

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

JORGE PAILOVER BERMÚDEZ

**ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE ANTES E APÓS ESCOVAÇÃO
SIMULADA**

PONTA GROSSA

2016

JORGE PAILOVER BERMÚDEZ

**ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE ANTES E APÓS ESCOVAÇÃO
SIMULADA**

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.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Shelon
Cristina Souza Pinto
Co-orientador: Prof. Dr. Gibson
Luiz Pilatti

PONTA GROSSA

2016

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

Bermúdez, Jorge Pailover

B516 Aderência DE Escherichia coli em discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície antes e após escovação simulada/ Jorge Pailover
Bermúdez. Ponta Grossa, 2016.
83f.

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

Orientadora: Profª Drª Shelon Cristina Souza Pinto.

Coorientador: Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti.

1.Biofilme. 2.Titânio.
3.Periimplantite. 4.Osseointegração.
I.Pinto, Shelon Cristina Souza. II. Pilatti, Gibson Luiz. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

JORGE PAILOVER BERMÚDEZ

**ADERÊNCIA DE *Escherichia coli* EM DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS A
DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE ANTES E APÓS ESCOVAÇÃO
SIMULADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em
Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Clínica
Integrada

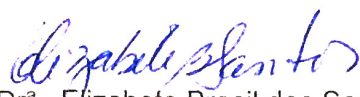
Ponta Grossa, 16 de fevereiro de 2016.


Prof^a. Dr^a. Shelon Cristina Souza Pinto – Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG


Prof. Dr. Mateus Rodrigues Tonetto

Banca Examinadora

Universidade de Cuiabá - UNIC


Prof^a. Dr^a. Elizabete Brasil dos Santos

Banca Examinadora

Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

DADOS CURRICULARES

Jorge Pailover Bermúdez

NASCIMENTO 31.05.1982	Caracas – Distrito Federal
FILIAÇÃO	Paula Dimas Bermúdez Gaspar Baltazar Liendro
2003 – 2011	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
2014-2016	. Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - nível de Mestrado – Área de Concentração em Clínica Integrada. Ponta Grossa – PR –Brasil.

Dedicatória:

À memória de minha querida mãe Paula Bermúdez, por sua entrega, esforço e constância para comigo, ensinando-me a não desistir, mesmo que o caminho seja difícil. Não importa quanto tempo passe, meu coração te amará até meu último suspiro. Deus te ilumine sempre.

Agradecimentos especiais

A Deus, obrigado por tudo minha vida, por ter me dado a oportunidade de ter a famílias e amigos que tenho.

A minha família **Gaspar Baltazar Bermúdez e Alexis Alexander Bermúdez**, meus tios, minhas **tias, primos, primas, sobrinhos e sobrinhas** por tudo o apoio, amor, carinho e dedicação para que possa continuar alcançando minhas metas. Vocês são minhas maiores motivações. Graças Deus por ter a família que tenho

À universidade Estadual de Ponta Grossa por ter oferecido a oportunidade de crescer como profissional e realizar este curso de Pós-graduação.

Aos professores João Carlos Gomes e Osnara Mongruel Gomes obrigado pela preocupação, ensinamentos, dedicação e carinho. Obrigado por permitir me crescer mais.

A Professora Shelon Cristina Souza, obrigado pelos seus conhecimentos e mais ainda pelas suas qualidades humanas. Obrigado por ter compartilhado comigo ensinamentos, alegrias e experiências. Obrigado pela compressão, paciência, tolerância, dedicação e apoio em tudo momento.

O professor Gelson Souza, obrigado pela colaboração, apoio, dedicação e conhecimento em nosso trabalho e acrescentar minha aprendizagem.

A Andrés Dávila Sánchez, obrigado por tudo apoio por teus conhecimentos, por ser um irmão e amigo, te admiro. Obrigado por ter me recomendado e permitir que continue melhorando profissional e pessoalmente. Obrigado por ser uma família no Brasil.

Aos meus irmãos, amigos, colegas, **Luisa Alegria, Cindy Perez, Andrés Montenegro, Joel Toribio, Camilo Pulido, Felipe Cartagena, Miguel, Alexander López e Luis Balladares** por ser minha família aqui no Brasil. Obrigado pelos apoios nos momentos bons e nos momentos difíceis, obrigado pela parceria, risadas, experiências. A meu irmão **Felipe Gutiérrez** por compartilhar comigo em casa, na universidade, dois anos de grande aprendizagem, de amizade, de apoio, obrigado por tudo.

Aos meus colegas e amigos do Brasil, por ser parte de esta experiência e terem compartilhado momentos especiais comigo e por toda ajuda brindada neste país me ofereceu a oportunidade de ter uma visão diferente do mundo e da odontologia.

RESUMO

BERMÚDEZ J.P. ADERÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* EM DISCOS DE TITÂNIO SUBMETIDOS A DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE ANTES E APÓS ESCOVAÇÃO SIMULADA. Dissertação – Mestrado em Odontologia, Clínica Integrada. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

Este estudo *in vitro*, avaliou a aderência microbiana em discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície antes e após procedimentos de escovação simulada. Material e método: Grupo 1: Discos de titânio lisos (Li) (n=21); Grupo 2: Discos de titânio submetidos ao jateamento por ataque ácido (Jat) (n=21); Grupo 3: Discos de titânio submetidos à oxidação anódica (OA) (n=21); Grupo 4: Discos de titânio submetidos ao jateamento seguido por ataque ácido e oxidação anódica (JT) (n=21). Caracterização inicial: Microscopia de força atômica (rugosidade superficial) (MFA), Microdureza Vickers (MV), Microscopia Eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG). Estas análises foram realizadas em diferentes fases – FI: caracterização inicial; FII- Após formação de biofilme; FIII – após escovação; FIV: após escovação e formação de biofilme. Os espécimes tratados por oxidação anódica foram obtidos por meio de um sistema que consiste em fonte programável DC 600 V 8 A microcomputador para controle, osciloscópio e cuba eletrolítica. Análise da aderência de microrganismos antes e após escovação simulada: Espectrofotômetro e contagem das UFC/mL. Novas avaliações: MV; MFA; FEG –avaliação qualitativa da aderência de *E. coli*. As análises MV, MFA e FEG foram realizadas antes e após formação de biofilme e também antes e após escovação simulada. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) para os dados considerados normais e o teste de Kruskal Wallis ($\alpha = 0,05$) foi utilizado para os dados que não mostraram normalidade. Nos resultados observamos formação de biofilme em todos os grupos avaliados, no entanto, uma leve diminuição na aderência de *E. coli* foi observada após realização de escovação simulada. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre: o grupo Li (FII) e os grupos Jat e JT da (FII); os grupos Jat e JT da (FII) e o grupo Li (FIV); o grupo Li da (FIV) e os grupos JT (FII) e OA (FIV). Na análise de MV não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas diferentes fases do estudo. Com relação à rugosidade superficial, os discos tratados por jateamento seguido de ataque ácido apresentaram-se mais rugosos. Conclui-se que, os discos jateados apresentaram maior aderência de microrganismos quando comparados aos demais discos avaliados. Embora os discos lisos tenham tido menor acúmulo de *E. coli*, as imagens em FEG mostraram aglomerações sugerindo a presença de formação de biofilme. Diferentemente, nos discos

tratados as bactérias se apresentaram mais isoladas. A rugosidade influenciou na quantidade de microrganismos aderidos aos discos. O tratamento de superfície por oxidação anódica demonstrou pequena aderência bacteriana.

Palavras-chaves: Biofilme, Titânio. Periimplantite, osseointegração

ABSTRACT

BERMÚDEZ J.P. Adherence of *Escherichia coli* in titanium discs with different surface treatment before and after simulated brushing. Dissertation - Master in Dentistry, Integrated Clinic. Ponta Grossa: Ponta Grossa State University; 2013.

This *in vitro* study evaluated the microbial adhesion on titanium discs subjected to different surface treatments before and after simulated toothbrushing procedures. Methods: Group 1: smooth titanium disks (Li) (n = 21); Group 2: titanium discs submitted to blasting by acid etching (Jat) (n = 21); Group 3: Titanium discs submitted to anodic oxidation (OA) (n = 21); Group 4: Titanium discs submitted to blasting followed by acid etching and anodic oxidation (JT) (n = 21). Initial characterization: Atomic force microscopy (surface roughness) (AFM), Vickers Microhardness (VM), field emission scanning electron microscope (FEG). These analysis were performed at different stages - FI: initial characterization; FII: After biofilm formation; FIII: after brushing; FIV: after brushing and biofilm formation. The specimens treated by anodic oxidation have been obtained by a system consisting of programmable source DC 600 V 8 A, microcomputer control, oscilloscope and electrolytic tank. Analysis of microorganisms adhesion before and after simulated toothbrushing: spectrophotometer and counting of UFC / mL. New evaluation: VM; AFM FEG- qualitative evaluation of *E. coli* adhesion AFM, MV and FEG analysis were performed before and after the biofilm formation and the simulated toothbrushing procedures. Statistical analysis were performed using ANOVA and posttest of Tukey ($\alpha = 0.05$) for the data considered normal, and the Kruskal Wallis test ($\alpha = 0.05$) was used for the data that did not show normality. The results showed biofilm formation in all groups evaluated, however a small decrease in adherence of *E. coli* was observed after conducting simulated toothbrushing. Statistically significant differences were found between: the group Li (FII) and the groups Jat and JT (FII); the groups Jat and JT (FII) and the group Li (FIV); the group Li (FIV) and the groups JT (FII) and OA (FIV). The analysis MV did not showed statistically significant differences between groups in different phases of the study. Regarding the surface roughness, the discs treated by blasting followed by acid attacks had become more wrinkled. We conclude that, the sandblasted disc presented greater adherence of microorganisms when compared to other evaluated discs. Although the flat discs have had less accumulation of *E. coli*, the images in FEG showed agglomerations suggesting the presence of biofilm formation. Differently, the disks treated bacteria performed more isolated. The roughness influenced the amount of microorganisms adhered to the discs. The surface treatment by anodic oxidation demonstrated small bacterial adhesion.

Keywords: Biofilm, Titanium. Periimplantite, osseointegration

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** **A.** Contato direto entre osso e titânio (Ti) em todos os lados das roscas (x 10). **B.** pequenas irregularidades na superfície do titânio (Ti) são ancoradas na superfície do osso, o que significa estabilidade melhorada ao longo de uma interface (x25). Fonte: (Carlsson et al.³³ 1986)**22**
- Figura 2.** Diferentes características da superfície do implante. Fonte: (Bessone L¹ 2009).....**30**
- Figura 3.** Fotografia de cinco implantes com diferentes tratamentos de superfície. (A) Liso; (B) SLA;(C) TPS;(D) Com bordas cortantes nas roscas; (E). Com microtexturas. Fonte: (Massaro et al.² 2002).....**33**
- Figura 4.** (A) Radiografia de dois implantes com periimplantite, (B) Avaliação periodontal (PS - 8 mm) em um dos implantes com periimplantite. Observe o sangramento e supuração à sondagem. Fonte: (Klinge et al.³ 2005).....**40**
- Figura 5.** Espécimes de Titânio e seus diferentes tratamentos de superfície. A disco Liso (Li), B disco jateado (Jat), C disco liso tratado (OA) e D disco jateado tratado (JT). Fonte: autor.....**46**
- Figura 6.** Fluxograma das fases experimentais da pesquisa. Na Fase inicial realizou-se a avaliação de microdureza (MV); avaliação por microscópio de varredura por emissão de campo (FEG) e microscopia de força atômica (MFA). Demais espécimes foram submetidos a formação de biofilme. Na fase II foram realizadas as contagens de microrganismos aderidos (UFC/ml), sendo que alguns espécimes foram analisados em microscópio de força atômica (MFA), microdureza e FEG. Demais espécimes foram submetidos a escovação simulada. Na fase III, os espécimes submetidos a escovação tiveram suas superfícies avaliadas com MV e FEG. Demais espécimes foram submetidos a aderência microbiana e na fase IV foram realizadas a contagem de microrganismos aderidos a superfície dos espécimes, FEG, MFA e microdureza. Fonte: Autor.....**47**
- Figura 7.** Crescimento de *E. coli* no meio de cultura - ágar BHI. Fonte: autor.....**49**
- Figura 8.** Espectrofotômetro analógico (Micronal, Brasil). Fonte: autor.....**50**
- Figura 9.** Funcionamento do espectrofotômetro. Fonte: autor.....**50**

Figura 10. Máquina de escovação (Mset, Brasil). Fonte: autor	51
Figura 11. Fórmula de intensidade e área exposta para fazer o tratamento de superfície de titânio. Fonte: autor	53
Figura 12. O tratamento de superfície por oxidação anódica foi realizado pelo Laboratório de Física de Materiais do DEFIS da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fonte: autor.....	54
Figura 13. Imagem da angulação da ponta de diamante do microdurômetro. Fonte: autor.....	55
Figura 14. Microdurômetro. O equipamento utilizado foi Shimadzu modelo (HNV-2. Japão). Fonte: autor	56
Figura 15. Imagem da divisão das amostras de titânio para o teste de microdureza. Fonte: autor.....	56
Figura 16. Esquema da definição de rugosidade média. Fonte: autor.....	57
Figura 17. Desenho do funcionamento da microscopia de força atômica. Fonte: autor.....	58
Figura 18. Microscopia de Força Atômica. (Shimadzu SPM 9600, Japão). Fonte: autor.....	59
Figura 19. Imagem do FEG (Shimadzu, Japão). Fonte: autor.....	60
Figura 20. Dessecador contendo sílica. Fonte: autor.....	61
Figura 21. Gráfico demonstra a média e o erro padrão das UFC/ ml – Aderência de <i>E. coli</i> antes e após escovação simulada dos diferentes tratamentos de superfície testados foram submetidos a um ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), tendo como resultado um p 0,0004. Diferenças significativas foram indicadas com letras (A, B, C, D, E): entre o grupo Li (FII) e os grupos Jat e JT (FII); o grupo Li (FIV) e os grupos Jat e JT (FII); o grupo Li (FIV) e o grupo OA (FIV). Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases dos experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme, FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme.....	63
Figura 22. Gráfico demonstra a média e erro padrão da rugosidade nas fases de aderência microbiana antes e após escovação simulada (II e IV) para os diferentes tratamentos de superfície testados. Análise estatística: ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) tendo como resultado $p < 0,0001$ nas diferenças	

significativas indicados com letras (A, B, C, D, E, F, G): entre os grupos Li, Jat, OA, JT da (FII) e o grupo Jat (FIV); os grupos Li, OA, JT (FIV) e o grupo Jat (FIV). Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases dos experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme, FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme.....65

Figura 23. Gráfico demonstra a média e erro padrão da microdureza dos tratamentos de superfície testados nas fases de referência (I e III) e das fases de aderência microbiana antes e após escovação simulada (II e IV). Análise estatística: ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) tendo como resultado $p = 0,0924$, não houve diferença significativa entre os grupos antes e após escovação e entre grupos antes da escovação e depois da escovação. Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases dos experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme, FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme.....66

Figura 24. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG). Espécimes com formação de biofilme antes da escovação simulada (Fase II). (A) Li. (B) Jat. (C) OA. (D) JT.....68

Figura 25. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG). Espécimes com aderência microbiana após escovação simulada (Fase IV). (A) Li. (C) OA. (D) JT.....69

Figura 26. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG) das indentações obtidas no teste de microdureza Vickers (carga 200 gf por 15 seg) para os diferentes tratamentos de superfície, fase I. (A) Li. (B) Jat. (C) OA. (D) JT. Este teste foi realizado também nas fases II III e IV..... 70

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Avaliação da aderência de *E. coli* por meio de espectrofotômetro**64**
- Quadro 2.** Correlação entre aderência de *E. coli* e Microdureza Vickers antes e após escovação de todos os grupos de tratamentos de superfície.....**67**
- Quadro 3.** Correlação entre aderência de *E. coli* e rugosidade (Ra) antes e após escovação de todos os grupos de tratamentos de superfície.....**67**
- Quadro 4.** Correlação entre microdureza Vickers e rugosidade (Ra) antes da escovação e formação de biofilme e após da escovação e formação de biofilme.**67**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BHI	Brain heart infusion agar
cm	centímetro
g	Grama
gf	Grama/ força
SFE	Energia superficial livre
Hz	Hertz
h	Hora
kg	Quilogramas
L	Litro
LPS	Lipopolissarídeo
m	Metro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	minuto
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg	Microgramas
MFA	Microscopia de força atômica
FEG	Microscopia de varredura por emissão de campo
mol	Mol
MPa	Megapascal
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Revoluções por minuto
s	Segundo
W	Watt
UFC	Unidade de formação de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Área
α	Alfa
A	Ampere
$\pm$	Mais ou menos
p	Valor-p
μ	Micro
°	Graus
°C	Graus Celsius
Kx	Magnitude
<	Menor
>	Maior
r	radio
d	Diâmetro
π	Pi
%	Porcentagem
V	Voltio
IL	Interleucina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. OSSEINTEGRAÇÃO	20
2.2. O TITÂNIO	24
2.3. TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE DO TITÂNIO	28
A. A SUPERFÍCIE LISA	29
B. SUPERFÍCIE POR TEXTURIZAÇÃO	29
B.1. TEXTURIZAÇÃO POR SUBTRAÇÃO	29
B.1.1. TRATAMENTO ÁCIDO	30
B.1.2. JATEAMENTO DE PARTÍCULAS	30
B.1.3. JATEAMENTO DE PARTÍCULAS ASSOCIADAS	30
B.1.4. TRATAMENTO A LASER	30
B.2.1. TEXTURIZAÇÃO POR ADIÇÃO	31
B.2.2. TRATAMENTO COM PULVERIZAÇÃO DE PLASMA DE TITÂNIO (TPS) OU HIDROXIAPATITA (HA)	31
B.2.3. TRATAMENTO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA	31
B.2.4. DEPOSIÇÃO DE ÍON	31
2.4 . MICROBIOLOGIA PERIIMPLANTAR	33
2.6. HIGENIZAÇÃO DA CAVIDADE BUCAL COM IMPLANTES DE TITÂNIO	40
3. PROPOSIÇÃO	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	44
4.2. FORMAÇÃO DO BIOFILME	47
4.3. ESPECTROFOTOMETRIA	49
4.4. ESCOVAÇÃO SIMULADA	50
4.5. TRATAMENTO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA	50
4.5.1. PREPARO DA SOLUÇÃO DA Ca/P	51
4.5.2. ACABAMENTOS DAS AMOSTRAS	51

4.6. MICRODUREZA	54
4.7. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	56
4.8. FEG. MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO.....	59
4.8.1. FIXAÇÃO DE BACTÉRIAS NOS ESPÉCIMES PARA A LEITURA NO FEG	60
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5. RESULTADOS	62
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIA.....	76

1. INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegráveis são considerados uma alternativa viável e previsível para a reabilitação de rebordos total ou parcialmente edêntulos, apresentando elevados índices de sucesso (Branemark, R. et al.⁴ 2001, Adell et al.⁵ 1981). Contudo, estes índices elevados estão fortemente associados ao processo de osseointegração, caracterizado como o contato íntimo entre o tecido ósseo vital e a superfície do implante, sem interposição de tecidos moles na presença de carga funcional (Branemark, P. I. et al.⁶ 1977, Magno Filho et al.⁷ 2012).

