011) são autores que observaram em seus estudos maior formação de biofilme em superfícies mais rugosas.

No estudo de Feng et al.⁶⁹ (2015) demonstrou valores de rugosidade superficial menores que 0.15 μ m para o Cimento de Ionômero de Vidro testado. Os autores relataram que os resultados de Ra inferiores a 0.2 μ m não apresentaram alterações estatisticamente significativas na formação de biofilme, sugerindo a ausência de relação da rugosidade superficial com formação de biofilme em materiais com valor de parâmetro Ra abaixo de 0.2.

A segunda característica analisada neste estudo foi a microdureza Vickers, que tem sido utilizada em diversos estudos que analisam características superficiais de materiais restauradores (Tuzuner, Ulusu¹⁰⁸ 2010, Leal et al.¹⁰⁰ 2015, Amin, Rehman, Abbas¹⁰⁹ 2015, Garcia-Contreras et al.¹¹⁰ 2015).

A microdureza é uma das propriedades mais importantes dos materiais dentários, porque está associada a forças compressivas, resistência a desafios ácidos e o grau de conversão de materiais resinosos. A diminuição na microdureza pode causar falhas nas restaurações (Fatima e Hussain¹¹¹ 2014, Hashemikamangar et al.¹¹² 2015).

O material que apresentou maior microdureza Vickers foi o Ionômero de Vidro

Autopolimerizável, em contrapartida a menor microdureza Vickers foi observada na Resina Acrílica. No artigo de HashemiKamangar et al¹¹² (2015), os autores discutem a relação entre a microdureza e o grau de conversão do material, além do tipo de carga presente na matriz. Isso sugere que um menor grau de conversão ocorrido na Resina Acrílica pode indicar menores valores de microdureza, enquanto que compostos a base de metacrilato, como o Cimento de Ionômero de Vidro, podem apresentar maior microdureza.

Os valores de microdureza encontrados neste estudo para Resina Acrílica assemelham-se aos resultados encontrados no estudo de Amin, Rehman e Abbas¹⁰⁹ (2015), em que foi observado um valor de microdureza média de aproximadamente 20, sendo este valor considerado baixo na comparação com os outros materiais testados.

A maior microdureza encontrada no presente estudo, observada no Cimento de Ionômero de Vidro autopolimerizável, também foi obtida no estudo de Bala et al¹¹³ (2012) em que os maiores valores de microdureza estavam associados ao Cimento de Ionômero de Vidro convencional, na comparação com Ionômeros de Vidro modificados com resina.

O presente estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa na microdureza na comparação entre os diferentes tempos e entre o grupo controle e experimental do mesmo material no armazenamento em água destilada, convergindo com os resultados do estudo de Hashemikamangar et al¹¹² (2015) e Fatima et al⁷³ (2013), nos quais o armazenamento também não alterou a microdureza dos materiais

Um fato interessante observado é que na análise em Espectrofotômetro os valores de leitura dos grupos Controle e Experimental foram semelhantes. Esse achado sugere que partículas do próprio material foram liberadas na solução PBS no momento da agitação vigorosa.

Os materiais restauradores testados permaneceram em água destilada durante os tempos analisados. A água destilada tem sido utilizada como controle em vários estudos que avaliam materiais dentários nos mais diversos tempos de armazenamento (Fatima et al.⁷³ 2013, Hashemikamangar et al.¹¹² 2015). Foi escolhido este meio de armazenamento neste estudo para análise comparativa entre as características superficiais dos materiais testados e a formação de biofilme sem interferência de fatores que poderiam atuar como variáveis e influenciar nas análises

testadas como, por exemplo, alterações no pH e composição. Outro meio utilizado em diversos estudos é a saliva, porém a literatura ainda apresenta claras divergências quanto a completa compreensão dos seus efeitos sobre a formação de biofilme nas pesquisas *in vitro*. Segundo estudo de Zamperini et al.⁹⁵ (2013), pode existir uma controvérsia pelo fato de que a saliva possui proteínas que podem atuar como receptores favorecendo a formação de biofilme, sendo ainda uma fonte de nutrientes e água, por outro lado pode também ser composta por anticorpos que teriam ação antimicrobiana e diminuiriam a colonização bacteriana. No estudo de Park, Periathamby, Loza¹¹⁴ (2003) os autores relatam que a divergência nos resultados encontrados, nas pesquisas que utilizam saliva como meio de armazenamento, pode estar relacionada as diferenças na sua obtenção e manipulação.

O controle do biofilme por parte do paciente, com orientação e motivação por parte do profissional, após a terapia periodontal, seja cirúrgica ou não, proporcionará uma superfície lisa e preparada para a fase de cicatrização dos tecidos adjacentes. A fase cirúrgica, em muitos casos, é associada com a fase restauradora para resolução do caso e restaurações nas regiões cervicais estão em associação direta com os tecidos periodontais (Martins et al.¹⁸ 2007).

A interação da cicatrização dos tecidos periodontais com a função e estética dentais, após restaurações subgengivais ou próximas as margens da gengiva, sem ocorrerem alterações prejudiciais, é um dilema rotineiramente encontrado na prática odontológica (Farias et al.¹² 2008).