Os implantes dentários foram inicialmente desenvolvidos com superfície lisa, sendo que estudos de acompanhamento com tais implantes revelaram altos índices de sucesso, demonstrando boa previsibilidade (Adell et al.⁵ 1981, Bryant e Zarb⁸ 2002). Contudo, foi demonstrado que as características superficiais do titânio interferem no processo de osseointegração (Buser et al.⁹ 2004, Palmquist et al.¹⁰ 2010).

Assim, visando otimizar o processo de osseointegração, diversas modificações vêm sendo realizadas nestas superfícies (Bornstein et al.¹¹ 2008, Lai et al.¹² 2009). Dentre estes tratamentos de superfície, o método mais utilizado é o jateamento da superfície seguido por um ataque ácido, visando aumentar a rugosidade da superfície. O jateamento com partículas específicas resulta em uma maior rugosidade, a qual é posteriormente atenuada pelo ataque ácido (Rupp et al.¹³ 2006, Novaes et al.¹⁴ 2010). Estudos revelam que superfícies jateadas e submetidas ao ataque ácido apresentam maior contato entre a superfície do implante e o tecido ósseo quando comparados à superfícies lisas (Trisi et al.¹⁵ 2003, Buser et al.¹⁶ 1991, Celletti et al.¹⁷ 2006).

De fato, é bem descrito pela literatura que o aumento na rugosidade superficial favorece a deposição óssea na superfície do implante (Trisi et al.¹⁵ 2003, Buser et al.¹⁶ 1991, Celletti et al.¹⁷ 2006). Entretanto, é importante salientar que este aumento de rugosidade também pode favorecer a formação de biofilme,

especialmente em casos de exposição das roscas do implante em decorrência de reabsorções no tecido ósseo periimplantar. De fato, alguns autores demonstraram que superfícies de titânio com maior rugosidade facilitam a formação do biofilme (Dhir¹⁸ 2013, Teughels et al.¹⁹ 2006, Subramani et al.²⁰ 2009).

A escovação é bem estabelecida como um método eficaz para o controle de biofilme. Apesar da efetividade no controle de biofilme, a escovação pode estar envolvida no desgaste de estruturas dentárias, especialmente se o procedimento de escovação estiver associado ao uso de dentifrícios, os quais podem apresentar componentes abrasivos em sua composição, tais como carbonato de cálcio e a sílica (Dhir¹⁸ 2013, Thomas e Nakaishi²¹ 2006). Com base nestes dados, seria importante avaliar a influência do procedimento de escovação na formação do biofilme na superfície de implantes de titânio.

Os dentifrícios estão entre os métodos de eliminação/prevenção do biofilme. Sua fórmula convencional apresenta componentes abrasivos, como carbonato de cálcio e a sílica que auxiliam na remoção mecânica do biofilme e componentes químicos como o flúor e o triclosan que possuem ação antimicrobiana; sendo que o triclosan pode reduzir o acúmulo do biofilme supragengival em até 36% comparado a um dentifrício contendo flúor (Lobene et al.²² 1991). Esses resultados foram obtidos em dentes naturais e quando se fala em implantes deve-se almejar os mesmos resultados, no entanto, pode haver interação entre o material metálico (Ti) e os íons fluoretos do dentifrício, podendo ocorrer corrosão por exemplo (Lobene et al.²² 1991, Nakagawa et al.²³ 1999).

A adesão inicial de microrganismos em implantes começa em áreas de elevada umectação (característica do titânio) e no interior de cavidades e ranhuras das superfícies rugosas, a partir de onde é difícil a eliminação de microrganismos (Teughels et al.¹⁹ 2006). A falta de higiene bucal, histórico de periodontite ou indivíduos fumantes são indicadores de riscos de periimplantite (Lang et al.²⁴ 2004).

A microbiota da periimplantite é muito semelhante da periodontite avançada. Tem-se altos níveis de espiroquetas e anaeróbicos imóveis. Da mesma

forma que os dentes naturais, os implantes dentais são colonizados pelas bactérias do biofilme dental (Leonhardt et al.²⁵ 1993, Mombelli et al.²⁶ 1988, Mombelli e Mericske-Stern²⁷ 1990) e a relação de causa e efeito entre biofilme e o desenvolvimento de lesões inflamatórias como mucosite e a periimplantite, por exemplo, podem se estabelecer caso haja perpetuação do biofilme (Pontoriero et al.²⁸ 1994, Zitzmann et al.²⁹ 2002).

Berglundh et al.³⁰ 2002 indicam que de 35 a 45% dos implantes instalados podem apresentar mucosite ou periimplantite, tendo como um dos principais sintomas a inflamação e migração apical dos tecidos moles, o que pode ocasionar a exposição das roscas ou espiras dos implantes. Até o presente momento existem diferentes estudos que avaliam a rugosidade das superfícies dos implantes e o aumento da colonização bacteriana. No entanto, (Barros e de Gouvea³¹ 2010) demonstraram que a rugosidade superficial pode não ter influência significativa no aumento da colonização microbiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. OSSEINTEGRAÇÃO

Existem relatos de substituição de dentes por implantes desde a antiguidade, tendo sido usados dentes de animais e metais. No entanto, os implantes intraósseos como os que conhecemos atualmente foram aprimorados a partir de materiais que não demonstravam sucesso a longo prazo, devido à falta de formação de uma interface biologicamente compatível com osso (Iijima et al.³² 2012, Greenstein et al.³³ 2013). Os fatores negativos relacionados aos primeiros implantes desenvolvidos são os seguintes: (Moiseiwitsch³⁴ 2002):

- Incompatibilidade do material, gerando uma resposta inflamatória;
- Falhas no processo de confecção dos implantes, tendo sido observada presença de contaminantes nas superfícies;
- Procedimentos cirúrgicos inadequados;
- Ausência de um sistema protético que proporcionasse requisitos estéticos e funcionais.

Mudanças foram observadas com a descoberta do fenômeno de osseointegração descrito por (Branemark, P. I. et al.⁶ 1977). Osseointegração é definida como uma “conexão direta estrutural e funcional entre o osso vital organizado e a superfície de um implante submetido à carga funcional”, além disso, histologicamente observa-se uma anquilose funcional sem interferências do tecido fibroso ou conjuntivo entre osso e implante (Albrektsson et al.³⁵ 1981, Carlsson et al.³⁶ 1986).

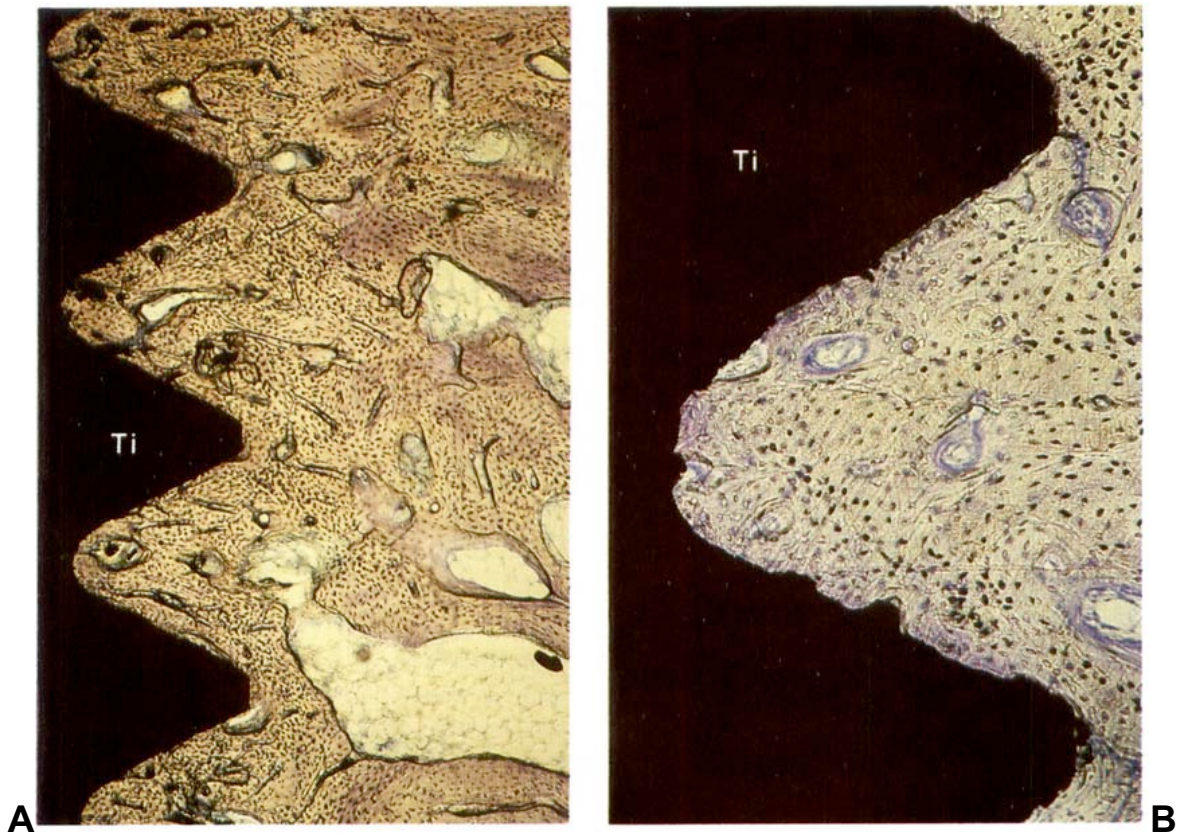


Fig.1. A. Contato direto entre osso e titânio (Ti) em todos os lados das roscas (x 10). B. pequenas irregularidades na superfície do titânio (Ti) são ancoradas na superfície do osso, o que significa estabilidade melhorada ao longo de uma interface (x25). Fonte: (Carlsson et al.³³ 1986)

A interface do implante é extremamente dinâmica e a complexa interação entre implante e tecidos não só abrange questões de biocompatibilidade, mas também alterações mecânicas em torno do osso (Parithimarkalaignan e Padmanabhan³⁷ 2003).

O processo de osseointegração implica em uma *estabilidade primária* entre o osso alveolar e o implante, ou seja, um travamento mecânico inicial. Na sequência, irá se formar um embricamento biológico por meio da aposição e remodelação óssea sobre o implante, chamado de *estabilidade secundária* (Schenk e Buser³⁸ 1998).

Segundo Robert 2000, a osseointegração tem diferentes etapas, sendo que a ativação biológica se desenvolve através de uma lesão da matriz óssea preexistente. Esta se expõe ao fluido extracelular, proteínas, proteínas não colágenas. Os fatores de crescimento são liberados para ativar a reparação óssea, atraindo as células osteoprogenitoras da medula óssea, do osso endocortical e do periósteo cortical no lugar da lesão por meio da quimiotaxia. Eles se proliferam e se diferenciam em osteoblastos, iniciando a deposição óssea na região do defeito ósseo e possivelmente sobre a superfície dos implantes. Os osteoclastos, nesta fase, são poucos e não participam no processo de ativação.

A Ativação da osseointegração tem diferentes etapas após instalação do implantes, consistindo em uma linha de processos, a seguir explicados (Schenk e Buser³⁸ 1998).

Incorporação do tecido ósseo formado: nesta etapa ocorre a formação de osso primitivo, desordenado, com fibras colágenas e com numerosos osteócitos, apresentando uma densidade relativa baixa. Este osso primitivo tem uma excelente capacidade de crescer através de estruturas, como hastes e placas, formando tecido ósseo vascularizado ao redor dessas estruturas a uma velocidade relativamente rápida. A formação de tecido ósseo acontece aproximadamente entre 4 e 6 semanas após a instalação do implante, iniciando o crescimento ósseo a partir do osso circundante em direção ao implante, exceto em aberturas estreitas, onde é simultaneamente depositado osso sobre a superfície do implante.

Deposição de osso lamelar e fibras paralelas: Este é um osso mais elaborado, entrelaçado com fibras colágenas, possuindo maior força de resistência. Não se forma a partir do tecido ósseo primitivo como na primeira etapa. Cresce por aposição sobre uma base sólida preexistente, concentrando-se em grandes áreas. Algumas vezes, por causa da interrupção do fornecimento de sangue pela cirurgia, este osso se torna necrótico, posteriormente reforçado por um revestimento ósseo novo, que é estimulado pela carga funcional do implante.

Remodelação óssea e modelagem (Qahash et al.³⁹ 2008): começa aproximadamente no terceiro mês após a instalação do implante e é contínua durante toda a vida do indivíduo, diminuindo um pouco depois da remodelação e modelagem inicial. , erosionada pela reabsorção óssea dos osteoclastos (Frost⁴⁰ 1966), acompanhado por uma rede vascular e células osteoprogenitoras perivasculares. A primeira linha de osteoblastos se concentra na parede da cavidade reabsorvida pelos osteoclastos, e começa a depositar camadas concêntricas de osso lamelar (Geris et al.⁴¹ 2008), preenchendo o espaço reabsorvido com novo osso lamelar.

Os osteócitos deixam resíduos de DNA nas lacunas ou nos espaços vazios, quando morrem pelo processo de apoptose. Este leva à liberação de produtos de degradação, os quais ativam os osteoclastos. Nesta fase ocorre uma adaptação da estrutura de osso, melhorando a qualidade óssea, e substituindo tecidos preexistentes, como osso necrosado ou osso inicialmente formado por osso lamelar viável, e substituindo de forma contínua osso velho por osso novo, o que impede o acúmulo de micro lesões e fadiga.

A osseointegração requer materiais bioinertes ou bioativos, os quais levam à deposição óssea e podem ter como resultado o sucesso do implante. De acordo com (Albrektsson et al.³⁵ 1981), para ter sucesso na realização de implantes dentários vários fatores devem ser considerados:

1. Biocompatibilidade dos materiais
2. A qualidade óssea
3. Técnica cirúrgica
4. Fase curativa
5. Condições de cargas
6. Natureza macroscópica como forma do implante, e microscópica como tratamento de superfície.

O material apresenta um papel decisivo na união implante/osso. Material bioinerte não libera qualquer substância nociva e, por conseguinte, não provoca reações adversas ao tecido. O material bioativo causa reação tecidual favorável através do estabelecimento de ligações químicas com os componentes de tecido, gerando atividades celulares envolvidas na formação da matriz óssea (Schenk e Buser³⁸ 1998). O Titânio, comercialmente puro ou com certas ligações de alumínio vanádio, é reconhecido por ter as propriedades de biocompatibilidade (Steinemann⁴² 1998).

2.2. O TITÂNIO

O titânio é um metal de transição que apresenta uma estrutura cristalina pura do tipo hexagonal e é compacto à temperatura de 882,5°C. Este metal apresenta propriedades tais como baixa densidade, alta resistência mecânica, baixo módulo de elasticidade, elevada resistência à corrosão e uma excelente biocompatibilidade. (Barros e de Gouvea³¹ 2010).

A combinação de todas as propriedades físicas, mecânicas e químicas do implante, o tornam um dispositivo com elevado índice de sucesso na odontologia (Massaro et al.² 2002, Steinemann⁴² 1998, Bayramoglu et al.⁴³ 2000); Além de ser usado na fabricação de implantes osseointegrados, o titânio também é empregado para fabricação de fios ortodônticos e limas endodônticas.

Apesar das descobertas sobre biocompatibilidade e osseointegração, devemos levar em consideração que qualquer metal pode sofrer processos corrosivos. A corrosão é um processo intrínseco ao átomo de um metal e quando este está em contato com organismos vivos pode provocar alteração dos processos metabólicos do organismo. Os corpos estranhos modificam a bioenergia nas reações de oxidação-redução (reações redox) que envolvem

elétrons, consistindo numa agressão química, física e fisiológica ao organismo, e gerando resposta imune e alérgica (Steinemann⁴² 1998).

Segundo Steinemann¹² 1998, a corrosão é um processo eletroquímico, no qual a oxidação do metal produz hidróxidos, óxidos e sais, que podem ser solúveis no fluido tissular gerando toxicidade para o organismo.

A característica fundamental da corrosão é a troca de elétrons na superfície do metal, sendo que elétrons não existem como entidades livres. As moléculas de água se unem a íons do metal gerando a remoção de prótons (hidrólise), resultando numa produção de hidroxila carregada negativamente, e assim há uma redução da carga elétrica na união da molécula de água com o íon metálico (“*aquation*”). A hidrólise dos produtos da corrosão leva o tecido a mudanças de pH, que podem causar desnaturação das matérias orgânicas. Isso acontece com o níquel, cobalto, cobre e vanádio, nos quais os produtos de corrosão são convertidos em cátions e ânions. A presença desses metais no organismo pode levar à ligação de íons à proteínas, formando antígenos, ou seja, levando à resposta alérgica do organismo (Steinemann⁴² 1998).

A corrosão acontece de forma diferente com o titânio. Este reage em meio aquoso e no ar, formando uma camada densa de óxido na superfície, essa reação indesejada (corrosão) torna-se uma barreira contra a dissolução potente do metal, devido à solubilidade constante de dióxido de titânio, num ambiente com variação de pH de 3 a 12 (Steinemann⁴² 1998).

O titânio apresenta cátions, ou seja, íons com quatro cargas positivas, rodeado por quatro moléculas carregadas negativamente (hidroxila), isto faz com que o produto de corrosão hidrolisado não seja um ânion (íon negativo), o qual não tem afinidade com moléculas orgânicas. Ou seja, a corrosão do titânio não apresenta nenhuma carga química, e nenhuma reação acontece nos tecidos, colaborando para a biocompatibilidade deste material com o tecido (Yu et al.⁴⁴ 2004).

Os implantes de titânio têm uma elevada resistência à corrosão em meio fisiológico e meios minerais ácidos (Zavanelli et al.⁴⁵ 2000), permitindo uma interação de equilíbrio com o organismo, uma vez que os produtos tóxicos são dificilmente produzidos e estável.

A pequena taxa de corrosão do titânio não é uma condição suficiente para avaliar a biocompatibilidade com o tecido, porém é uma característica que deve ser considerada. Os produtos gerados durante a corrosão podem ser absorvidos pelas células, levando à toxicidade (Steinemann⁴² 1998).

Estudos investigaram o produto químico e aspectos bioquímicos da aderência de osteoblastos e fibroblastos observando que a resistência de polarização (velocidade de corrosão) de um metal é proporcional à resistência de corrosão. Além da proliferação celular na presença de muitos metais (Buser et al.⁹ 2004, Steinemann⁴² 1998, Zavanelli et al.⁴⁵ 2000, Uboldi et al.⁴⁶ 2004) percebeu-se que o titânio permite o crescimento de fibroblastos, gerando reação inerte.