O processo de cicatrização é bastante complexo, especialmente durante a formação inicial do coágulo, organização do tecido de granulação e deposição de fibras colágenas (Leite et al.¹⁷ 2005).

O método utilizado para avaliar a adesão sanguínea foi realizado por meio do Índice de Adesão de Componentes Sanguíneos (IAES), como base de comparação com os demais estudos que também avaliaram adesão de componentes sanguíneos (Leite et al.¹⁷ 2005, Tsurumaki et al.⁹⁰ 2013). Este método, também chamado de índice de Adesão de Componentes Sanguíneos, tem sido utilizado em diversos estudos que objetivam avaliar a presença ou ausência tanto de fibrina quanto de células presentes no sangue. Nestes estudos o aumento escolhido para avaliação também foi o de 2000x (Tsurumaki et al.¹¹⁵ 2011, Oliveira et al.¹¹⁶ 2012, Cekici et al.¹¹⁷ 2013).

A adesão de elementos sanguíneos realizada neste estudo demonstrou que os materiais restauradores comportaram-se de maneira bastante semelhante, sem apresentar diferença estatisticamente significativa. A maior adesão foi encontrada no Ionômero de Vidro Fotopolimerizável. O material que demonstrou menor adesão, de acordo com o IAES, foi a Resina Acrílica.

Foi encontrada rede de fibrina em todos os materiais, algumas amostras apresentaram distribuição de células vermelhas do sangue, plaquetas e leucócitos em sua superfície.

A literatura sobre essa relação dos materiais restauradores com a adesão de elementos sanguíneos ainda é bastante escassa, por esse motivo pesquisas futuras são extremamente necessárias para definir de maneira mais esclarecedora esse mecanismo, além do fato de existirem diversos materiais, cada um com características de superfície variadas.

Estudos que analisaram a adesão em superfícies de implante observaram a presença de plaquetas e fibrina, sugerindo que a agregação plaquetária ocorreu provavelmente pela interação de fibrinogênio e receptores do sistema complemento presentes nas plaquetas (Kanagajara et al.¹¹⁸ 1996, Park, Davies.⁸⁵ 2000). O estudo de Nygren, Eryksson e Lausmaa¹¹⁹ (1997) observou agregação plaquetária previamente a adesão de polimorfonucleares.

Mesmo nos estudos com adesão de elementos sanguíneos em superfícies dentais ainda existem controvérsias. No estudo de Cekici et al¹¹⁷ (2013), em que foram analisadas superfícies radiculares tratadas com EDTA, ácido cítrico e laser, no grupo controle tratado apenas com solução tampão fosfato não foi encontrada presença de rede de fibrina ou células sanguíneas, com todas as amostras testadas sendo representadas pelo escore 0. Enquanto que no estudo de Tsurumaki et al¹¹⁵ (2011) a superfície radicular não tratada (controle) apresentou escore 3, representando densa rede de fibrina com presença de células sanguíneas. A presença de fibras e células no grupo controle das amostras de superfície radicular também foi relatada no estudo de Oliveira et al¹¹⁶ (2012).

Com todas as limitações do presente estudo, são sugeridas novas pesquisas para complementar os resultados encontrados, com materiais restauradores, para compreender um assunto fundamental na prática clínica ligado a manutenção da saúde periodontal e o impacto da terapia restauradora.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A Resina Acrílica, bastante utilizada para procedimentos protéticos em regiões próximas aos tecidos periodontais, foi o material que apresentou diferença estatisticamente significativa com relação aos outros materiais, demonstrando maior formação de biofilme em sua superfície.
- O Ionômero de Vidro Autopolimerizável é o material com menor formação de biofilme em comparação com o Fotopolimerizável, com a Resina Composta e a Resina Acrílica.
- A rugosidade superficial dos materiais estudados agiu de maneira isolada sem influenciar na formação de biofilme.
- A microdureza e a formação de biofilme, determinada pela contagem de UFC/mL possuem uma relação inversamente proporcional, em que o material mais duro apresentou menor formação de biofilme.
- No tempo de 24 horas de armazenagem em água destilada os materiais não diferem estatisticamente quanto a contagem de UFC/mL.
- Todos os materiais testados são capazes de apresentar em suas superfícies a adesão de elementos sanguíneos, como fibrina e células.
- A formação de biofilme e a adesão de elementos sanguíneos são critérios importantes no momento da escolha de materiais para regiões próximas a margens da gengiva ou subgengivais e o operador deve conhecer as características superficiais e sua influência nos tecidos periodontais, para correta indicação.

REFERÊNCIAS

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet. 2005; 366: 1809-1820.
2. Zeng XT, Tu M-L, Liu D-Y, Zheng D, Zhang J, Leng W. Periodontal Disease and Risk of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Meta-Analysis of Observational Studies. PLoS One. 2012;7(10): e46508.
3. Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal Host Modulation with Antiproteinase, Anti-inflammatory, and Bone-Sparing Agents. A Systematic Review. Ann Periodontol. 2003; 8(1).
4. Rabe P, Twentman S, Kinnby B, Svensater G, Davier JR. Effect of fluoride and chlorhexidine and digluconate mouthrinses on plaque biofilms. The Open Dentistry Journal. 2015; 9:106-111.
5. Milleding P, Carlén A, Wennerberg A, Karlsson S. Protein characterisation of salivary and plasma biofilms formed in vitro non-corroded and corroded dental ceramic materials. Biomater. 2001; 22: 2545-2555.
6. Lima FG, Romano AR, Correa MB, Demarco FF. Influence of microleakage, surface roughness and biofilm control on secondary caries formation around composite resin restorations: an *in situ* evaluation. J Appl Oral Sci. 2009; 17(1): 61-65.
7. Ruttermann S, Bergmann N, Beikler T, Raab WHM, Janda R. Bacterial viability on surface-modified resin-based dental restorative materials. Arch Oral Biol. 2012; 57:1512-1521.
8. Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of Streptococcus mutans to diferente restorative materials. Int J of Artif Organs. 2009; 32(9): 671-677.
9. Schweikl H, Killer KA, Carl U, Schweiger R, Eidt A, Ruhl S, Muller R, Schmalz G. Salivary protein adsorption and Streptococcus gordonii adhesion to dental material surfaces. Dent Mater. 2013; 1080-1089.
10. Nunes MABC, Keller AP, Halla Jr R. Lesões cervicais não-cariosas associadas ao recobrimento radicular: quando restaurar?. R. Periodontia. 2010; 20(4): 20-29.

11. Dionysopoulos D, Papadopoulos C, Koliniotou-Koumpia E. The evaluation of various restoration techniques on internal adaptation of composites in Class V cavities. *Int J Biomater*. 2014; 6p.
12. Farias BC, Barros FC, Araújo ACS, Gusmão ES, Almeida ECB, Cimões R. Avaliação da condição periodontal adjacente a superfícies proximais restauradas em material resinoso, comparativamente a superfícies não restauradas. *RGO*. 2008; 56(3): 245-251.
13. Goiato MC, Rahal JS, Gennari Filho H, Fajardo RS, Gonçalves WA. Avaliação da alteração dimensional e porosidades em resinas acrílicas entre métodos de polimerização convencional e por micro-ondas. *R Fac Odontol*. 2000; 42(2): 37-40.
14. Martin MV, Dailey Y. A preliminary investigation of the microbiology and endotoxin content in the water reservoirs of benchtop non-vacuum autoclaves. *Br Dent J*. 2001; 191(11).
15. Khan AA, Siddiqui AZ, Al-Kheraif AA, Zahid A, Divakar DD. Effect of diferente pH solvents on micro-hardness and surface topography of dental nano-composite: An in vitro analysis. *Pak J Med Sci*. 2015; 31(4): 854-859.
16. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UME. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2006; 41: 30-47.
17. Leite FRM, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JEC. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Braz Oral Res*. 2005; 19(2): 88-92.
18. Martins TM, Bosco AF, Nóbrega FJO, Nagata MJH, Garcia VG, Fucini SE. Periodontal tissue response to coverage of root cavities restored with resin materials: a histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2007; 78(6): 1075-1082.
19. Guida B, Nasciben M, Carvalho E, Ribeiro EDP. Recobrimento radicular de recessões gengivais associadas a lesões cervicais não cariosas- revisão da literatura. *R Periodontia*. 2010; 20(2): 14-21.
20. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(4): 547-558.
21. Wolf HF, Hassell TM. Manual de Periodontia Fundamentos, diagnóstico, prevenção e tratamento. 1a ed. São Paulo: Artmed. 2006; p95.

22. Usher AKH, Stockley RA. The link between chronic periodontitis and COPD: a common role for the neutrophil?. *BMC Med.* 2013;11:241.
23. Bhuvaneswarri J, Gita B, Chandrasekaran SC. Detection of RANKL positive cells in gingival tissue in healthy and chronic periodontal disease patients – a comparative study. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(11): zc31-zc34.
24. Hanes PJ, Purvis JP. Local Anti-Infective Therapy: Pharmacological Agents. A Systematic Review. *Ann Periodontol.* 2003; 8(1).
25. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res.* 2011; 90(2): 143-153
26. Son A, Shin DM, Hong JH. Peptidoglycan induces the production of interleukin-8 via calcium signaling in human gingival epithelium. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2015; 19: 51-57.
27. Moosavijazi M, Ghahroudi AAR, Yaghobee S, Bayany M, Salehi E, Sadrimanesh R. Comparison of salivary epidermal growth factor levels in patients with gingivitis and advanced periodontitis and healthy subjects. *J Dent.* 2014; 11(5): 516-522.
28. Zhang L, Meng S, Tu Q, Yu L, Tang Y, Dard MM, Kim SH, Valverde P, Zhou X, Chen J. Adiponectin ameliorates experimental periodontitis in diet-induced obesity mice. *Plos One.* 2014; 9(5): e97824.
29. Khongkhunthian S, Kongtawelert P, Ongchai S, Pothacharoen P, Sastraruji T, Jotikasthira D, Krisanaprakornkit S. Comparisons between two biochemical markers in evaluating periodontal disease severity: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2014; 14: 107.
30. Surlin P, Oprea B, Solomon SM, Popa SG, Mota M, Mateescu GO, Rauten AM, Popescu DM, Dragomir LP, Puiu I, Bogdan M, Popescu MR. Matrix metalloproteinase -7, -8, -9 and -13 in gingival tissue of patients with type 1 diabetes and periodontitis. *Rom J Morphol Embryol.* 2014; 55(3): 1137-1141.