Os resultados com osteoblastos refletiram uma proliferação fraca, os autores consideraram que o metal estava em uma interação débil, ou seja, metal diluído no meio celular. Quando o metal fica em contato direto com a célula, pode gerar expressivas interações químicas nos tecidos próximos ao corpo estranho e na sua interface (Buser et al.⁹ 2004, Steinemann⁴² 1998, Zavanelli et al.⁴⁵ 2000, Uboldi et al.⁴⁶ 2004).

A inibição do crescimento dos osteoblastos por qualquer metal, exceto titânio e zircônio, sugere que estes dois elementos têm a capacidade de osseointegração devido a uma alta resistência de polaridade, ou seja uma alta resistência à corrosão (Zavanelli et al.⁴⁵ 2000).

Listgarten et al.¹⁵ 1992, por meio do uso de microscopia eletrônica de transmissão, afirmaram que não há nenhuma evidência de qualquer espaço entre a superfície metálica do titânio e o osso. Esta constatação sugere a possibilidade de uma ligação química direta de distâncias atômicas, o que permite a transferência de forças verticais, horizontais e de torque (Trisi et al.¹⁵ 2003).

A química da osseointegração acontece porque o titânio é um metal reativo. Isto significa que, no ar, água ou na presença de qualquer outro eletrólito, forma-se um óxido espontâneo nativo, de espessura aproximada de 4 nm. Os íons de oxigênio do exterior migram para o metal e reagem com íons do titânio, ocorrendo a reação de oxidação, ou corrosão. A corrosão por meio dos eletrólitos do fluido corporal é dificultada, ou seja, a película de oxido nativo do titânio é um bom isolador, pois não permite que elétrons disponíveis na superfície externa do titânio interajam com eletrólitos (Steinemann⁴² 1998).

O modelo de força eletrostática é um instrumento versátil para a compreensão do verdadeiro mecanismo de osseointegração. O óxido nativo em titânio é um receptor de curto e longo alcance para os fatores de promoção de adesão de tecidos vivos, e interage com moléculas de matriz e com o material externo (Wennerberg et al.⁴⁷ 1993).

A excelente biocompatibilidade e osseointegração está relacionada com as diferentes propriedades do titânio e de sua superfície. Citamos o módulo de elasticidade baixo, comparável ao osso; a presença de película de óxido denso, altamente passiva que protege o metal subjacente da oxidação; uma baixa taxa de dissolução da película de óxido; e uma concentração extremamente baixa de produtos de corrosão de titânio (Buser et al.¹⁶ 1991).

A espessura e a estabilidade da película de óxido do titânio são determinantes para o desempenho do implante na corrosão e no processo de liberação e íons nos tecidos adjacentes, efeito este indesejável para as células do organismo.

Em resumo, quando os elementos de titânio são postos em contato em meio fisiológico, inicia-se uma cadeia de eventos que são dominados por adsorção de proteínas e adesão de plaquetas, com subsequente presença de macrófagos, induzindo à inflamação da área afetada. Esta resposta, não específica para o implante, não é considerada ótima para um bom desempenho do implante no organismo (Kieswetter et al.⁴⁸ 1996).

A cascata de reações desenvolvidas pelo sistema imunológico humano depende das propriedades físico-químicas da superfície. A aceitação de um implante pelo corpo humano é dada pelas características de durabilidade e integridade da superfície do implante, assim como pelas reações químicas e biológicas que ocorrem na interface tecido-implante (Anselme et al.⁴⁹ 2000, Schneider et al.⁵⁰ 2003).

Para melhorar o processo de osseointegração, foram desenvolvidos diferentes tipos de tratamentos de superfície ao titânio do implante. Segundo (Steinemann⁴² 1998), os resultados indicam claramente que a rugosidade da superfície e a textura é um fator primordial para a ancoragem dos implantes dentários, permitindo maior durabilidade, com máxima resistência ao cisalhamento na interface implante-osso, o qual chega a 24 MPa para implantes usinados (liso) e cerca de 50 MPa para implantes com preparações especiais (Buser et al.⁹ 2004, Steinemann⁴² 1998).

2.3. TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE DO TITÂNIO

Segundo (Bessone L¹ 2009), as superfícies dos implantes são classificadas em lisas, de texturização por subtração, e texturização por adição. Sabe-se que a superfície dos implantes tem diferentes níveis, tal como relatado por Sykaras et al.¹⁹ 2000, Wennerberg et al.²⁰ 1993:

1. Nível 1: constituída por roscas e espirais, e é medida em milímetros.
2. Nível 2: observam-se ondulações na superfície, e também se mede em milímetros. Foi descrita por (Albrektsson et al.³⁵ 1981), que demonstrou o crescimento ósseo dentro das rugosidades através de estudos histológicos.

3. Nível 3: descrita em micra e corresponde propriamente a rugosidade do implante, no ocorre depósito de substância fundamental nas irregularidades até $1\text{ }\mu\text{m}$.

4. Nível 4: constituída por camada de óxidos e porosidades, com medidas nanométricas, o que permite o processo de osseointegração.

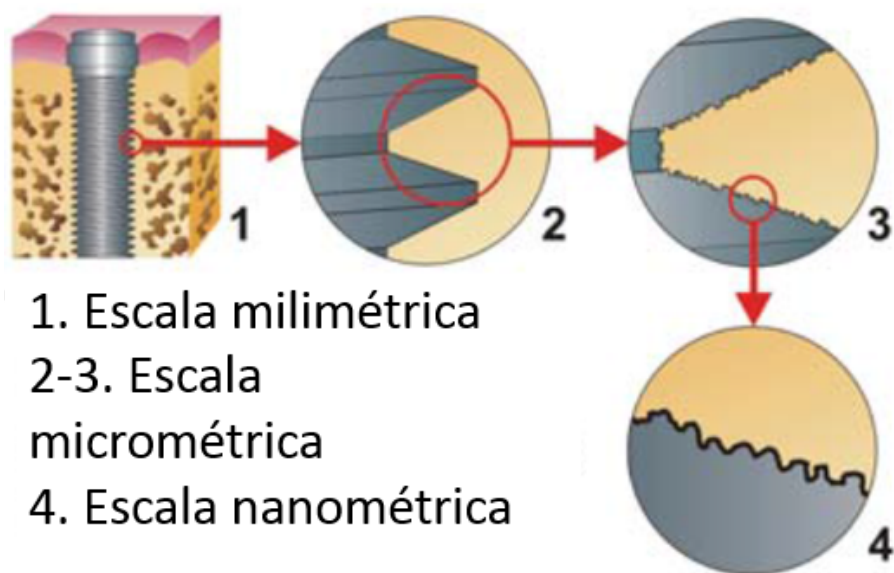


Fig. 2. Diferentes características da superfície do implante. Fonte: (Bessone L¹ 2009).

A. A SUPERFÍCIE LISA, segundo (Bessone L¹ 2009) (usinada) esta superfície tem microssulcos e circunferências paralelas e perpendiculares. Além disso, macroscopicamente observa-se lisa e brilhante, tendo uma rugosidade média aproximada de $2\text{ }\mu\text{m}$ a $8\text{ }\mu\text{m}$.

B. SUPERFÍCIE POR TEXTURIZAÇÃO: a texturização é qualquer alteração ou modificação feita no implante por tratamento topográfico ou químico, podendo ser:

B.1. TEXTURIZAÇÃO POR SUBTRAÇÃO: o tratamento da superfície consiste na remoção física, química ou físico-química das partículas de metal da

superfície dos implantes. Microscopicamente tem formas pontiagudas.(Sykaras et al.⁵¹ 2000).

B.1.1. TRATAMENTO ÁCIDO: consiste na eliminação de partículas metálicas das superfícies dos implantes por imersão em ácidos fortes, tais como ácido fluorídrico, sulfúrico ou clorídrico. Este tratamento gera picos de rugosidade, com depressões de 1 a 2 µm, o que pode auxiliar na retenção e formação de coágulos na matriz óssea.

B.1.2. JATEAMENTO DE PARTÍCULAS: Várias partículas de materiais são colocadas sobre as superfícies dos implantes usinados. Essas partículas geralmente são óxido de alumínio, sílica, óxido de titânio e hidroxiapatita. Estes elementos têm uma dureza maior do que a do material de implante, formando macroretenções. As desvantagens são a impossibilidade de se obter uma superfície homogênea devido aos diferentes tipos de metais jogados na superfície. Também existem jateamentos reabsorvíveis, como à base de fosfato de cálcio, que permite gerar uma topografia, melhorando o processo de formação óssea (Abron et al.⁵² 2001).

B.1.3. JATEAMENTO DE PARTÍCULAS ASSOCIADAS AO TRATAMENTO COM ÁCIDO (SLA): os dois tratamentos de superfícies foram associados, para obter macroretenções por parte do jateamento e microrretenções por um ataque ácido. A superfície recebe partículas de sílica grandes (250 a 500 micrômetros), seguido por tratamento com ácido clorídrico / ácido sulfúrico.

Esta técnica é osteocondutora, o que promove a aposição óssea dando excelente estabilidade em poucas semanas. (Rupp et al.¹³ 2006, Raghavendra S⁵³ 2005).

B.1.4. TRATAMENTO A LASER: este tratamento cria rugosidades com profundidade, tamanho, e direção de orientação controladas. Além disso, ele tem um baixo nível de contaminação porque não existe contato de produtos químicos com implantes. Estudos *IN VIVO* demonstraram que o crescimento do osso sobre superfícies do laser é maior do que em superfícies tratadas com método de

subtração. A superfície tratadas da laser produzem o crescimento de células orientado à matriz extracelular, além do crescimento ósseo (Sul et al.⁵⁴ 2008).

B.2.1. TEXTURIZAÇÃO POR ADIÇÃO: são superfícies sintetizadas por colocação de material em forma de partículas esféricas, geralmente de 44 µm a 150 µm de tamanho, como por exemplo pó de titânio ou hidroxiapatita, gerando poros na superfície do implante, o que aumenta a área total e funcional da superfície para a osseointegração.

B.2.2. TRATAMENTO COM PULVERIZAÇÃO DE PLASMA DE TITÂNIO (TPS) OU HIDROXIAPATITA (HA): o processo se dá em alta temperatura, onde partículas finas de titânio ou hidroxiapatita são parcialmente fundidas e são movidas por um plasma ou gás ionizado. Partículas de titânio / HA aderem na superfície do implante tratado, tendo como resultado o aumento do revestimento e da durabilidade, bem como melhorada biocompatibilidade. No entanto, os depósitos apresentam módulos de elasticidade diferentes, trazendo o implante à falha no momento dos movimentos de mastigação. Além disso, este é o mais utilizado como tratamento de superfície porque gera excelente proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, como osteoproteginas e osteocalcina (Galli et al.⁵⁵ 2005).

B.2.3. TRATAMENTO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA: o método usado para a preparação da superfície por óxido poroso é a oxidação anódica, que é um método eletroquímico. Titânio deve ser protegido por uma camada de óxido de titânio, que é formada em contato com ar ou água. A espessura da camada de óxido se produz em poucos segundos (Balshi et al.⁵⁶ 2005, Brechter et al.⁵⁷ 2005).

B.2.4. DEPOSIÇÃO DE ÍON: é obtido com o bombardeio de íons de hidroxiapatita em alta velocidade e alta temperatura, resultando em uma camada nanométrica sobre a superfície do implante. Esta técnica também pode ser realizada em cerâmica (Kim et al.⁵⁸ 2005, Lacefield⁵⁹ 1998).

Dependendo do fabricante existem diferentes tipos de tratamentos de superfícies que podem combinar um tipo de tratamento com outro, ou ser aplicado um deles em uma parte mais coronal, e outra numa parte mais apical do implante.

A nova tendência para tratamento de superfície de implantes combina os tratamentos já explicados com peptídeos, fatores de crescimento ou cerâmica de fosfato de cálcio, permitindo uma rápida e previsível osseointegração, além da integração de tecidos moles, e diminuição da perda de osso, entre outros fatores, a fim de garantir um plano de tratamento ao paciente a longo prazo.

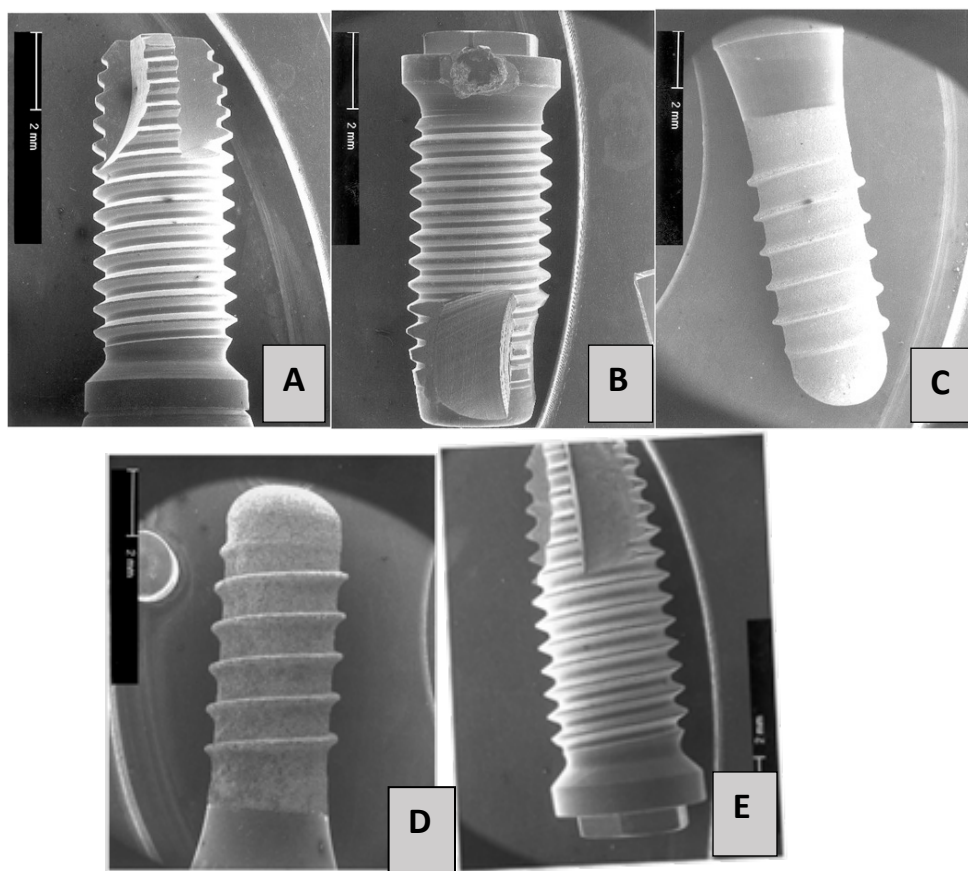


Fig. 3. Fotografia de cinco implantes com diferentes tratamentos de superfície. (A) Liso; (B) SLA;(C) TPS;(D) Com bordas cortantes nas roscas; (E). Com microtexturas. Fonte: (Massaro et al.² 2002)

As conclusões dos vários trabalhos com diferentes tratamentos de superfícies mostraram maior do contato osso-implante em comparação com as superfícies lisas (usinadas), o que pode levar ao acúmulo de mais bactérias, como demonstraram nos estudos de (Dhir¹⁸ 2013, Teughels et al.¹⁹ 2006, Subramani et al.²⁰ 2009, Nelson et al.⁶⁰ 1997).

Essa aderência bacteriana pode ser devido não só às características da superfície do titânio, mas também por um pobre selamento biológico na área de conexão entre o implante e as próteses (má adaptação do pilar transmucoso ao implante), como consequência de reabsorção óssea acompanhada pelo tecido gengival (que clinicamente permite que sejam visualizadas as roscas ou espirais dos implantes), e nos casos de profundidade de sondagem maior que 3 mm pela dificuldade higienização. Nesses casos, a retenção de biofilme é facilitada e a sua remoção é dificultada, levando ao acúmulo de biofilme com predomínio de bactérias Gram negativas, o que gera produção de endotoxinas, como lipopolissacarídeos, permitindo o desenvolvimento de doenças, como mucosite ou periimplantite, que se não são controlados levam à perda de osso, com comprometimento da funcionalidade e da estética, diminuindo qualidade de vida do paciente.

2.4 . MICROBIOLOGIA PERIIMPLANTAR

Em pacientes com implantes, o sulco periimplantar possui bactérias similares ao do sulco periodontal (Papaioannou et al.⁶¹ 1996). Segundo (Lindhe e Meyle⁶² 2008), as estruturas periimplantares não tem uma capacidade regenerativa tão rápida e eficiente quanto o tecido de proteção e suporte dos dentes, sendo esta uma das diferenças entre o tecido periodontal e tecido periimplantar.

A ausência de ligamento periodontal e fibras de Sharpey no tecido periimplantar é outra das diferenças entre tecidos periodontais e periimplantares. Quando o estabelecimento da doença periimplantar se faz presente, caracteriza-se por ter uma maior extensão de infiltrado inflamatório e resposta imunológica

inata do que a periodontite, tendo como resultado uma maior destruição dos tecidos e uma progressão mais rápida da doença (Belibasakis⁶³ 2006).

O valor de testes microbiológicos é muito importante após os sinais clínicos ou radiológicos da doença periimplantar terem sido detectados, e o dentista tem que decidir como lidar com o problema de acordo com os diferentes tipos de tratamentos existentes (Mombelli et al.⁶⁴ 1987).

As bactérias frequentemente vivem em comunidades mistas organizadas, denominadas biofilmes, que estão ligados a uma superfície, podendo ser tanto do dente quanto de um material como o implante. O biofilme é definido como uma comunidade séssil de células que estão irreversivelmente ligados a um substrato, incorporadas a uma matriz extracelular de substâncias poliméricas (Costerton et al.⁶⁵ 2005), gerando um ambiente resistente ao sistema imunitário local e aos antibióticos (Lang et al.²⁴ 2004, Mombelli et al.⁶⁴ 1987, Zitzmann et al.⁶⁶ 2004), sendo necessária a remoção mecânica do biofilme para diminuir os sinais das doenças.

A colonização bacteriana e maturação do biofilme depende de um ambiente ecológico favorável que disponha dos nutrientes necessários para a sobrevivência das bactérias, levando a mudanças na composição e comportamento da microbiota endógena, que pode se tornar intolerável pelos tecidos, originando doenças periimplantares. Os cimentos de próteses, que ficam nos tecidos periimplantares, podem servir como retentores de presença bacterianas e desenvolvimento do biofilme, o que pode levar ao desenvolvimento da periimplantite ou mucosite (Thomas e Nakaishi²¹ 2006).

Saúde periodontal e periimplantar é representada pela existência de um equilíbrio entre as bactérias do biofilme e a resposta do hospedeiro.(Marsh⁶⁷ 2003). De acordo com a hipótese de placa ecológica quando mudanças no ecossistema do biofilme alteram o equilíbrio entre biofilme e resposta do hospedeiro, pode instalar-se um processo patológico. Uma das características do biofilme na cavidade bucal é o ecossistema dinâmico, e as espécies predominantes podem

mostrar uma maior virulência e atuar como patógenos oportunistas, causando doenças no hospedeiro (Costerton et al.⁶⁵ 2005).

A formação da biopelícula nos implantes dentais segue os mesmos padrões da colonização microbiana dos dentes. (Kalykakis et al.⁶⁸ 1998) Porém, as superfícies dos implantes iniciam a colonização bacteriana alguns minutos após a instalação, diferentemente do que acontece com os dentes, os quais estão constantemente expostos aos microrganismos chamados colonizadores primários ou iniciais (Li et al.⁶⁹ 2004).

A aderência bacteriana inicial é fraca e reversível na superfície do implante, o que posteriormente ajuda nessa interação bactéria/superfície, pela força de adesão e coesão, definidas ambas como energia de superfície livre (SFE), que determinam as propriedades de umectação, aumentando a colonização bacteriana dos pilares de titânio (Quirynen et al.⁷⁰ 1994).

Depois da instalação do implante na boca do paciente, ele está recoberto com plasma e matriz extracelular do organismo, que juntamente às bactérias competem pelas superfícies do implante (Herrmann et al.⁷¹ 1993).

Segundo (Furst et al.⁷² 2007), a biopelícula se faz presente no implante 30 minutos depois de exposto ao meio bucal. A presença de albumina fornece nutrientes que permitem a colonização primariamente pelos cocos Gram positivos, bacilos e espécies de *Actinomyces*. Posteriormente colonizados por *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, microrganismos responsáveis por causar e levar à progressão da periimplantite e da periodontite.

A osseointegração ao redor dos implantes dentais é muito influenciada pela rugosidade da superfície (do Nascimento et al.⁷³ 2008), sendo este um fator para aumentar a taxa de formação microbiana ao redor do implante. A união dos microrganismos à superfícies duras (dente / implante), além da interação com os componentes dos tratamentos de superfície, também requer características específicas como umectação, hidrofobicidade e energia superficial (SFE). Este fato foi demonstrado no estudo de (Quirynen et al.⁷⁴ 1993) pois maior aderência de

cocos (81%) foi observada na superfície de titânio lisa, em relação a superfície tratada (64,2%), a qual apresentou maior rugosidade.

Em um estudo anterior, (Quirynen et al.⁷⁵ 1990) relacionaram rugosidade superficial do titânio com a formação de biofilme em uma avaliação de 96 horas. Os resultados demonstraram um aumento de crescimento microbiano, ressaltando a contribuição significativa que a rugosidade da superfície pode apresentar para o aumento do acúmulo de biofilme.

A microbiota de tecidos periimplantares saudáveis é geralmente composta por cocos Gram positivos, facultativos e bacilo (Mombelli et al.⁶⁴ 1987), além disso (Harris et al.⁷⁶ 2002), mostraram a presença de *Staphylococcus aureus* ao redor do implante, microrganismo este que não é encontrado no biofilme dos dentes.

Outro fator importante para o acúmulo de biofilme no implante é a presença dos elementos (abutment) de interface entre o implante e a prótese. Segundo (Zitzmann et al.²⁹ 2002), existem microespaços de 40 a 60 micrometros entre estas peças o que podem levar à colonização por microrganismo e a presença de infiltrado de células inflamatórias. A adesão inicial de biofilme nos implantes começa em áreas de elevada umectação (característica do titânio) e no interior de cavidades e ranhuras das superfícies rugosas, dificultando a eliminação do biofilme (Teughels et al.¹⁹ 2006).

Os microespaços, encontrados entre o implante e o pilar transmucoso, permitem micromovimentos nos momentos de funcionalidade ou mastigação, o que leva a uma infiltração de líquido e ao aumento da colonização bacteriana no local. Com isso, estes microespaços se tornam fonte potencial de contaminação microbiana, e afeta a saúde e integridade dos tecidos biológico ao redor do implante osseointegrados. (Quirynen⁷⁷ 1994, do Nascimento et al.⁷⁸ 2009).

A microbiota nos casos de periimplantite têm alta prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Sendo que, no estudo *IN VITRO* de (Blankenship e Mitchell⁷⁹ 2006), *Candida albicans* também

apresentam maior aderência em implantes de titânio. A transição da saúde à doença na periimplantite provoca uma mudança da microbiota, a predominância de microrganismos Gram-positivos dá lugar para o predomínio de microrganismos Gram-negativos. (Nelson et al.⁶⁰ 1997).

A inflamação periimplantar pode resultar da interação entre os materiais e bactérias Gram-negativas, produzindo macromoléculas tóxicas como LPS nos sulcos periimplantar (Massaro et al.² 2002, Nelson et al.⁶⁰ 1997). *Estudos IN VITRO* relatam que *P. gingivalis* e *Escherichia coli* tem afinidade por materiais protéticos. Esta afinidade está relacionada a alguns fatores, tais como, tipo de LPS, tipo de materiais, propriedades de superfície e pH. O aumento da concentração de LPS dentro do sulco periimplantar pode levar ao aumento dos níveis de fluido crevicular, gerando um processo inflamatório e uma resposta imunológica desfavorável. (Knoernschild et al.⁸⁰ 1994).

No estudo de Sedgley 1994 foram avaliados 300 pacientes e determinou-se a prevalência bucal I de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas Gram negativas e leveduras. Observou-se uma prevalência de 41, 7 %, sendo que as *Enterobacteriaceae* compõem 73% das bactérias isoladas, entre elas *E. coli*, com uma prevalência global de 32% (Sedgley e Samaranayake⁸¹ 1994). Na Escócia se encontrou 12 % de 103 adultos com *Enterobacteriaceae*, a diferença em comparação com o estudo anterior pode ser devido a hábitos culturais e dietéticos (Samaranayake et al.⁸² 1989). Segundo (Laforce et al.⁸³ 1976), a *E. coli* foi encontrada na cavidade bucal de voluntários saudáveis, podendo ser um patógeno oportunista e agravar o quadro de doença periodontal e têm sido implicados em casos de doenças periodontais refratárias (Santos⁸⁴ 2002).

2.5 DOENÇAS PERIIMPLANTARES

A proliferação dos microrganismos Gram negativos na superfície do implante acontece nos primeiros 14 dias após a cirurgia. Aos 28 dias do pós-

cirúrgico pode-se observar a colonização de aproximadamente 50% de *Porphyromonas gingivalis* na composição do biofilme (Koka et al.⁸⁵ 1993), o que pode conduzir a uma periimplantite. Estas bactérias podem ter uma associação maior com casos de periimplantite devido à produção de endotoxinas, como o lipopolissacarídeos (LPS), que está associado à patogênese da doença periodontal. Estas toxinas geram efeitos significativos sobre as células inflamatórias, fibroblastos e osteoblastos, levando a um processo inflamatório, inibição do crescimento celular, e cicatrização demorada, além da reabsorção óssea, o que pode provocar a migração dos tecidos moles para a apical.

A afinidade do LPS ao titânio parece ser principalmente devido à energia superficial. As energias de superfície de 20 a 30 dines/cm exibem uma mínima adesão biológica, enquanto que as energias de superfície mais elevadas levam ao crescimento da colonização bacteriana. O aumento da rugosidade superficial pode aumentar a energia superficial (Quirynen⁷⁷ 1994).

Dentre das doenças periimplantares temos a periimplantite, definida como processo inflamatório que afeta os tecidos em torno de um implante osseointegrado em funcionamento, resultando em perda de suporte ósseo. Outra entidade é a mucosite, que é uma inflamação dos tecidos moles, apresentando sangramento e supuração na bolsa, sem sintomas de dor, a mesma pode ser reversível, como relatado na conferência por Albrektsson em 1994. Então, com a hipótese da colonização microbiana dos implantes, a infecção dos tecidos periimplantares pode levar à destruição óssea e, portanto, ao fracasso do implante.

Implantes bem sucedidos mostraram colonização por cocos Gram positivos, enquanto que nos implantes fracassados ou com complicações biológicas foi encontrada uma grande quantidade de bactérias Gram negativas anaeróbias, fusobactérias, espiroquetas, e uma alta porcentagem de *Prevotella intermedia* nos sítios doentes (Fardal et al.⁸⁶ 1999, van Steenberghe et al.⁸⁷ 1993). Maior

reabsorção óssea foi observada em pacientes desdentados com má higiene bucal do que em indivíduos com uma boa higiene (Lindquist et al.⁸⁸ 1988).

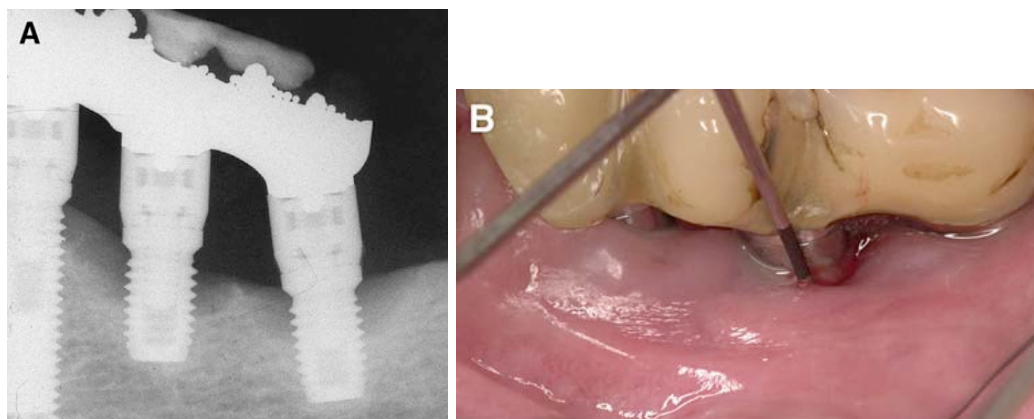


Fig. 4. (A) Radiografia de dois implantes com periimplantite, (B) Avaliação periodontal (PS - 8 mm) em um dos implantes com periimplantite. Observe o sangramento e supuração a sondagem. Fonte: (Klinge et al.³ 2005)

Além da relação de causa-efeito entre periimplantite e acúmulo de bactérias ou sobrecarga oclusal, a periimplantite pode ser correlacionada com histórico de periodontite, tabagismo e também com má higiene bucal. (Subramani et al.²⁰ 2009).

Portanto, similarmente aos dentes, os implantes são desafiados por bactérias, seguindo padrões muito similares ao tecido periodontal (Leonhardt et al.²⁵ 1993). Em uma revisão de literatura, foi observado de 35 a 45% de complicações biológicas dos implantes por periimplantite em próteses totais, próteses parciais fixas e overdentures. (Klinge et al.³ 2005, Berglundh et al.³⁰ 2002).

A mucosite periimplantar se caracteriza pela inflamação, que ocorre no epitélio escamoso estratificado com projeções ao estroma, perdendo tecido

conjuntivo, alterando a microvascularização e aumentando infiltrações de neutrófilos, macrófagos e células T e B. (Dhir¹⁸ 2013).

A mucosa periimplantar pode apresentar menos células dentríticas e células de Langerhans, as quais podem gerar uma resposta inflamatória na superfície do implante. As características histológicas são proporcionais a uma resposta inflamatória mais pronunciada. Em caso de uma periimplantite, se acumulam muito mais rapidamente as células de resposta imunológica inata, além de células T e B em comparação com a mucosite e periodontite, estimulando a perda óssea através da ativação dos osteoclastos, por meio das diferentes citosinas (Zitzmann et al.⁶⁶ 2004, Lindhe et al.⁸⁹ 1992, Berglundh et al.⁹⁰ 1992). O tecido de granulação nos sítios de periimplantite, exibem maior expressão de RNAm de citosinas proinflamatórias como IL6, IL 8 e TNF α , do que nos sítios de periodontite. (Klinge et al.³ 2005).

Os fibroblastos fora do tecido de granulação aumentam a produção de fatores de vascularização e da matriz metaloproteinases além dos receptores do complexo C1q. Além disso, ocorre uma redução da produção dos inibidores de metaloprotease (TIMP's) e também uma diminuição dos fatores de crescimento que estimulam a sínteses de colágeno (Venza et al.⁹¹ 2010).

A falta de higiene bucal, é um indicador de risco de periimplantite (Lang et al.²⁴ 2004), porem a higienização pode alterar ou não a superfície do titânio.

2.6. HIGENIZAÇÃO DA CAVIDADE BUCAL COM IMPLANTES DE TITÂNIO

O titânio como anteriormente dito, tem propriedades favoráveis que permitem a biocompatibilidade (Sivakumar B⁹² 2010). Umas delas é a formação da camada de óxido (TiO₂) que não é solúvel ao meio bucal, além disso apresenta forma amorfa e de baixa cristalinidade, mesmo quando o implante é exposto ao ar ou a soluções.

A camada de óxido atua como uma barreira de proteção contra a corrosão (Huang⁹³ 2007, Ehrensberger et al.⁹⁴ 2008), no entanto, ela não consegue manter a estabilidade da superfície do titânio devido à complexidade química da cavidade bucal, podendo ser destruída ou eliminada. Desta forma, alguns autores sugerem que os íons de flúor que se encontram nos dentífricos, géis e enxaguatório bucais podem causar efeitos sobre o titânio puro ou titânio associado a outros metais, que são propensos à corrosão, (Stajer et al.⁹⁵ 2008). Além disso, estes íons podem afetar a composição química (Mabilleau et al.⁹⁶ 2006, Huang⁹⁷ 2002), topográfica, rugosidade e as propriedades mecânicas (Popa et al.⁹⁸ 2008). No entanto, as estruturas que contêm titânio como implantes, próteses e fios ortodônticos quando instalados na cavidade bucal, precisam ser higienizados por meio da escovação em combinação com dentífricos para evitar a colonização microbiana, e assim, evitar um possível desenvolvimento de doenças periimplantares e periodontais.

A escovação é bem estabelecida como um método eficaz para o controle de biofilme. Apesar da efetividade no controle do biofilme, a escovação pode estar envolvida no desgaste de estruturas dentárias, especialmente se o procedimento de escovação estiver associado ao uso de dentífricos, os quais podem apresentar componentes abrasivos em sua composição, tais como carbonato de cálcio e a sílica (Dhir¹⁸ 2013, Balshi et al.⁵⁶ 2005), que podem afetar também a superfície do titânio no implante.

Em um estudo controlado por (Fais et al.⁹⁹ 2012), superfícies de titânio foram submetidas a escovação simulada (correspondente a cerca de 10 anos), utilizando dentífrico com flúor (1500 ppm) e sem flúor. As análises foram realizadas por meio de microscópio eletrônico de varredura com espectroscopia de energia dispersa de raios X, a fim de comprovar a presença de flúor, titânio puro e Ti-6Al-4V, (Al alumínio, V vanádio). Os resultados demonstraram que a ação abrasiva das cerdas da escova não mudaram a rugosidade média e a topografia do Ti-6Al-4V, apresentando pequenas alterações no Ti puro. No entanto, a análise com o dentífrico contendo flúor demonstrou mudanças significativas na rugosidade

superficial para os diferentes tipos de titânio testados. Diferente das análises realizadas por (Nogues et al.¹⁰⁰ 2008), que não mostraram diferenças significativas na rugosidade do titânio depois do uso do dentifrício com flúor.

Outro fator importante no meio bucal é o pH, que combinado com íons flúor podem degradar a camada de dióxido de titânio (Toumelin-Chemla et al.¹⁰¹ 1996, Campus et al.¹⁰² 2003) demonstraram a presença de flúor por 24 horas na saliva após escovação, o que pode reduzir a rugosidade e aumentar a homogeneidade da superfície de titânio, tornando-se mais lisa. Com isso pode-se diminuir a colonização bacteriana, como relatado por (Barros e de Gouvea³¹ 2010). Porém, existem na literatura trabalhos que indicam o aumento da rugosidade quando a superfície de titânio se encontra em contato com a saliva e íons de flúor (Huang⁹⁷ 2002).

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral comparar a formação de biofilme bacteriano em discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície antes e após procedimentos de escovação simulada, aplicando teste de contagem de crescimento bacteriano de *E. coli*, teste de rugosidade através do microscópio de força atômica, teste de microdureza e teste de microscopia de varredura do campo (FEG).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO

1. Comparar a formação de biofilme de *E. coli* em discos de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície antes e após o procedimento de escovação simulada.
2. Analisar a possível influência do procedimento de escovação simulada na rugosidade superficial de discos de titânio antes e após formação do biofilme.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram avaliados discos de titânio comercialmente puro grau IV com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, os quais foram divididos em grupos 1,2,3 e 4 de acordo com as características da superfície.

Grupo Li: Discos de titânio lisos, os quais não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento de superfície (n=21).

Grupo Jat: Discos de titânio submetidos ao jateamento seguido por ataque ácido (n=21).

Grupo OA: Discos de titânio usinados com superfície lisa submetidos à oxidação anódica (n=21). A oxidação anódica foi realizada por meio de um sistema que consiste em fonte programável DC 600 V 8 A microcomputador para controle, osciloscópio e cuba eletrolítica. Os parâmetros de tratamento (tensão, densidade de corrente, tempo, eletrólitos) foram definidos no decorrer das atividades.

Grupo JT: Discos de titânio submetidos ao jateamento seguido por ataque ácido e oxidação anódica (n=21). Os discos alocados neste grupo foram fornecidos pela Neodent (Curitiba, Brasil) e foi feito o tratamento da superfície de oxidação pelo Laboratório de Física de Materiais do DEFIS com os elementos antes indicados no grupo OA.