31. Carvalho RCC, Leite SAM, Duarte KMMD, Bastos MG, Alves CMC, Benatti BB, Pereira ALA. Relação entre doença periodontal e anemia. *Braz J Periodontol.* 2014; 24(1): 48-53.
32. Zare D, Haerian A, Molla E, Vaziri F. Evaluation of the effects of diode (980nm) laser on gingival inflammation after nonsurgical periodontal therapy. *J Lasers Med Sci.* 2014; 5(1): 27-31.
33. Yao W, Xu P, Pang Z, Zhao J, Chai Z, Li X, Li H, Jiang M, Cheng H, Zhang B, Cheng N. Local delivery of minocycline-loaded PEG-PLA nanoparticles for the enhanced treatment of periodontitis in dogs. *Int J Nanomedicine.* 2014;18(9): 3963-3970.
34. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog.* 2001; 84(3): p235.
35. Eto FS, Raslan AS, Cortelli JR. Características microbianas na saúde e doença periodontal. *Rev Biocienc Taubaté.* 2003; 9(2): 45-51.
36. Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R. Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man: A Light and Electron Microscopic Study. *J Periodontol.* 1975; 46(1): 10-26.
37. Khuller N. The biofilm concept and its role in prevention of periodontal disease. *Rev Clin Pesq Odontol.* 2009; 5(1): 53-57.
38. Oppermann RV, Rosing CK. *Periodontia Laboratorial e Clínica.* 1a ed. São Paulo: Artes Médicas. 2013; p12.
39. Teughels W, Assche NV, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Imp Res.* 2006; 17(2): 68-81.
40. Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia.* 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997; p.278.
41. Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12(4): 256-266.

42. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-144.
43. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 263-271.
44. Rosier BT, Jager MD, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Front Cell and Infect Microbiol*. 2014; 4(92).
45. Curtis MA, Zenobia C, Darveu RP. The relationship on the oral microbiotia to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe*. 2011; 10: 302-306.
46. Kawai K, Urano M. Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent*. 2001; 26: 396-400.
47. Wang S, Guo L, Seneviratne CJ, Huang B, Han J, Peng L, Liu X, Zhang C. Biofilm formation of salivary microbiota on dental restorative materials analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Dent Mater J*. 2014; 33(3): 325-331.
48. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003; 8(1): 182-192.
49. Santos SSF, Loberto JCS, Martins CAP, Jorge AOC. Prevalência e sensibilidade in vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. *Pós-Grad Rev Odontol*. 2002; 5(2).
50. Sedgley CM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese. *Arch Oral Biol*. 1994; 39(6): 459-466.
51. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988; 3: 47-52.

52. Conti S, Santos SSF, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Enterobacteriaceae and pseudomonadaceae on the dorsum of the human tongue. J Appl Oral Sci. 2009; 17(5): 375-380.
53. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1990; 5: 149-154.
54. Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. J Prosthet Dent. 1997; 77(1): 76-82.
55. Leenstra TS, Saene JJM, Saene HKF, Martin MV. Oral endotoxin in healthy adults. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1996; 82(6): 637- 643.
56. Izquierdo M, Alvestegui A, Nataro JP, Ruiz-Perez F, Farfan MJ. Participation of integrin $\alpha 5\beta 1$ in the fibronectin-mediated adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. BioMed Res Int. 2014: 8p.
57. Ebersole JL, Stevens J, Steffen J, Dawson III D, Novak MJ. Systemic endotoxin levels in chronic indolent periodontal infections. J Periodontal Res. 2010; 45(1): 1-7.
58. Song F, Koo H, Ren D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. J Dent Res. 2015; 94(8): 1027-1034.
59. Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, Reilly C, Fok AS, Aparicio C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. J Appl Microbiol. 2012; 113(6): 1540-1553.
60. Reeves WG. Restorative margin placement and periodontal health. J Prosthet Dent. 1991; 66(6): 733-736.
61. Gyo M, Nikaido T, Okada K, Yamauchi J, Tagami J, Matin K. Surface response of fluorine polymer-incorporated resin composites to cariogenic biofilm adherence. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(5): 1428-1435.
62. Carlén A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. Biomater. 2001; 22: 481-487.