Os discos de titânio foram fornecidos pela **Neodent**[®] (Curitiba, Brasil). Sendo que um dos grupos é caracterizado como disco de superfície lisa (Li) e outro grupo apresenta discos caracterizados comercialmente como discos com superfície **Neoporos (Jat)**. O tratamento de superfície por oxidação anódica foi realizado pelo Laboratório de Física de Materiais do DEFIS da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

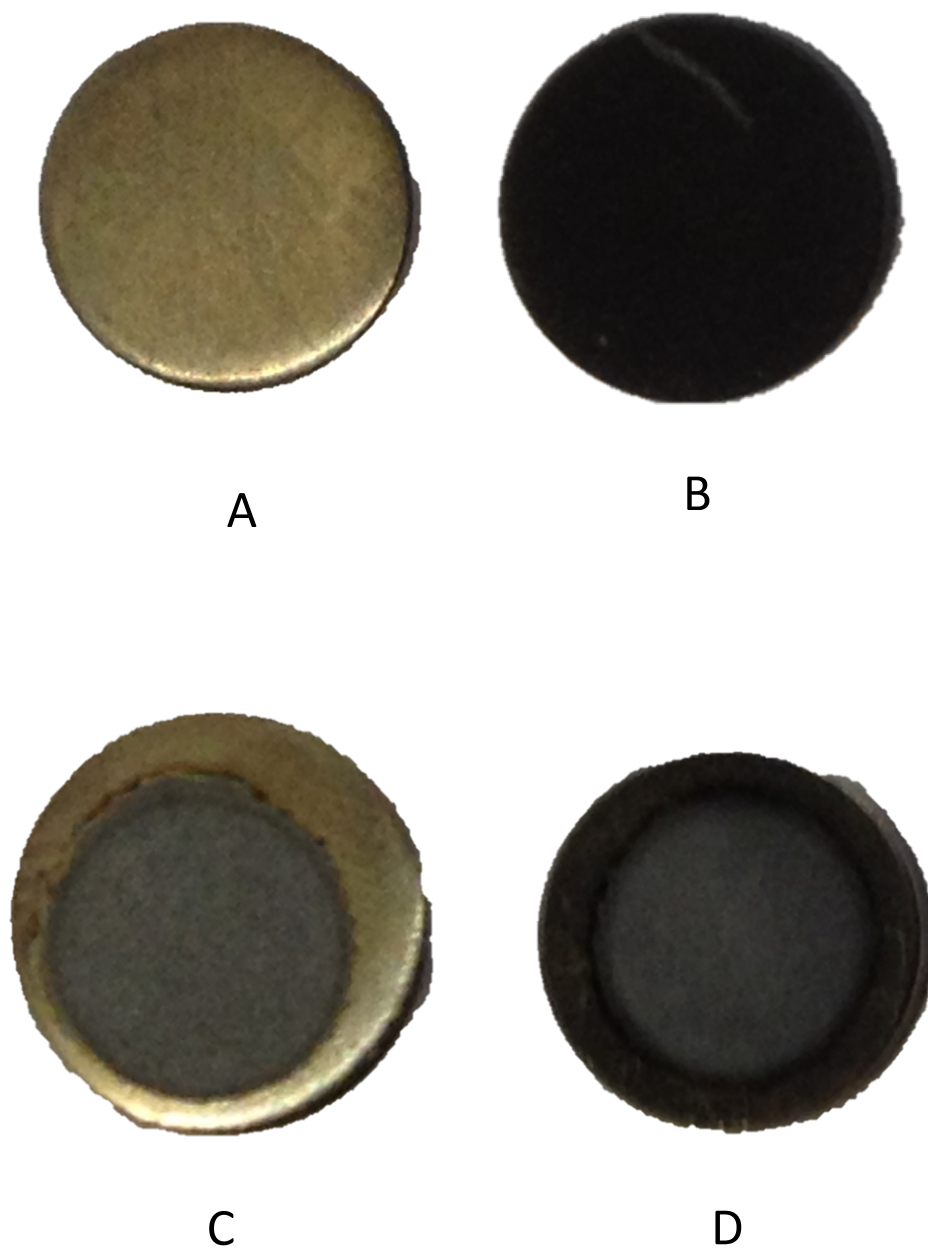


Fig. 5. Espécimes de Titânio e seus diferentes tratamentos de superfície. A disco Liso (Li), B disco jateado (Jat), C disco liso tratado (OA) e D disco jateado tratado (JT). Fonte: autor

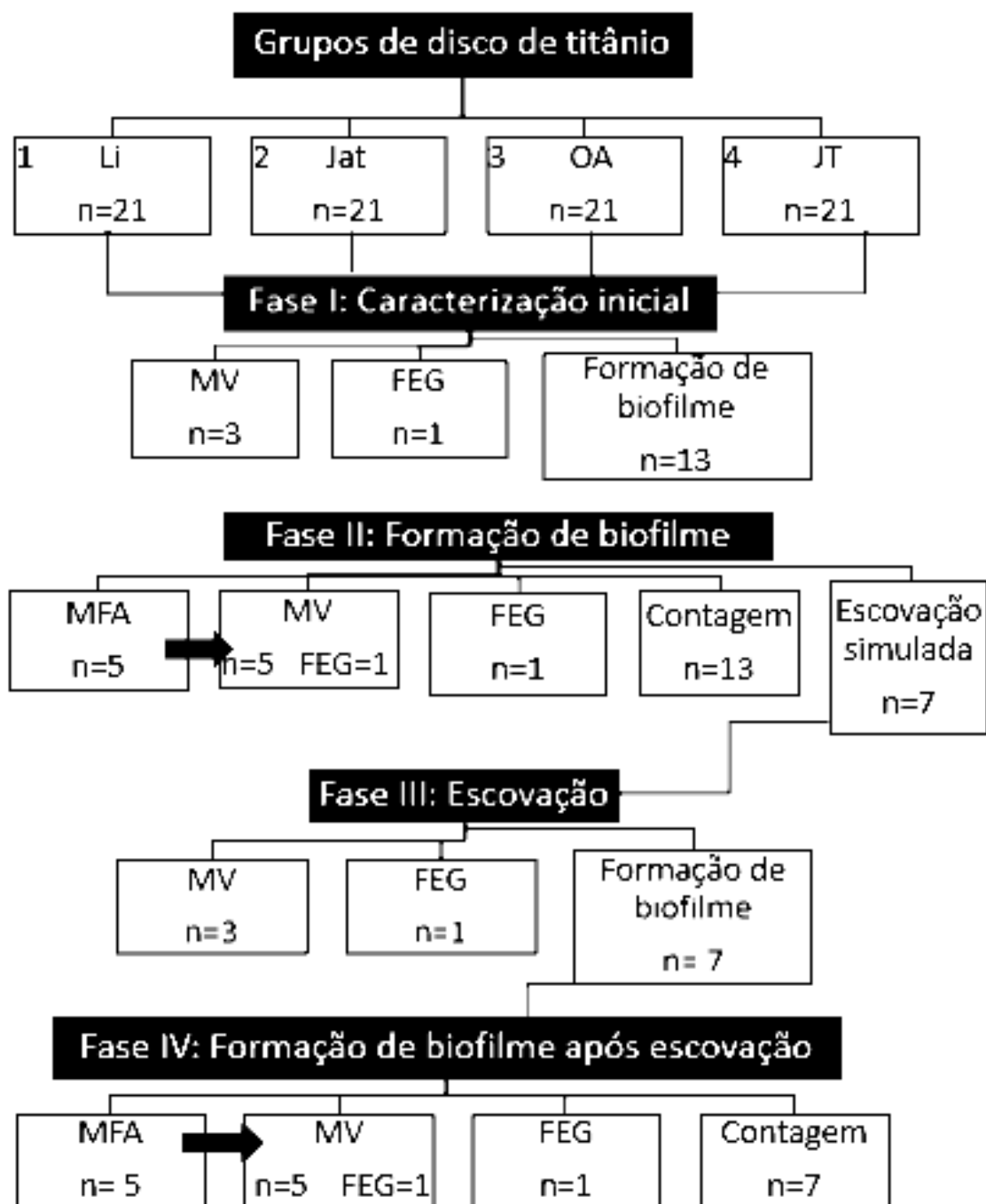


Figura6. Fluxograma da fase experimental da pesquisa. Na fase inicial realizou-se a avaliação de microdureza (MV); avaliação por microscópio de varredura por emissão de campo (FEG) e microscopia de força atômica (MFA). Demais espécimes foram submetidos a formação de biofilme. Na fase II foram realizadas as contagens de microrganismos aderidos (UFC/ml),

sendo que alguns espécimes foram analisados em microscópio de força atômica (MFA), microdureza e FEG. Demais espécimes foram submetidos a escovação simulada. Na fase III os espécimes submetidos a escovação tiveram suas superfícies avaliadas com MV e FEG. Demais espécimes foram submetidos a aderência microbiana e na fase IV foram realizadas a contagem de microrganismos aderidos a superfície dos espécimes, FEG, MFA e microdureza. Fonte: Autor

4.2. FORMAÇÃO DO BIOFILME:

Os espécimes foram confeccionados no fluxo laminar e colocados em uma placa de Petri esterilizada, cada amostra imersa em álcool 70° por 10 minutos, logo colocou-se hipoclorito a 1 % por 3 minutos, novamente os espécimes foram imersos em álcool 70° por 10 minutos, foram lavados com solução fisiológica estéril por 1 minuto, sempre em constante agitação manual. Após secagem, a desinfecção foi finalizada por meio da exposição em luz ultravioleta durante 45 min (cada lado) no fluxo laminar (Yu et al.⁴⁴ 2004). Antes da desinfecção dos espécimes ser realizada, os tubos de ensaio com caldo BHI (Brain Heart Infusion Agar, BHI, Difco) foram mantidos em estufa por 24hs a 37°C, com o objetivo de testar a esterilidade do meio. Após a desinfecção dos espécimes, estes foram transferidos para estes tubos de ensaio com caldo BHI, que novamente foram mantidos em estufa por 24hs a 37°C, com o objetivo de avaliar se a desinfecção aconteceu de forma adequada. Os tubos foram avaliados quanto a turbidez, não havendo crescimento de microrganismos o próximo passo foi realizado: os espécimes foram colocados assepticamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI, e aos tubos foi adicionado 1 mL de suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) em uma concentração de 10^8 células/mL. Esta suspensão foi obtida a partir de colônias de *E. coli* cultivadas em placas de Petri contendo o meio de cultura BHI, diluindo em solução salina estéril em tubo de ensaio e agitados em

vórtex até obter a turvação equivalente ao tubo número um da escala de Mac Farland 0,5. O resultado foi comprovado por meio de análise em espectrofotômetro. Após os tubos contendo *E. coli* foram levados à estufa bacteriológica a 37°C/24 h, com a finalidade de se promover aderência dos microrganismos aos discos de titânio.

Após 24 horas iniciou-se a remoção das células não aderidas: os espécimes foram lavados por imersão agitando a placa levemente por 40 segundos. Em seguida, as espécies foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril e agitados em vórtex por 1 min para desprendimento das células aderidas. O grupo controle foi incubado em caldo estéril por um dia. A não contaminação foi verificada por meio da análise da turbidez do meio.

Com a finalidade de se verificar o número de células aderidas de *E. coli* aos espécimes, os tubos contendo o material desprendido dos materiais testados foram lidos em espectrofotômetro. A quantificação dos microrganismos aderidos aos materiais também foi realizada por meio da diluição da suspensão obtendo-se alíquotas de 0,1 mL da suspensão pura (10^{-1} e 10^{-2}) em tubos com 0,9 mL de solução fisiológica. Então foram semeadas em duplicatas em placas de Petri contendo meio de cultura BHI mantidos em estufa bacteriológica a 37°C/24 h (Barros e de Gouvea³¹ 2010). Após este período foi realizada a contagem das UFC/mL por dois examinadores previamente calibrados.

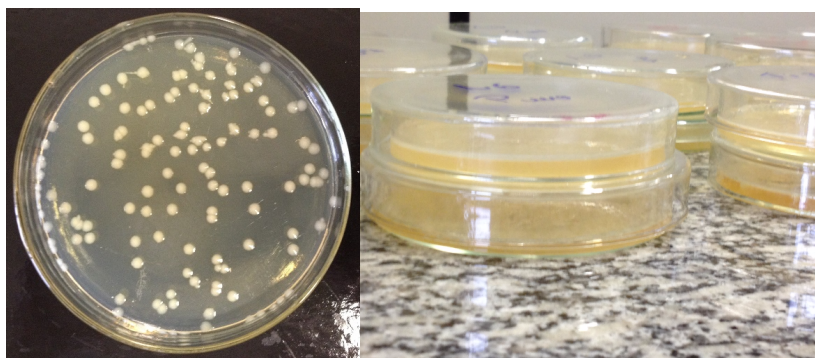


Fig. 7. Crescimento de *E. coli* nomeio de cultura - àgar BHI. Fonte: autor

4.3. ESPECTROFOTOMETRIA

É a medição da quantidade de energia radiante que absorve ou transmite um sistema químico em função do comprimento de onda. O espectrofotômetro é utilizado como instrumento que permite fazer a comparação da radiação transmitida ou absorvida de uma solução com conteúdo de soluto desconhecido e uma quantidade conhecida da mesma substância, ou seja, esta técnica mede a quantidade de luz absorvida com a função do comprimento de onda. Neste estudo utilizamos 580 nm de comprimento de onda, esta, é a luz visível que vai de 380 a 780 nm. Com esta técnica, verificou-se a turbidez da solução salina após desprendimento das células bacterianas aderidas nos discos de titânio e seus diferentes tratamento de superfície.



Fig. 8. Espectrofotômetro analógico (Micronal, Brasil). Fonte: autor

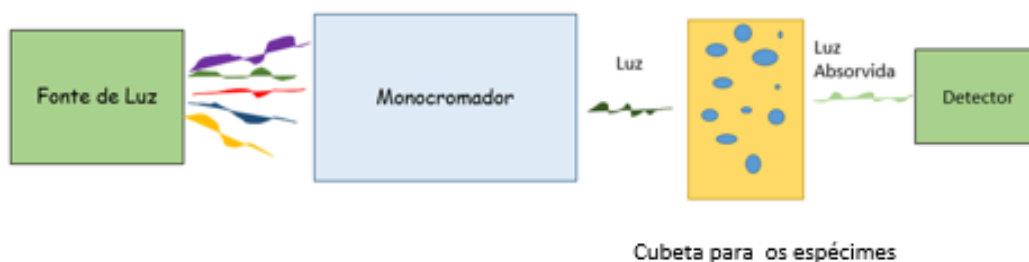


Fig. 9. Funcionamento do espectrofotômetro. Fonte: autor

4.4. ESCOVAÇÃO SIMULADA

Os espécimes foram submetidos à escovação por meio de uma máquina de escovação (MSEt – 1500W de potência e tensão de 220 Vac-60 Hz + terra, peso aproximado de 70Kg), a 20.000 movimentos (Tanoue et al.¹⁰³ 2000), que correspondem a dois anos de escovação, com uma carga de 400gf (Kawai et al.¹⁰⁴ 1998). As escovas utilizadas foram de cerdas de nylon (cabeça 25 e 32 mm por 8 e 11 mm de largura; tufos: 3x6,3x8 fileiras; cerdas artificiais de nylon macias com pontas arredondadas). Os espécimes foram submetidos a escovação com dentifrício Colgate®MFP por ser consumido em larga escala no comércio nacional, classificado como de média abrasividade.



Fig.10. Máquina de escovação (Mset, Brasil). Fonte: autor

4.5. TRATAMENTO POR OXIDAÇÃO ANÓDICA

Para fazer o tratamento de superfície dos discos de titânio procedeu-se da seguinte forma:

4.5.1. PREPARO DA SOLUÇÃO DA Ca/P

Esta solução foi utilizada para fazer o tratamento de superfície por oxidação anódica.

1. 0,14 mol/L acetato de cálcio monohidratado (CH_3COO)₂ COH_2O
2. 0,06 mols/ L monofosfato de sódio ($\text{Na H}_2\text{PO}_4 \text{H}_2\text{O}$)

1. MM acetato: $4(12) + 8(1) + 5(16) + 40(1) = 176 \text{ g/mol}$
2. MM monofosfato: $23(1) + 4(1) + 31(1) + 5(16) = 138 \text{ g/mol}$

$$1. \text{ Massa acetato} = 1\text{L} \times \frac{0,14\text{mol}}{1\text{L}} \times \frac{176\text{ g}}{1\text{mol}} = 24,64 \text{ g de acetato}$$

$$2. \text{ Massa monofosfato} = 1\text{L} \times \frac{0,06\text{mol}}{1\text{L}} \times \frac{138\text{ g}}{1\text{mol}} = 9,36 \text{ g de monofosfato}$$

4.5.2. ACABAMENTOS DOS ESPECIMES

- Os espécimes lisos foram lixadas com uma pressão constante a 60 RPM, giro 90 ° e foram lavadas no ultrassom com o seguinte protocolo:
 - ✓ Acetona 15 minutos.
 - ✓ Álcool isopropílico 15 minutos.
 - ✓ Água destilada 15 minutos.
- Os espécimes com tratamentos jateado foram lavadas no ultrassom com o seguinte protocolo:

- ✓ Acetona 15 minutos.
- ✓ Álcool isopropílico 15 minutos.
- ✓ Água destilada 15 minutos.

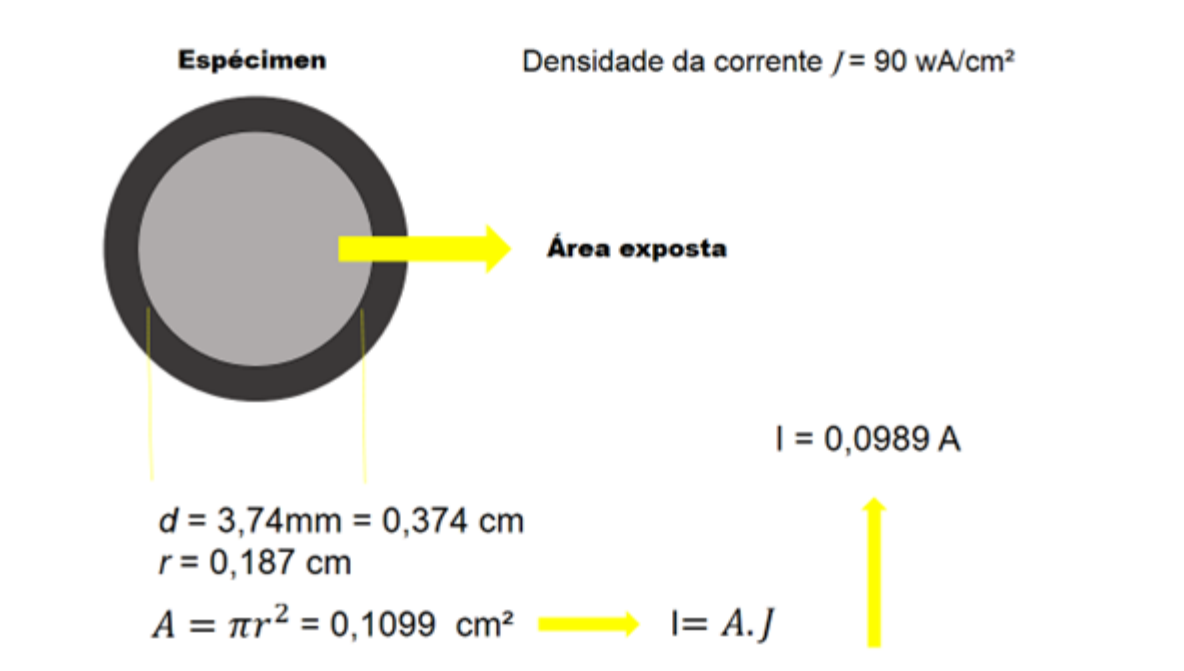


Fig.11. Fórmula de intensidade e área exposta para fazer o tratamento de superfície de titânio. Fonte: autor

O Tratamento com oxidação anódica é o método utilizado para a preparação da superfície de óxido de titânio. Este tratamento é uma técnica eletroquímica, ou seja, consiste em obter uma camada de óxido de titânio de maior espessura com melhores características de proteção por meio dos processos químicos e eletrolíticos. O oxigênio vem da dissociação eletrolítica da água para fazer a oxidação. O processo foi por meio de corrente contínua, com uma densidade de corrente de 90 wA/cm^2 determinados por trabalhos anteriores (V. Zwilling a¹⁰⁵ 1999), a carga elétrica foi aplicada durante 100 seg. com uma corrente contínua de 0,03 A.

Para fazer a oxidação anódica os espécimes foram adaptados em uma caixa de acrílico confeccionada para tal fim. Uma borracha foi utilizada para vedar o espaço entre o espécime e o acrílico para evitar o vazamento da solução de fosfato de cálcio. Colocou-se a solução de CaP na caixa até cobrir a amostra. O eletrodo foi lixado e colocado no interior da caixa acrílica paralelamente ao espécime, este eletrodo é o condutor ou polo negativo.

A caixa acrílica tinha um pistilo, o qual ajudava a manter a solução homogênea com o agitador (Tecnal, Brasil). O polo negativo foi posicionado no parafuso da caixa em contato com o espécime a ser tratado e o polo positivo foi colocado no eletrodo que estava dentro na caixa de acrílico. Uma vez conferido todo o equipamento, o processo de tratamento foi iniciado utilizando-se um computador de 220V com o programa Chorma 62000P Solt Panel o qual produziu a corrente contínua para se obter a oxidação.

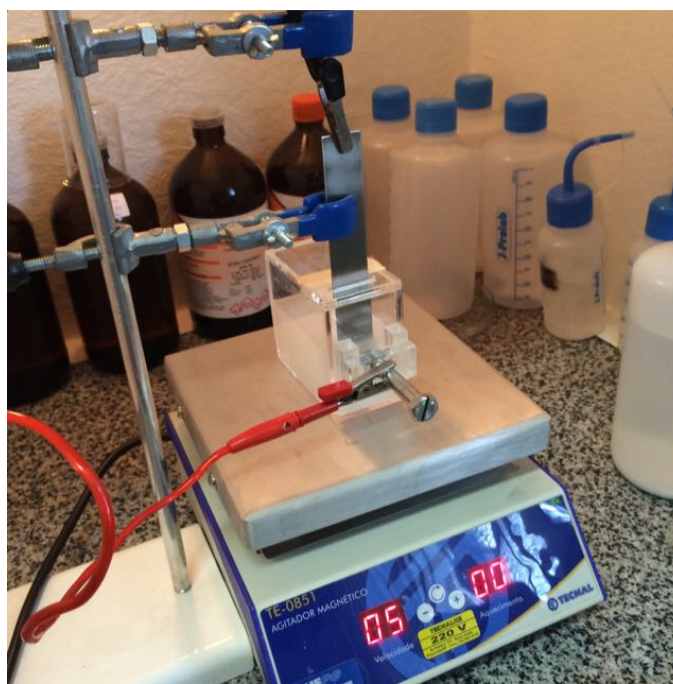


Fig.12. O tratamento de superfície por oxidação anódica foi realizado pelo Laboratório de Física de Materiais do DEFIS da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fonte: autor

4.6. MICRODUREZA

O ensaio de Microdureza foi feito para medir a dureza ou à oposição que oferece as diferentes superfícies tratadas das amostras de titânio e ver suas alterações de rasgadura, penetração, cortaduras, deformações permanentes, entre outras, ou seja, a resistência à deformação plástica localizada sendo ela permanente ou não recuperável (W.D¹⁰⁶ 1999) Utilizou-se uma ponta Vickers em forma de uma pirâmide de diamante com ângulo de diedro de 136°, com uma força de 50 gf, 100 gf, 200 gf e 300 gf, contra a superfície do material de titânio por 15 segundos, as avaliações realizadas foram realizadas na fase de controle sem formação de biofilme, na fase após a formação de biofilme, na fase de escovação sem formação de biofilme e na fase escovação e após formação de biofilme.

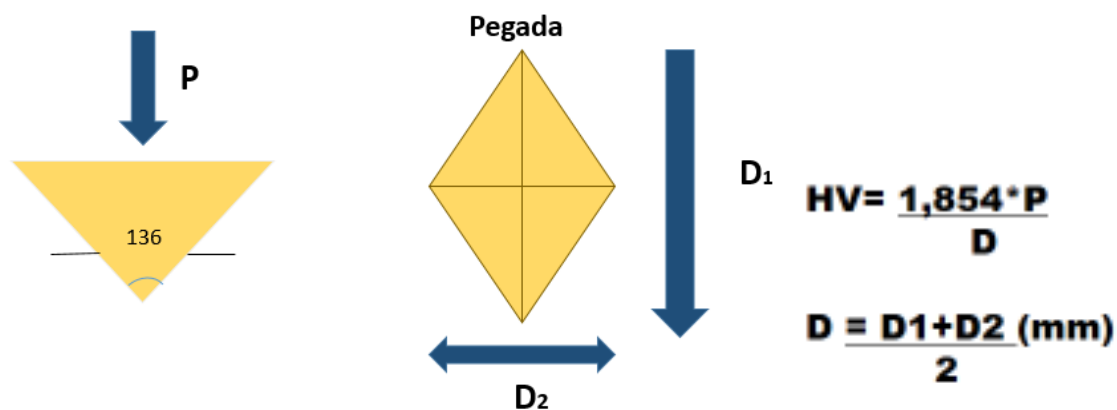


Fig.13. Imagem da angulação da ponta de diamante do microdurômetro.

Fonte: autor



Fig. 14. Microdurômetro. O equipamento utilizado foi Shimadzu modelo (HMV-2. Japão). Fonte: autor

As amostras foram marcadas e divididas com uma caneta em três partes. Indentações foram realizadas em cada uma das partes, com as cargas anteriormente citadas. Os espécimes foram fixados na plataforma do microdurômetro com cera de utilidade para evitar a movimentação no momento da indentação.

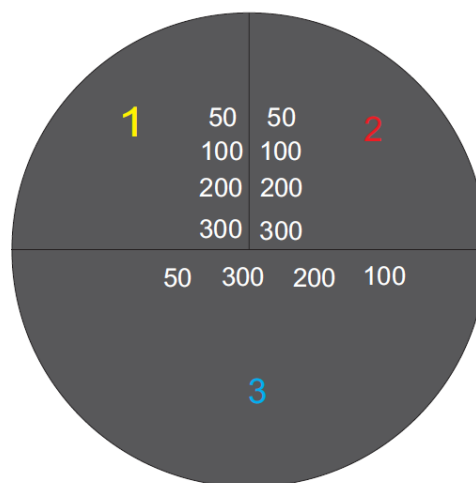


Fig.15. Imagem da divisão das amostras de titânio para o teste de microdureza. Fonte: autor

Os ensaios de Microdureza de Vickers das amostras tratadas e lisas foram realizadas no Laboratório da Pós Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.7. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para avaliação da rugosidade superficial, os espécimes foram escaneados por um microscópio de força atômica em 3 diferentes áreas, para obter 15 medidas de rugosidade para cada grupo teste. Um microscópio de força atômica (SHIMADZU SPM 9600) foi utilizado para avaliar as alterações nas superfícies dos materiais (Giessibl¹⁰⁷ 2003).

Já obtidos os resultados, estes foram expressos em rugosidade média (Ra), que é a média aritmética dos valores absolutos das alturas e medida a partir de uma linha central para fazer a estatística.



Fig. 16. Esquema da definição de rugosidade média. Fonte: autor

Resumidamente, o funcionamento do MFA é baseado na medida da força de interação entre uma sonda muito fina e a superfície lisa ou tratada dos discos de titânio. A sonda é um cantilever flexível com uma ponta aguda em uma de suas extremidades. Quando sonda - amostra interagem, a força que pode ser inicialmente de Van de Waals ou de atração é repulsada pelas forças de coulombiana, ou seja, interação núcleo – núcleo, elétron – elétron, com a aproximação da ponta na superfície da amostra, ocorre flexão do cantilever e esta deflexão ou movimento pode ser detectada por um feixe de laser (Giessibl¹⁰⁷ 2003).

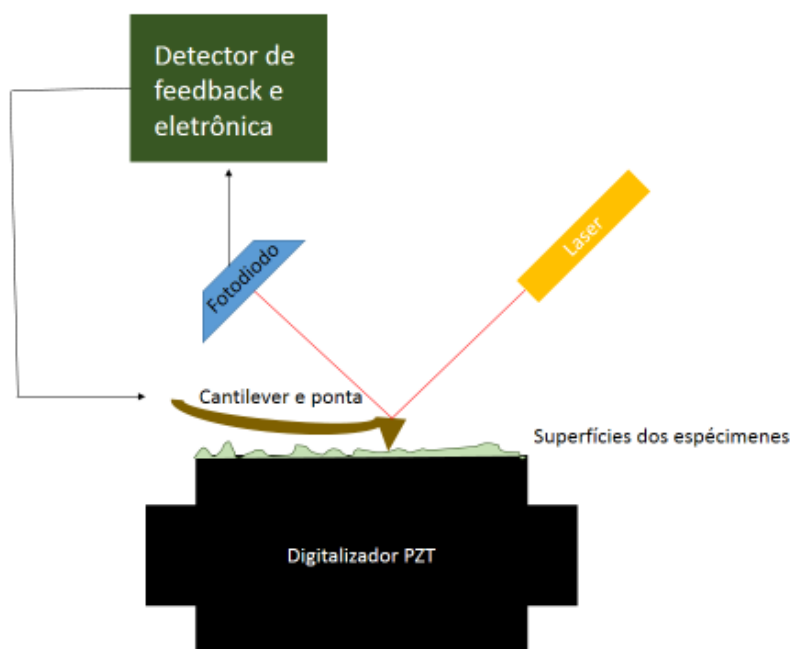


Fig. 17. Desenho do funcionamento da microscopia de força atômica. Fonte. Autor

O MFA possui dois modos de uso: contato e semi – contato.

Contato: o ápice da ponta está em contato direto com a superfície, a força entre os átomos da ponta e da amostra é contrabalanceada pela força elástica devido à deflexão do cantilever. A força repulsiva de curto alcance que ocorre no

ápice da ponta é mais sensível às características topográficas das amostras e proporciona alta resolução da imagem, mas o contato direto pode causar danos na superfície e é inadequado para as amostras macias (Giessibl¹⁰⁷ 2003).

Semi – contato: o cantilever oscila perto da frequência de ressonância, com amplitude de 10 a 100 nm. O cantilever é aproximado da superfície de forma que a ponta entra em contato com a superfície no ponto mais baixo da oscilação e as variações na amplitude e na fase da oscilação durante a varredura são registradas. (Giessibl¹⁰⁷ 2003).

A ponta do MFA utilizada nesta pesquisa foi a de semi contato, permitindo que os mesmos espécimes sejam utilizados para avaliar rugosidade e microdureza.

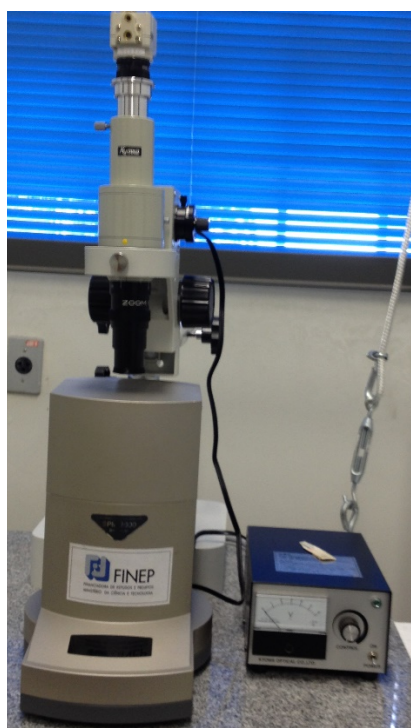


Fig.18. Microscopia de Força Atômica. (Shimadzu SPM 9600, Japão). Fonte: autor

4.8. FEG. MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO

Este equipamento permite a obtenção de imagens da superfície de uma amostra com alta resolução e elevada profundidade de foco. Esta análise foi utilizada para avaliar as características superficiais dos espécimes antes e após a formação de biofilme.

O canhão de elétrons por emissão de campo do microscópio envia um feixe fino de elétrons de alta energia através de diferentes lentes magnéticas que controlam sua focalização na superfície das amostras. Enquanto o feixe de elétrons primário vai varrendo a amostra, produz-se elétrons secundários, que são coletados e amplificados para fazer o sinal elétrico, ou seja, fornece a imagem da topografia da superfície. Geralmente emite um feixe de alta corrente com diâmetros de 5 a 10 nm, o que proporciona uma maior resolução evitando ruídos na imagem. Para a análise os espécimes foram fixados por meio do seguinte protocolo (Ichinokawa¹⁰⁸ 1989).

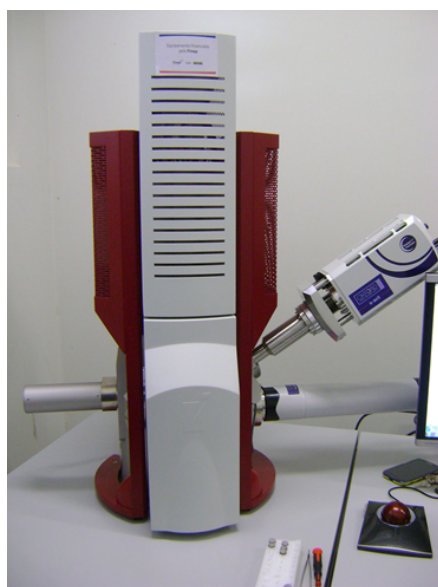


Fig. 19. Imagem do FEG (Shimadzu, Japão). Fonte: autor

4.8.1. FIXAÇÃO DE BACTÉRIAS NOS ESPÉCIMES PARA A LEITURA NO FEG (Castillo et al.¹⁰⁹ 2005)

1. Fixou-se os espécimes por 4 horas com glutaraldeído a 2.5%.
2. Lavou-se por quatro (4) vezes com PBS. (1 minuto).
3. Lavou-se por duas vezes com água destilada. (1 minuto).
4. Desidratou-se com álcool etanol a 60 %, 70%, 80%, 90% e por último três vezes com 100%, cada uns deles por 10 minutos.
5. Colocou-se no dessecador com sílica por 48 horas.



Fig. 20. Dessecador contendo sílica. Fonte: autor

Observou-se as características estruturais da superfície de titânio no microscópio FEG com magnitude entre **5 Kx**, **10Kx** e **15 Kx** e para analisar o microdureza uma magnitude de **4 Kx**.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade para determinar se são paramétricos ou não. Posteriormente, os dados da formação de biofilme com *E. coli*, rugosidade e microdureza foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de um fator e teste de Tukey para contraste das médias. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prisma. Para os dados anormais da aderência medidos em espectrofotômetro utilizou o teste estatístico Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn's com um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Crescimento e adesão do biofilme aos espécimes antes e após escovação

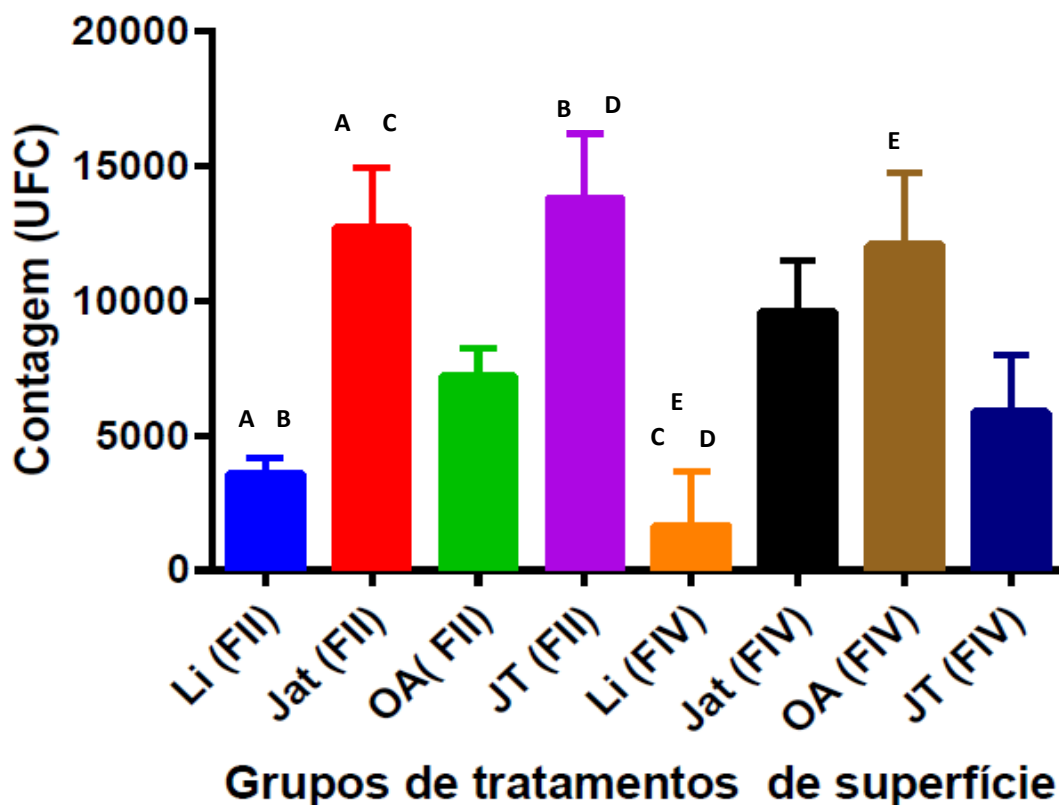


Fig. 21. Gráfico demonstra a média e o erro padrão das UFC/ ml – Aderência de *E. coli* antes e após escovação simulada dos diferentes tratamentos de superfície testados foram submetidos a um ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), tendo como resultado um p 0,0004. Diferenças significativas foram indicadas com letras (A, B, C, D, E): entre o grupo Li (FII) e os grupos Jat e JT (FII); o grupo Li (FIV) e os grupos Jat e JT (FII); o grupo Li (FIV) e o grupo OA (FIV). Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases

dos experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme, FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme.

Quadro 1. Avaliação da aderência de *E.coli* nas superfícies dos discos de titânio antes e após escovação com dentífrício, medição feita por meio da técnica de espectrofotometria com uma comprimento de onda de 580 nm.