63. Ono M, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J, Matin K. Surface properties of resin composite materials relative to biofilm formation. *Dent Mater J*. 2007; 26(5): 613-622.
64. Kantorski KZ, Pagani C. Influência da rugosidade superficial dos materiais odontológicos na adesão bacteriana: revisão da literatura. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2007; 19(3): 325-330.
65. Seabra EJJ, Lima IPC, Matsuno PM, Paiva ACS. Rugosidade superficial da resina acrílica frente a quatro diferentes técnicas de polimento. *Rev Gaúcha Odontol*. 2011; 59(1): 45-50.
66. Abboud NS, Coelho-de-Souza FH, Klein-Jr CA, Campos LM, Demarco FF, Camacho GB. Inflamação gengival em relação ao acabamento de restaurações de Classe V. *Rev Odonto Cienc*. 2008; 23(1): 40-43.
67. Montanaro L, Campocia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, Arciola CR. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomater*. 2004; 25: 4457-4463.
68. Steinberg D, Mor C, Dogan H, Zacks B, Rotstein I. Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material. *Dent Mater*. 1999; 15: 14-20.
69. Feng J, Cheng L, Zhou X, Xub HHK, Weir MD, Meyer M, Maurer H, Li Q, Hannig M, Rupf S. In situ antibiofilm effect of glass-ionomer cement containing dimethylaminododecylmethacrylate. *Dent Mater*. 2015; 31: 992-1002.
70. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997; 13: 258-269.
71. Suljak JP, Reidt G, Wood SM, McConnell HC, Meis HC, Busscherts HJ. Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. *J Dent*. 1995; 23(3): 171-176.

72. Sarac D, Sarac YS, Kulunk S, Ural C, Kulunk T. The effect of polishing techniques on the surface roughness and color change of composite resins. *J Prosthet Dent*. 2006; 96(1): 33-40.
73. Fatima N, Abidi SYA, Qazi FUR, Jat SA. Effect of different tetra pack juices on microhardness of direct tooth colored-restorative materials. *Saudi Dent J*. 2013; 25: 29-32.
74. Leite EL, Presotto NR, Bassi JC, Alves FBT, Wambier DS. Avaliação in vitro da liberação e da recarga de flúor em cimentos de ionômero de vidro. *Rev Odontol UNESP*. 2013; 42(1):25-30.
75. Silva RC, Zuanon ACC. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). *Braz Dent J*. 2006; 17(2): 106-109.
76. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(1): 99-116.
77. Yanikoglu N, Duymus ZY, Yilmaz B. Effect of different solutions on the surface hardness of composite resin materials. *Dent Mater J*. 2009; 28(3): 344-351.
78. Braga SEM, Garone Netto N, Soler JMP, Sobral MAP. Degradação dos materiais restauradores utilizados em lesões cervicais não cariosas. *Rev Gaúcha Odontol*. 2010; 58(4): 431-436.
79. Munchow EA, Ferreira ACA, Machado RMM, Ramos TS, Rodrigues-Jr SA, Zanchi CH. Effect of acidic solutions on the surface degradation of a micro-hybrid composite resin. *Braz Dent J*. 2014; 25(4): 321-326.
80. Dantas AAR, Fontanari LA, Ishi EP, Leite FRM, Zandim DL, Rached RSGA, Sampaio JEC. Blood cells attachment after root conditioning and PRP application: an *in vitro* study. *J Contemp Dent Pract*. 2012; 13(3): 332-338.
81. Illueca FMA, Vera PB, Cabanilles PG, Fernandez VF, Loscos FJG. Periodontal regeneration in clinical practice. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11: e382-392.

82. Oda JY, Carvalho J. Cicatrização do periodonto: revisão. Arq Cienc Saúde Unipar. 2004; 8(2): 159-172.
83. Preeja C, Janam P, Nayar BR. Fibrin clot adhesion to root surface treated with tetracycline hydrochloride and ethylenediaminetetraacetic acid: A scanning electron microscopic study. Dent Res J. 2013; 10(3): 382-388.
84. Dragoo MR. Resin-ionomer and hybrid ionomer cements: part II. Human clinical and histologic wound healing responses in specific periodontal lesions. Int J Periodontics Restorative Dent. 1997; 17(1): 75-87.
85. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Impl Res. 2000; 11: 530-539.
86. Sasaki MT, Silva, RCSP, Araújo MAM, Krabbe DFE, Damião AJ. Avaliação da rugosidade superficial de Cimentos de Ionômero de Vidro submetidos a diferentes sistemas de acabamento e polimento. Rev Odontol UNESP. 2000; 29(1/2): 81-92.
87. Park JW, Song CW, Jung JH, Ahn SJ, Ferracane JL. The effects of surface roughness of composite resin on biofilm of *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Oper Dent. 2012; 37(5): 532-539.
88. Beyth N, Bahir R, Matalon S, Domb AJ, Weiss EI. *Streptococcus mutans* biofilm change surface-topography of resin composites. Dent Mater. 2008; 24: 732-736.
89. Arroyo E, Enriquez L, Sanchez A, Ovalle M, Olivas A. Scanning Electron Microscopy of bacteria *Tetrasphaera duodecadis*. Scanning. 2014; 36:547-550.
90. Tsurumaki JN, Souto BHM, Oliveira GJPL, Sampaio JEC, Marcantonio RAC. Morphology and adhesion on blood components in root surfaces treated by a piezoelectric ultrasonic: an *in vitro* study. Rev Gaucha Odontol. 2013; 61(2): 169-175.
91. Rashid H. The effect of surface roughness on ceramics used in dentistry: a review of literature. Eur J Dent. 2014; 8(4): 571-579.
92. Castilho ARF, Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Paula AB, Sacramento PA, Costa CAS, Spolidorio DMP, Puppim-Rontani RM. Mechanical and biological

characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. Arch Oral Biol. 2012; 57: 131-138.

93. Li F, Weir MD, Fouad AF, Xu HHK. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque micocosm biofilm model. Dent Mater. 2014; 30: 182-191.

94. Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* *Candida albicans* biofilm viability. Braz Dent J. 2012; 23(5) 547-554.

95. Zamperini CA, Schiavinato PCS, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL. Effect of human whole saliva on the *in vitro* adhesion of a *Candida albicans* to a denture base acrylic resin: a focus on collection and preparation of saliva samples. J Investig Clin. 2013; 4: 225-228.

96. Al-Ahmad A, Follo M, Selzer AC, Hellwig E, Hannig M, Hannig C. Bacterial colonization of enamel *in situ* investigated using fluorescence *in situ* hybridization. J Med Microbiol. 2009; 58: 1359-1366.

97. Izumida FE. Efetividade de vernizes fotopolimerizáveis experimentais na adesão e formação de biofilme multiespécies e sua associação com a escovação na remoção e recolonização do biofilme em uma resina acrílica para base de prótese [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2013.

98. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. Colloid Surface B. 2004; 33: 235-241.

99. Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolimerised coatings: an *in vitro* study. Gerodontology. 2014; 31: 25-33.

100. Erdemir U, Yildiz E, Eren MM, Ozel S. Surface hardness evaluation of different composite resin materials: influence of sports and energy drinks immersion after a short-term period. J Appl Oral Sci. 2013; 21(2): 124-131.

101. Leal A, Paula A, Ramalho A, Esteves M, Ferreira MM, Carrilho E. Roughness and microhardness of composites after different bleaching techniques. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2015; 13(4): e381-e388.
102. Maganur P, Satish V, Prabakhar AR, Namineni S. Effect of soft drinks and fresh fruit juice on surface roughness of commonly used restorative materials. *J Clin Pediatr Dent*. 2015; 8(1): 1-5.
103. Kakaboura A, Fragouli M, Rahiotis C, Silikas N. Evaluation of surfaces characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007; 18: 155-163.
104. Nagem Filho H, D'azavedo MTF, Nagem HD, Marsola FP. Surface roughness of composite resins after finishing and polishing. *Braz Dent J*. 2003; 14(1): 37-41.
105. Vieira AC, Oliveira MCS, Araujo CP, Farias IMAO, Pereira IFS, Leite MF. Avaliação da rugosidade superficial de diferentes resinas compostas após a realização do acabamento e polimento. *Full Dent Sci*. 2014; 5(20): 609-614.
106. Hiramatsu DA. Propriedades físicas da resina acrílica para coroas provisórias em função de diferentes técnicas de polimerização (rugosidade, porosidade, microdureza, sorção e solubilidade) [Dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2009.
107. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicon of different surface topography. *J Prosthet Dent*. 1997; 77(5): 535-539.
108. Tuzuner T, Ulusu T. Effect of antibacterial agents on the surface hardness of a conventional glass-ionomer cement. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(1): 45-49.
109. Amin F, Rehman A, Abbas M. Microhardness of heat cure acrylic resin after treatment with disinfectants. *J Pak Med Assoc*. 2015; 65(8): 834-837.
110. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Sakagami H, Morales-Luckie RA, Nakajima H. Mechanical, antibacterial and bond strength properties of nano-titanium-enriched glass ionomer cement. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(3): 321-328.

111. Fatima N, Hussain M. Effect of two different commonly available energy drinks on surface micro hardness of tooth color restorative materials. J Res Dent. 2014; 2(3): 269-276.
112. HashemiKamangar SS, Ghavam M, Mirkhezri Z, Karazifard MJ. Comparison of the effects of two different drinks on microhardness of a silorane-based composite resin. J Dent Shiraz Univ Med Sci. 2015; 16(3): 260-266.
113. Bala O, Arisu HD, Yikilgan I, Arslan S, Gullu A. Evaluation of surfasse roughness and hardness of different glass ionomer cements. Eur J Dent. 2012; 6: 79-86
114. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surfasse-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. J Prosthodont. 2003; 12(4): 249-254.
115. Tsurumaki JN, Souto BHM, Oliveira GJPL, Sampaio JEC, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC. Effect of instrumentation using curettes piezoelectric ultrasonic scaler and Er, Cr:YSGG laser on the morphology and adhesion of blood components on root surfasse – a SEM study. Braz Dent J. 2011; 22(3): 185-192.
116. Oliveira GJPL, Theodoro LH, Marcantonio Junior E, Sampaio JEC, Marcantonio RAC. Braz Oral Res. 2012; 26(3): 256-262.
117. Cekici A, Maden I, Yildiz S, San T, Isik G. Evaluation of blood cell attachment on Er: Yag laser applied root surfasse using scanning electron microscopy. Int J Med Sci. 2013; 10: 560-566.
118. Kanagaraja S, Lundstrom I, Nygren H, Tengvall P. Platelet binding and protein adsorption to titanium and gold after short time exposure to heparinized plasma and whole blood. Biomater. 1996; 17(23): 2225-2232.
119. Nygren H, Eriksson C, Lausmaa J. Adhesion and activation of platelets and polymorphonuclear granulocyte cells at TiO₂ surfaces. J Lab Clin Med. 1997; 129(1): 35-46.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Adesão de componentes sanguíneos em materiais odontológicos. Estudo in vitro.