Aderência de <i>E. coli</i> medição com espectrofotômetro								
Fase II					Fase IV			
Espécimes/Grupos	Li	Jat	OA	JT	Li	Jat	OA	JT
1	0	0,01	0	0	0	0	0	0
2	0,01	0,03	0	0,01	0,1	0	0	0,01
3	0	0,02	0,01	0	0	0	0	0
4	0	0,02	0	0	0	0,02	0	0
5	0	0	0,01	0,01	0	0,05	0	0
6	0,05	0,04	0,01	0	0,01	0,01	0	0
7	0,05	0,01	0,07	0,01				
8	0,01	0,06	0,01	0				
9	0,01	0,09	0,04	0,01				
10	0	0	0,03	0,01				
11	0,01	0,01	0,02	0				
12	0	0,01	0,03	0,01				
Média	0,01166	*	0,01916	0,005	0,018333	0,005	* 0	0
Desvio padrão	0,0185	0,0268	0,02065	0,005222	0,04021	0,01966	0	0,004082

Por meio do teste de Kruskal Wallis $P < 0,05$, diferenças significativas $p = 0,0093$ e por meio do pós-teste de Dunn's * diferença no grupo Jat (FII) e OA (FIV)

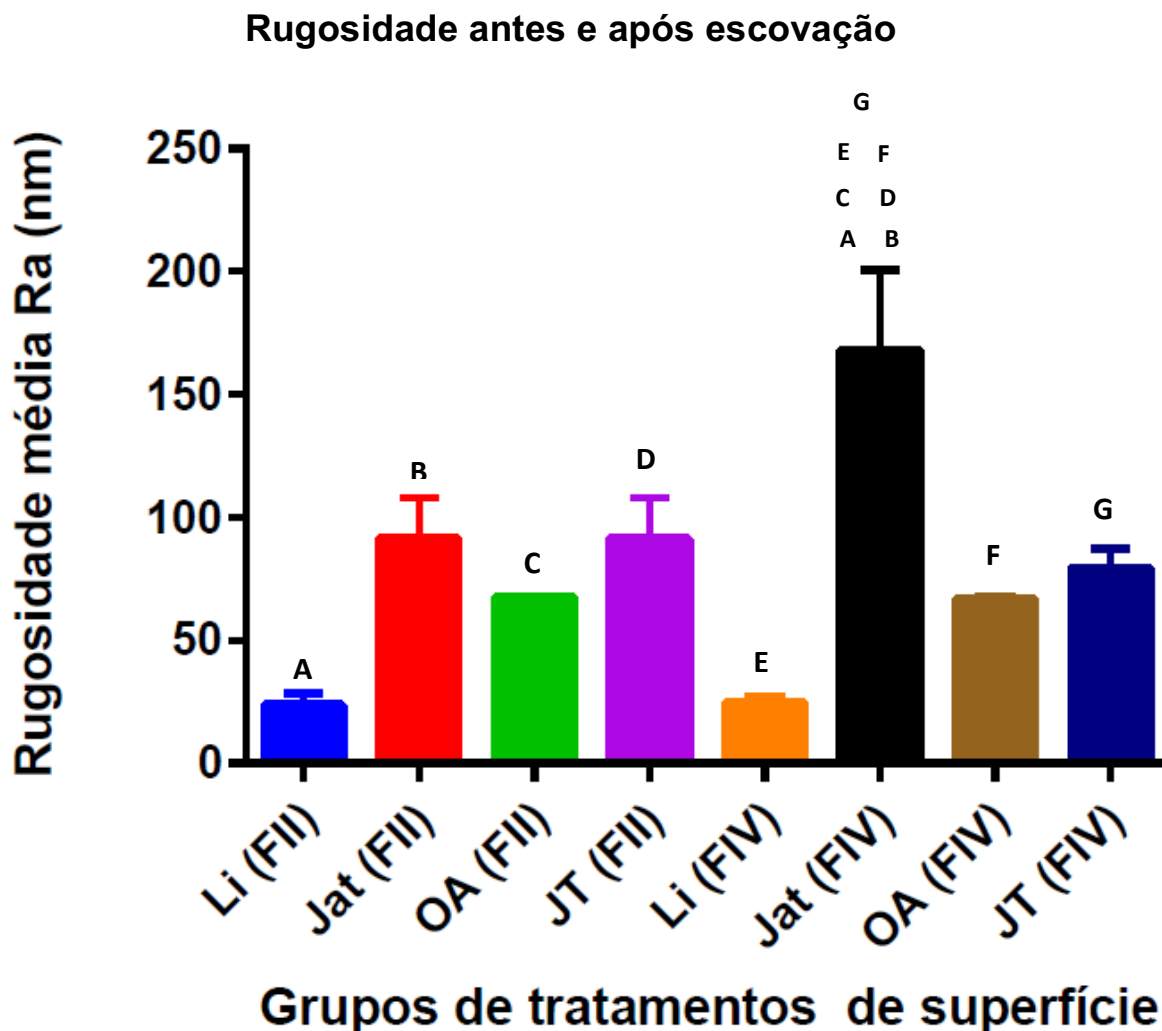


Fig. 22. Gráfico demonstra a média e erro padrão da rugosidade nas fases de aderência microbiana antes e após escovação simulada (II e IV) para os diferentes tratamentos de superfície testados. Análise estatística: ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) tendo como resultado $p < 0,0001$ nas diferenças significativas indicados com letras (A, B, C, D, E, F, G): entre os grupos Li, Jat, OA, JT da (FII) e o grupo Jat (FIV); os grupos Li, OA, JT (FIV) e o grupo Jat (FIV). Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases dos

experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme,
FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme.

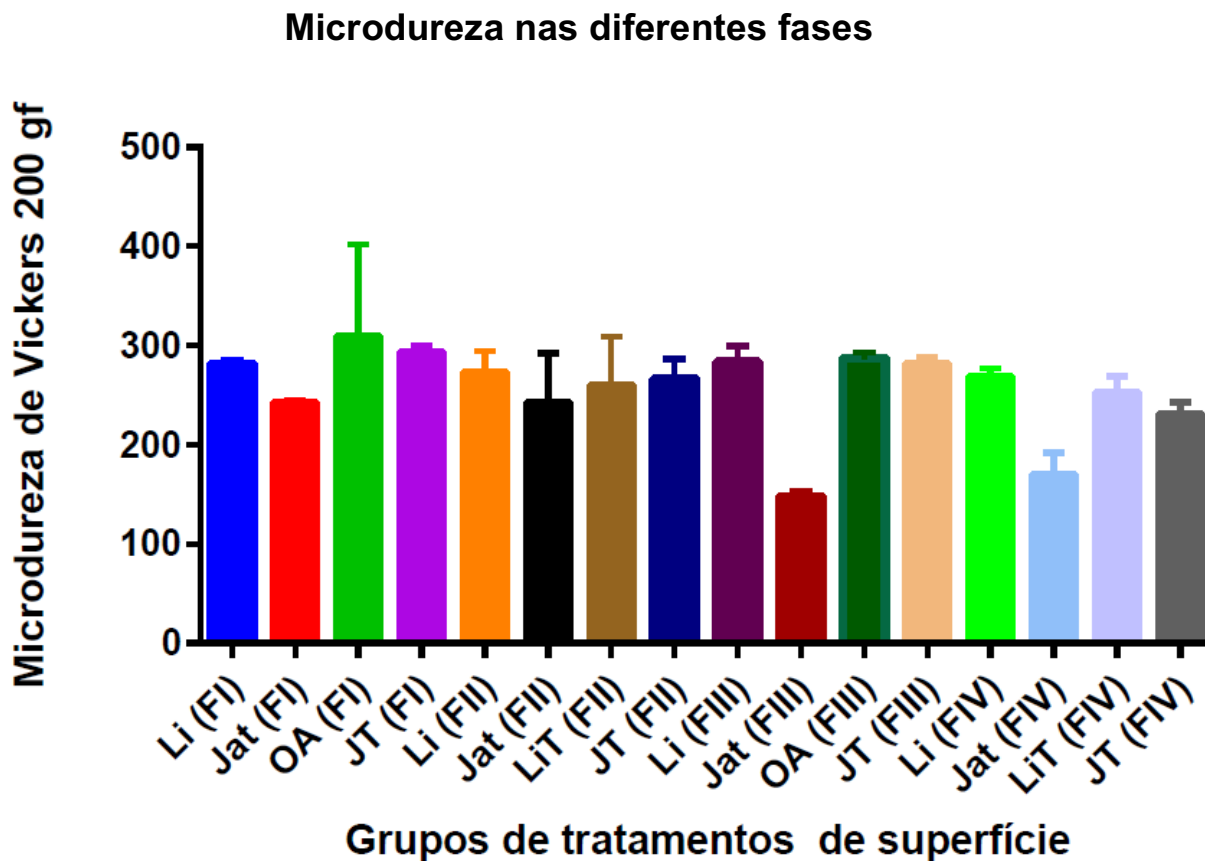


Fig. 23. Gráfico demonstra a média e erro padrão da microdureza dos tratamentos de superfície testados nas fases de referência (I e III) e das fases de aderência microbiana antes e após escovação simulada (II e IV). Análise estatística: ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) tendo como resultado $p = 0,0924$, não houve diferença significativa entre os grupos antes e após escovação e entre grupos antes da escovação e depois da escovação. Tratamentos de superfície: Li= Liso, Jat = Jateado, OA= Oxidação anódica, JT= Jateado com oxidação anódica. Fases dos experimentos: FII= Fase antes da escovação e após formação de biofilme, FIV= Fase após escovação e após formação de biofilme

Quadro 2. Correlação entre aderência de *E. coli* e Microdureza Vickers antes e após escovação de todos os grupos de tratamentos de superfície.

Correlação de Pearson	Contagem UFC	Microdureza de Vickers
Contagem UFC		0,294*
Microdureza de Vickers	0,294*	

Valor de r Pearson= - 0,170. * Valor de $p > 0.05$: Não houve correlação entre aderência bacteriana e microdureza Vickers.

Quadro 3. Correlação entre aderência de *E.coli* e rugosidade (Ra) antes e após escovação de todos os grupos de tratamentos de superfície.

Correlação de Spearman	Contagem UFC	Rugosidade
Contagem UFC		0,006*
Rugosidade	0,006*	

Valor de r Spearman= 0,425. * Valor de $p < 0.05$: Houve correlação entre aderência bacteriana e Rugosidade (Ra).

Quadro 4. Correlação entre Microdureza Vickers e rugosidade (Ra) antes da escovação e formação de biofilme e após da escovação e formação de biofilme.

Correlação de Spearman	Microdureza de Vickers	Rugosidade
Microdureza de Vickers		0,136*
Rugosidade	0,136*	

Valor de r Spearman= - 0,240. * Valor de $p > 0.05$: Não houve correlação entre microdureza Vickers e Rugosidade (Ra).

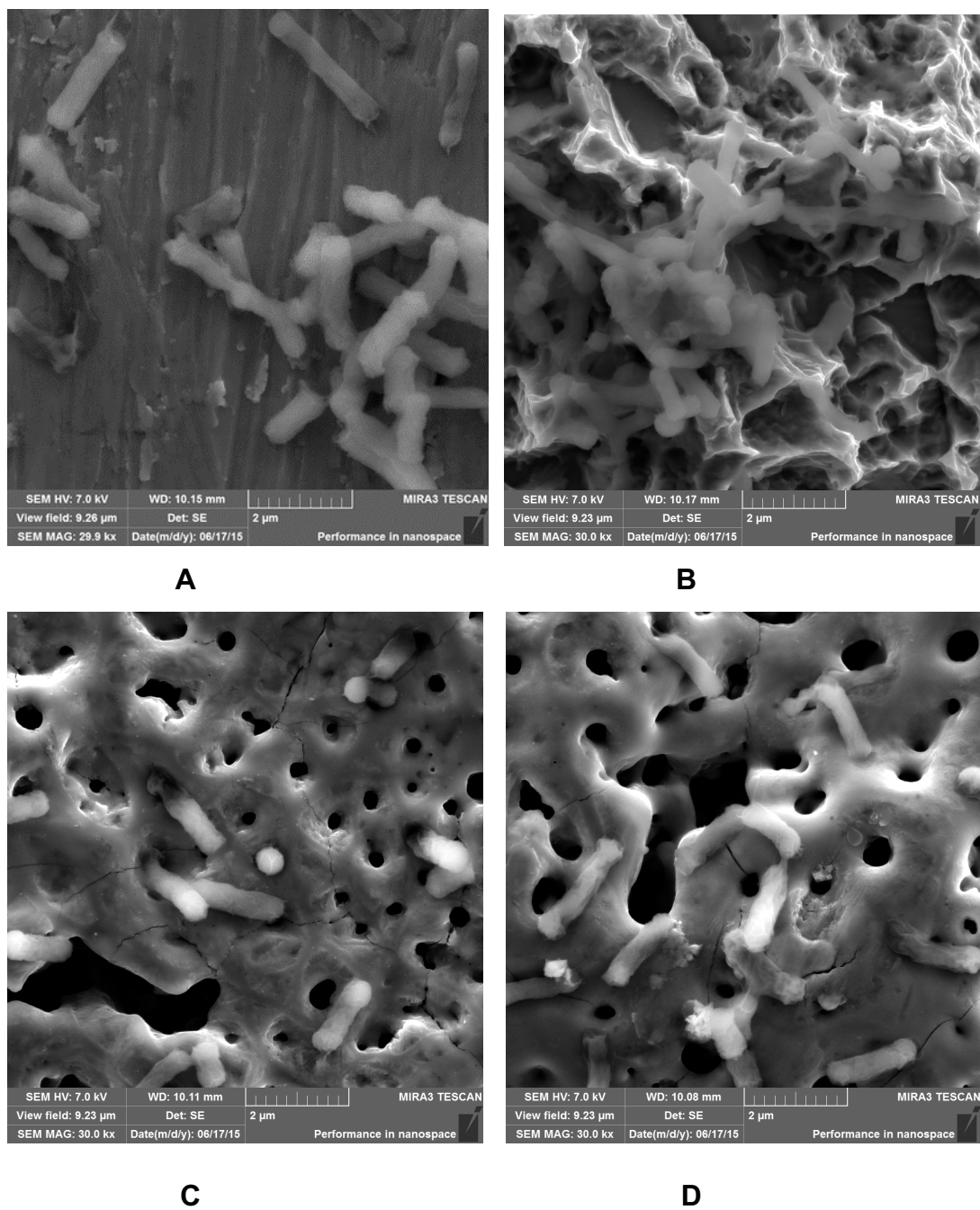
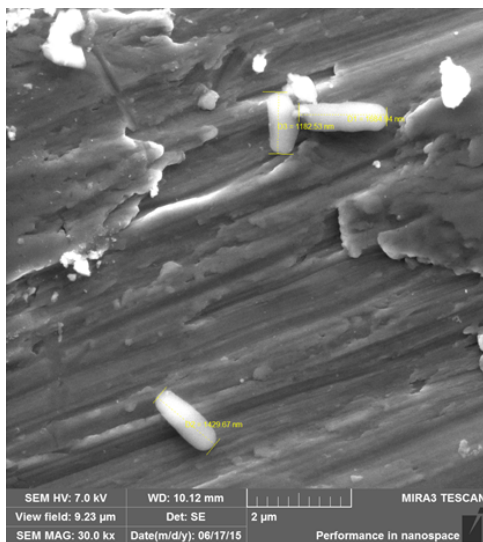
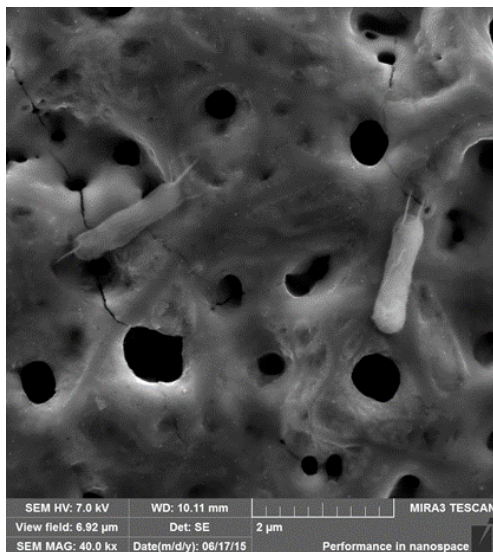


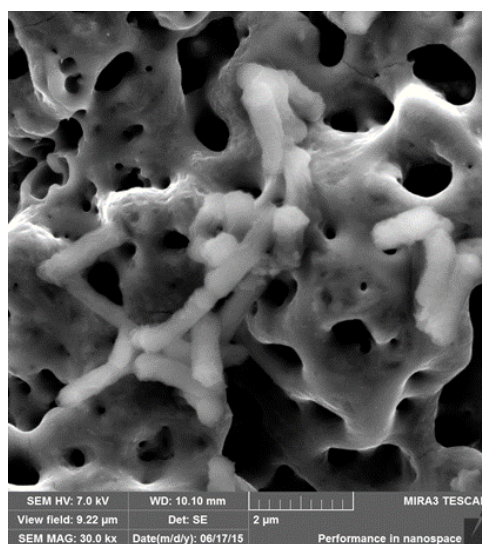
Fig. 24. Fotomicrográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (FEG). Espécimes com formação de biofilme antes da escovação simulada (Fase II). (A) Li. (B) Jat. (C) OA. (D) JT.



A



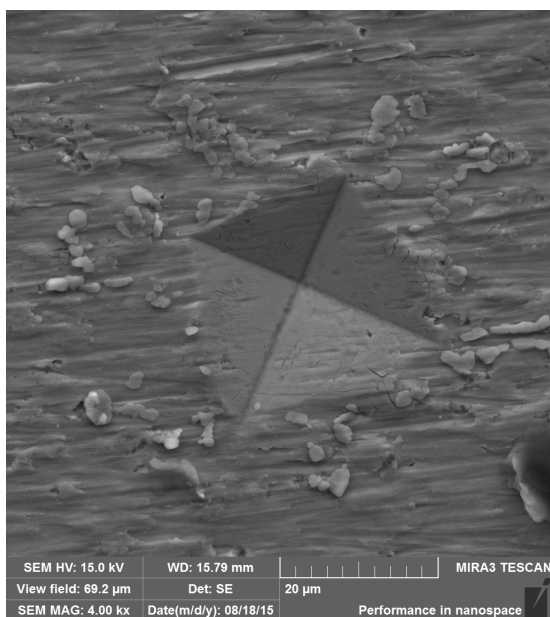
C



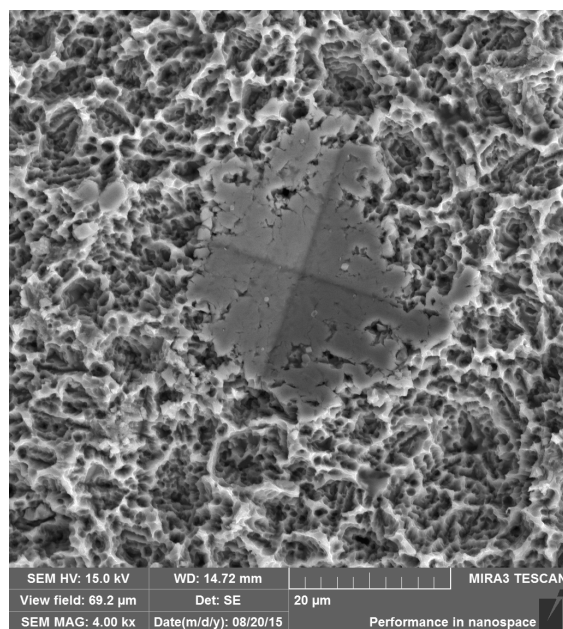
D

Fig. 25. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG). Espécimes com aderência microbiana após escovação simulada (Fase IV). (A) Li. (C) OA. (D) JT

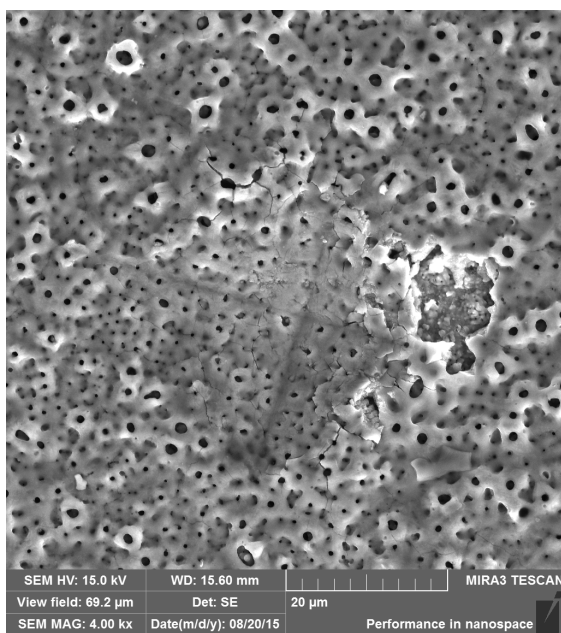
As imagens representativas dos discos das diferentes superfícies de titânio mostram aderência de *E. coli*. No grupo Liso (Li) uma menor quantidade de bactérias foi observada. No entanto, as bactérias estavam distribuídas em forma de aglomerações (formação de biofilme), diferente dos outros grupos (crescimento microbiano mais isolado).