Pesquisador: Shelon Cristina Souza Pinto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46881915.6.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.302.601

Apresentação do Projeto:

O impacto dos procedimentos restauradores na saúde periodontal tem sido alvo de pesquisas desde muito tempo. A escolha do material para procedimentos restauradores e protéticos em regiões subgengivais ou próximas as margens da gengiva deve considerar a capacidade de adesão dos componentes sanguíneos, principais responsáveis pelo início da cicatrização dos tecidos periodontais. Serão avaliados os seguintes materiais odontológicos: Resina Acrílica (RA) (n=10); Resina Composta (RC) (n=10); Cimento de Ionômero de Vidro utopolimerizável (n=10); Cimento de Ionômero de vidro Fotopolimerizável (n=10). Caracterização inicial: Microdureza Vickers (MV), Microscopia de força atômica (rugosidade superficial)(MFA), Microscopia Eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG). Os espécimes serão submetidos a adesão dos componentes sanguíneos. Novas avaliações: MV; MFA; MEV-FEG análise fotográfica: as fotos serão analisadas por 1 examinador calibrado, experiente e "cego" quanto a identificação dos espécimes, o qual realizará a descrição morfológica da superfície ("Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos"). Análise estatística: os dados serão expressos como média $\pm$ S.D. para o número de amostras indicadas. A significância estatística entre os grupos será analisada por ANOVA de uma via, seguido por teste de post-hoc Bonferroni. Para todos os testes, $p < 0,05$ será considerado significativo.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.302.601

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

: Avaliar a adesão dos componentes sanguíneos em diferentes materiais odontológicos utilizados para procedimentos próximos a margem da gengiva ou subgengivalmente.

Objetivo Secundário:

- Comparar a adesão dos componentes sanguíneos entre resina composta, resina acrílica, cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável e ionômero de vidro convencional.
- Observar se a rugosidade superficial e microdureza dos materiais odontológicos irão alterar a adesão dos componentes sanguíneos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos serão controlados. Portanto, todas as medidas de biossegurança serão seguidas pelos pesquisadores e também equipe altamente preparada será responsável pela coleta do sangue do pesquisador para a realização da adesão de elementos sanguíneos.

Benefícios:

A possibilidade de se identificar o mecanismo inicial de cicatrização relacionado com materiais dentários, permitindo pesquisas futuras em humanos e aumentando o conhecimento na prática clínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto já havia sido aprovado, somente inclusão de Emenda: Inclusão de grupo controle para análise da adesão sanguínea em dentina serão utilizados 5 dentes que serão obtidos junto ao Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os dentes serão seccionados com disco diamantado para obtenção de 3 espécimes de cada dente (2x2mm) na região cervical (totalizando 15 amostras). Após a obtenção dos espécimes será realizada a aplicação de sangue de acordo com a metodologia descrita.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE de acordo, bem escrito.

Folha de rosto completa.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.302.601

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de parecer favorável à execução da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_605427_E1.pdf	08/10/2015 10:53:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProtocolodePesquisaEmenda.doc	08/10/2015 10:50:52	Evelyn Lopez Leite	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO-1.pdf	06/07/2015 11:59:26		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-CORRETO.docx	02/07/2015 13:53:43		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 29 de Outubro de 2015

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvararanas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br



Universidade Estadual de Ponta Grossa

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Av.: Gen. Carlos Cavalcanti, 4748 CEP: 84030-900 Bloco M, Sala 100

Campus Uvaranas Ponta Grossa Fone: (42) 3220.3108 e-mail: seccoep@uegp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você Shelon Cristina Souza Bandeca, está sendo

convidado a participar da pesquisa Adesão de componentes sanguíneos em diferentes materiais odontológicos. Estudo in vitro. Tendo como pesquisador responsável **Shelon Cristina Souza Bandeca** e como pesquisadora participante **Evelyn Lopez Leite** da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O objetivo da pesquisa é Avaliar a adesão de componentes sanguíneos em diferentes materiais odontológicos utilizados para procedimentos próximos a margem gengival ou subgengivalmente. A sua participação no estudo será de fornecer sangue para o teste de componentes sanguíneos em materiais odontológicos. O trabalho a ser realizado tem caráter científico, tendo por finalidade a tentativa de se descobrir uma técnica nova para adesão de células do seu sangue sobre materiais odontológicos. Ao participar desse trabalho, você estará contribuindo para a tentativa de melhorar a recuperação do tecido gengival nos vários procedimentos realizados com materiais odontológicos. Você irá doar o que exceder desses 5mL de tecido sanguíneo a serem retirados, após a realização dos exames laboratoriais, sendo estes hemograma e coagulograma, para aplicação sobre as amostras de materiais. Os resultados desses exames poderão ser divulgados quando da publicação deste trabalho, mas você tem garantida a preservação da sua identidade. Todo o procedimento poderá ser documentado por meio fotográfico, desde que não haja meios para identifica-lo. Sua preocupação como voluntário deverá se restringir apenas à utilização deste material. A coleta do sangue será realizada por pessoal capacitado, sob supervisão de uma enfermeira padrão para evitar e minimizar riscos e danos previamente esclarecidos. Os materiais utilizados para a coleta serão todos descartáveis. Não terá nenhuma despesa ao participar desse estudo. Seu nome será mantido em sigilo, assegurando assim sua privacidade e se desejar, será informado sobre os resultados dessa pesquisa. Qualquer pergunta ou novidade sobre os procedimentos a serem realizados ou em relação a pesquisa, que surgirem durante o período experimental, serão esclarecidos e respondidos a você, mesmo que isso implique em desistência. Além disso, você pode se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer nenhum prejuízo ou causar dano a pesquisa em andamento, aos pesquisadores ou a qualquer tratamento a ser realizado posteriormente nesta faculdade. Após as análises você será informado dos resultados desta pesquisa da qual participa. Sua participação é voluntária, portanto não receberá recompensa ou gratificação nem pagará para participar. Será garantido o livre acesso a todas as informações e retirada de dúvidas sobre o estudo, enfim, tudo o que você queira saber antes, durante e depois da participação na pesquisa. Você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem apresentar justificativas e, também, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, tendo também todas as dúvidas esclarecidas sobre a sua participação neste trabalho. Em caso de dúvidas, você poderá entrar em contato com qualquer um dos membros da pesquisa ou com a Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG:

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do convidado para pesquisa



Universidade Estadual de Ponta Grossa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Nome do pesquisador: Shelon Cristina Souza Bandeca

Rua :Operários, nº 1457– Ponta Grossa /PR Telefone: (042) 99244198

Nome do pesquisador: Evelyn Lopez Leite

Rua :José Bonifácio, nº 744- Ponta Grossa /PR Telefone: (042) 9945717

Comitê de Ética em Pesquisa

UEPG campus Uvaranas, Bloco M, sala 100 Telefone: (42) 3220-3108.

Assinatura do convidado para a pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador participante

Ponta Grossa, 15 de outubro de 2015.

28- Termo de responsabilidade e compromisso do **PESQUISADOR RESPONSÁVEL**: (listar o nome e a titulação do responsável pelo projeto, ou seja, do professor orientador. Estudantes (graduação ou pós-graduação) não podem ser responsáveis por projetos de pesquisa, necessitando estar sob orientação/coordenação de um profissional, sendo então pesquisadores participantes)

TERMO DE RESPONSABILIDADE E COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, "**Shelon Cristina Souza Bandeca** pesquisadora responsável pelo projeto de pesquisa "Adesão de componentes sanguíneos em materiais odontológicos. Estudo in vitro." declaro estar ciente e que cumprirei os termos da Resolução 196 de 09/10/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Declaro também:

1. assumir o compromisso de zelar pela privacidade e sigilo das informações;
2. tornar os resultados desta pesquisa públicos sejam eles favoráveis ou não; e
3. comunicar a COEP da Universidade Estadual de Ponta Grossa sobre qualquer alteração no projeto de pesquisa, nos relatórios anuais ou através de comunicação protocolada, que me forem solicitadas.

Ponta Grossa, 19 de Junho de 2015

Assinatura:



Universidade Estadual de Ponta Grossa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

29- Termo de responsabilidade e compromisso do (s) **PESQUISADOR (ES) PARTICIPANTE(S)**. (Se houver mais de um participante na equipe, todos devem preencher, de forma individual, o termo)

TERMO DE RESPONSABILIDADE E COMPROMISSO DO PESQUISADOR PARTICIPANTE

Eu, "**Evelyn Lopez Leite**" pesquisadora participante no projeto de pesquisa "Adesão de componentes sanguíneos em materiais odontológicos. Estudo in vitro." declaro estar ciente e que cumprirei os termos da Resolução 196 de 09/10/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Declaro também:

1. assumir o compromisso de zelar pela privacidade e sigilo das informações;
2. tornar os resultados desta pesquisa públicos sejam eles favoráveis ou não; e
3. comunicar a COEP da Universidade Estadual de Ponta Grossa sobre qualquer alteração no projeto de pesquisa, nos relatórios anuais ou através de comunicação protocolada, que me forem solicitadas.

Ponta Grossa, 19 de Junho de 2015

Assinatura: 



Assinatura do pesquisador responsável



Assinatura do convidado para pesquisa