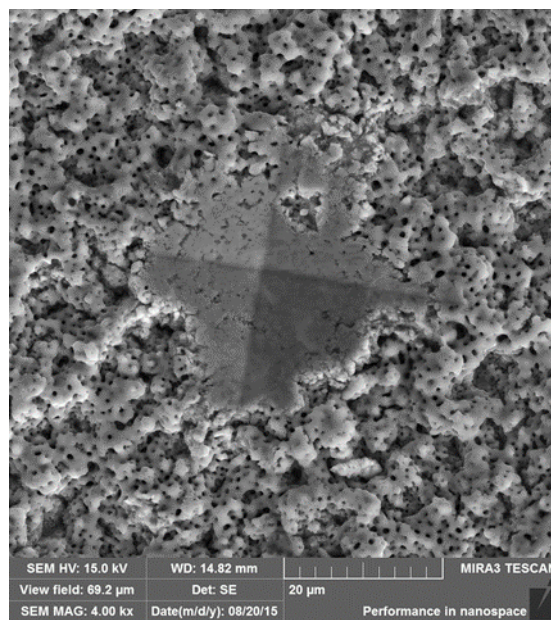
A



B



C



D

Fig. 26. Fotomicrográficas obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG) para o teste de microdureza Vickers de 200 gf por 15 seg. nos diferentes tratamentos de superfície, fase I. (A) Li. (B) Jat. (C) OA. (D) JT. Este teste foi realizado também em fase II, fase III e fase IV.

6. DISCUSSÃO

Este estudo comparou a aderência de *E. coli* em diferentes tipos de tratamentos de superfície em discos de titânio antes e após escovação. *Escherichia coli* é uma bactéria do grupo Enterobacteriaceae, Gram negativa, ou seja, libera uma endotoxina chamada lipopolissacarídeo (LPS). Esta endotoxina está diretamente associada a doença periodontal e periimplantar (Sedgley e Samaranayake⁸¹ 1994, Slots et al.¹¹⁰ 1988). No entanto, é importante lembrar que estas bactérias também podem estar presentes em sítios saudáveis (Laforce et al.⁸³ 1976). Sua prevalência é maior em indivíduos que apresentam imunossupressão (Samaranayake et al.⁸² 1989, Santos⁸⁴ 2002). Devido as suas características, existe grande importância em conhecer o potencial de colonização da *E. coli* nos diferentes tratamentos de superfícies de titânio antes e após escovação.

Autores como (Dhir¹⁸ 2013, Thomas e Nakaishi²¹ 2006) estabeleceram que a escovação é um método eficaz para o controle do biofilme, porém a escovação pode estar envolvida no desgaste de estruturas dentárias, especialmente se o procedimento de escovação estiver associado ao uso de dentífrícios, os quais podem apresentar componentes abrasivos em sua composição, tais como carbonato de cálcio e a sílica. O mesmo acontece em superfícies de metal expostas ao meio bucal (Lindholm-Sethson e Ardlín¹¹¹ 2008), o qual apresenta condições de umidade, pH e dieta que podem contribuir para alterar a superfície topográfica do metal. Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado corrosão em titânio comercialmente puro por causa de agentes profiláticos contendo flúor (Stajer et al.⁹⁵ 2008, Siirila e Kononen¹¹² 1991). No entanto, os resultados de microdureza apresentados neste estudo demonstram que nenhuma alteração significativa na superfície dos discos de titânio foi detectada, independentemente do tipo de tratamento que foi realizado. Demonstrando que, a utilização da escovação e dentífrício, não interferiu de forma significativa na corrosão deste metal. Este resultado pode ter ocorrido devido aos parâmetros de escovação simulada utilizados (carga 400 gf, 20000 ciclos) e também ao

dentífrício utilizado. Estudos que demonstraram corrosão do titânio utilizaram um tempo maior de exposição do metal à escovação e também ao dentífrício, ou apenas ao flúor (Nakagawa et al.²³ 1999, Mabilieu et al.⁹⁶ 2006, Huang⁹⁷ 2002).

Segundo (Burgers et al.¹¹³ 2010, Morgan e Wilson¹¹⁴ 2001) a adesão e extensão bacteriana inicial nas superfícies de titânio com diferentes texturas é influenciada principalmente pela rugosidade. Portanto, nosso estudo relaciona diferentes tratamentos de superfície de titânio com características específicas de rugosidade em cada grupo, antes e após escovação em associação com um dentífrício. Observou-se uma correlação diretamente proporcional entre rugosidade da superfície de titânio e a contagem da aderência bacteriana, confirmando o que já foi relatado anteriormente na literatura. (Barros e de Gouvea³¹ 2010, Fais et al.⁹⁹ 2012, Morgan e Wilson¹¹⁴ 2001).

A rugosidade em nosso estudo foi analisada por meio de microscopia de força atômica utilizando pontas de semi contato (o que permitiu a utilização novamente dos espécimes para o teste de microdureza). Este tipo de ponta é capaz de registrar com mais detalhes a topografia, a nível escalar sub-nanométrica de um espaço ou longitude determinado da superfície de titânio, quando comparada a outras metodologias que também avaliam rugosidade como o perfilômetro ou rugosímetro (Rivera Moises¹¹⁵ 2001, Sosa Oswaldo¹¹⁶ 2006).

Estudos (Iijima et al.³² 2012, Huang⁹⁷ 2002, Toumelin-Chemla et al.¹⁰¹ 1996, Koike e Fujii¹¹⁷ 2001, Reclaru e Meyer¹¹⁸ 1998) demonstraram um aumento na rugosidade superficial em presença de altas concentrações de flúor e/ou com pH baixo, levando a um processo de degradação do titânio. Neste estudo observamos um resultado contrário para a maioria dos grupos, ou seja, uma diminuição da rugosidade após escovação com dentífrício foi encontrada. Com exceção dos discos tratados por jateamento e ataque ácido, estes, quando submetidos a escovação, demonstraram um aumento significativo na rugosidade superficial média, porém sem interferir no acúmulo de microrganismos. Menor aderência de bactérias foi demonstrada na fase após escovação na maioria dos grupos, sendo que diferenças significativas foram encontradas entre os grupos Jat

e JT (FII) em relação ao grupo Li (FIV), enfatizando a importância de higienização bucal por parte do paciente para o controle do biofilme dental. Os discos tratados por oxidação anódica demonstraram um aumento da aderência bacteriana, porém este aumento foi estatisticamente significativo apenas em relação ao grupo sem tratamento de superfície (Li).

O titânio possui propriedades físico-químicas que podem permitir aderência celular e bacteriana (Massaro et al.² 2002, Steinemann⁴² 1998, Bayramoglu et al.⁴³ 2000), sendo que estas são influenciadas pela energia superficial, pureza, topografia e a rugosidade do material, os quais são fatores determinantes para o sucesso da osseointegração (Yeo¹¹⁹ 2013). Os implantes protéticos endo-ósseos inicialmente eram parafusos de superfície lisa, os quais demoravam para apresentar estabilidade secundária e sucesso na instalação do implante. Então, desenvolveu-se diferentes métodos para modificar a topografia ou a química da superfície de titânio, em busca da melhora desse contato íntimo entre o osso e a superfície de titânio sem interferência de tecido fibroso (osseointegração) em menor tempo (Yamagami et al.¹²⁰ 2014). A técnica de jateamento com ataque ácido demonstrou um alto sucesso a longo prazo compatíveis com outros sistemas de implantes já consolidados no mercado internacional (Yeo¹¹⁹ 2013). Neste trabalho, o grupo Jat apresentou uma maior rugosidade depois da escovação, mas não se observou diferença significativa nas diferentes fases com os diferentes grupos na aderência de bactérias. Para tentar melhorar de forma eficaz o sucesso da instalação dos implantes dentais, novas técnicas estão sendo desenvolvidas em sua fase experimental, como a oxidação anódica.

A oxidação anódica na superfície do implante de titânio aumenta, não somente a rugosidade da superfície, mas também a espessura do óxido da superfície de titânio, o qual é importante para a resposta do osso biológico (Ellingsen¹²¹ 1998, Larsson et al.¹²² 1996). Estudos em osso humano e de animais mostraram resultados histomorfométricos favoráveis à resposta óssea (Yamagami et al.¹²⁰ 2014, Ivanoff et al.¹²³ 2003, Yeo et al.¹²⁴ 2008, Zechner et

al.¹²⁵ 2003). Em nosso estudo realizou-se o tratamento de oxidação anódica com parâmetros controlados para ter uma padronização, em superfície de titânio liso e superfície jateada com ataque ácido, mostrando um aumento de rugosidade. Evidenciou-se um aumento de aderência bacteriana apenas após escovação com dentifrícios, tendo diferença significativa com o grupo Li (FIV), o qual não sofreu nenhum tipo de tratamento de superfície. A rugosidade dos discos tratados por oxidação anódica antes e após escovação não apresentou variabilidade.

Em estudo realizado por (Barros e de Gouvea³¹ 2010), no qual utilizaram-se discos de titânio lisos com rugosidade média (Ra) de 2mm, armazenados com saliva fluoretada, demonstrou-se uma homogeneização da superfície por partículas de flúor, o que diminuiu a aderência do microrganismo (*S. mutans*). Em nosso estudo observamos uma diminuição da aderência no grupo que não sofreu tratamento de superfície (Li – FII). Esta colonização microbiana foi ainda menor após a escovação (Li – FIV), o que pode ser explicado pela presença de partículas fluoretadas na superfície dos discos, embora a análise da presença de flúor não tenha sido realizada nesta pesquisa. A rugosidade superficial foi muito semelhante antes e após escovação com dentifrícios no grupo Li, demonstrando, neste caso, ter tido pequena influência na aderência microbiana.

Observamos, pela análise em FEG, no grupo Liso (Li) uma menor quantidade de bactérias, as quais estavam distribuídas em forma de aglomerações (formação de biofilme), diferente dos outros grupos que tinham aderências de bactérias isoladas. A formação de biofilme, observada pela aglomeração bacteriana, leva a um aumento das endotoxinas, que podem ser prejudiciais para os tecidos adjacentes.

A presente pesquisa demonstrou que a rugosidade de superfície pode estar relacionada ao aumento quantitativo da colonização por *E. coli*. No entanto, superfícies lisas também podem apresentar aderência de microrganismos e maior formação de biofilme. Pesquisas já comprovaram que bactérias quando em comunidades podem ter uma exacerbação de seus efeitos deletérios ao nosso organismo (Furst et al.⁷² 2007, Blankenship e Mitchell⁷⁹ 2006, Koka et al.⁸⁵ 1993).

Portanto, o tratamento de superfície pode não ser o principal fator relacionado a presença de doenças periimplantares. Bactérias quando isoladas podem não vir a apresentar efeitos patogênicos como descrito por (Rosier et al.¹²⁶ 2012). Neste artigo os autores comentam sobre a presença do modelo PSD (“Polymicrobial Synergy and dysbiosis”) para explicar doenças periodontais, enfatizando a importância de patógenos chave no desenvolvimento da doença, no entanto se estes estiverem isolados não conseguem desenvolver de forma adequada seu potencial patogênico. Os autores citam como exemplo a presença do *Streptococcus gordonii* agindo como um patógeno acessório para o aumento da virulência da *Porphyromonas gingivalis*. Portanto, não é apenas a quantidade de microrganismos que deve ser considerada, mas também sua capacidade de formar biofilme.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que todos os grupos tiveram aderência de *E. coli*, o que pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças periimplanteres. O grupo sem tratamento de superfície (Li) teve uma maior formação de biofilme do que aderência de bactérias isoladas podendo apresentar um maior potencial para o desenvolvimento de doenças periimplanteres em comparação com os grupos que apresentaram bactérias isoladas.

Menor aderência bacteriana foi encontrada após a realização da escovação com dentifrícios demonstrando mais uma vez a importância da higienização na diminuição da formação de biofilme e aderência de microrganismos.

Sobre a rugosidade superficial, os discos tratados por jateamento seguido de ataque ácido apresentaram-se mais rugosos. Existe uma correlação entre a rugosidade encontrada nos grupos e a formação de biofilme. Demonstrando que a rugosidade pode ter um efeito na quantidade de microrganismos aderidos na superfície de implantes. Porém, os discos lisos demonstraram maior formação de biofilme.

A microdureza dos discos de titânio das diferentes superfícies tratadas não tiveram uma variação antes e após escovação e antes e após formação de biofilme, o que leva a pensar que estas superfícies apresentam um material de alta resistência, podendo ser utilizados em implantes dentais na tentativa de substituir a perda dentária e cumprir as necessidades funcionais e estéticas do paciente.

8. REFÊRENCIA

1. Bessone L FB, Naldini P. Tratamientos de superfície de implantes. Revisión bibliográfica. Raoa implantes divulgación. 2009 97(423-29).
2. Massaro C, Rotolo P, De Riccardis F, Milella E, Napoli A, Wieland M, et al. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. J Mater Sci Mater Med. 2002 Jun;13(6):535-48.
3. Klinge B, Hultin M, Berglundh T. Peri-implantitis. Dent Clin North Am. 2005 Jul;49(3):661-76, vii-viii.
4. Branemark R, Branemark PI, Rydevik B, Myers RR. Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review. J Rehabil Res Dev. 2001 Mar-Apr;38(2):175-81.
5. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Int J Oral Surg. 1981 Dec;10(6):387-416.
6. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 1977 16(1-132).
7. Magno Filho LC, Cirano FR, Hayashi F, Hsu FS, Alexandre C, Dib L, et al. Assessment of the Correlation between Insertion Torque and Resonance Frequency Analysis of Implants placed in Bone Tissue of Different Densities. J Oral Implantol. 2012 Apr 16;
8. Bryant SR, Zarb GA. Outcomes of implant prosthodontic treatment in older adults. J Can Dent Assoc. 2002 Feb;68(2):97-102.
9. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res. 2004 Jul;83(7):529-33.
10. Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P. Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. J R Soc Interface. 2010 Oct 6;7 Suppl 5(S515-27).
11. Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. Clin Oral Implants Res. 2008 Mar;19(3):233-41.
12. Lai HC, Zhuang LF, Zhang ZY, Wieland M, Liu X. Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res. 2009 Mar;20(3):247-53.
13. Rupp F, Scheideler L, Olshanska N, de Wild M, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. J Biomed Mater Res A. 2006 Feb;76(2):323-34.
14. Novaes AB, Jr., de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. Braz Dent J. 2010 21(6):471-81.

15. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol*. 2003 Jul;74(7):945-56.
16. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991 Jul;25(7):889-902.
17. Celletti R, Marinho VC, Traini T, Orsini G, Bracchetti G, Perrotti V, et al. Bone contact around osseointegrated implants: a histologic study of acid-etched and machined surfaces. *J Long Term Eff Med Implants*. 2006 16(2):131-43.
18. Dhir S. Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 Jan;17(1):5-11.
19. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2(68-81).
20. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jul-Aug;24(4):616-26.
21. Thomas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc*. 2006 Nov;137 Suppl(10S-15S).
22. Lobene RR, Battista GW, Petrone DM, Volpe AR, Petrone ME. Clinical efficacy of an anticalculus fluoride dentifrice containing triclosan and a copolymer: a 6-month study. *Am J Dent*. 1991 Apr;4(2):83-5.
23. Nakagawa M, Matsuya S, Shiraishi T, Ohta M. Effect of fluoride concentration and pH on corrosion behavior of titanium for dental use. *J Dent Res*. 1999 Sep;78(9):1568-72.
24. Lang NP, Berglundh T, Heitz-Mayfield LJ, Pjetursson BE, Salvi GE, Sanz M. Consensus statements and recommended clinical procedures regarding implant survival and complications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 19 Suppl(150-4).
25. Leonhardt A, Adolfsson B, Lekholm U, Wikstrom M, Dahlen G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 1993 Sep;4(3):113-20.
26. Mombelli A, Buser D, Lang NP. Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients. Early results. *Oral Microbiol Immunol*. 1988 Sep;3(3):113-20.
27. Mombelli A, Mericske-Stern R. Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clin Oral Implants Res*. 1990 Dec;1(1):1-7.
28. Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):254-9.
29. Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2002 May;29(5):456-61.
30. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective

longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol*. 2002 29 Suppl 3(197-212; discussion 32-3.

31. Barros RN, de Gouvea CV. Prophylactic agents and bacterial adherence to titanium. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Nov;22(11):1221-6.

32. Iijima M, Nakagaki S, Yasuda Y, Handa K, Koike T, Muguruma T, et al. Effect of immediate loading on the biomechanical properties of bone surrounding the miniscrew implants. *Eur J Orthod*. 2012 Oct;35(5):577-82.

33. Greenstein G, Cavallaro J, Tarnow D. Assessing bone's adaptive capacity around dental implants: a literature review. *J Am Dent Assoc*. 2013 Apr;144(4):362-8.

34. Moiseiwitsch J. Do dental implants toll the end of endodontics? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Jun;93(6):633-4.

35. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981 52(2):155-70.

36. Carlsson L, Rostlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Branemark PI. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand*. 1986 Aug;57(4):285-9.

37. Parithimarkalaignan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: an update. *J Indian Prosthodont Soc*. 2003 Mar;13(1):2-6.

38. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000*. 1998 Jun;17 (22-35).

39. Qahash M, Susin C, Polimeni G, Hall J, Wikesjo UM. Bone healing dynamics at buccal peri-implant sites. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Feb;19(2):166-72.

40. Frost HM. Relation between bone tissue and cell population dynamics, histology and tetracycline labeling. *Clin Orthop Relat Res*. 1966 Nov-Dec;49(65-75.

41. Geris L, Gerisch A, Sloten JV, Weiner R, Oosterwyck HV. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol*. 2008 Mar 7;251(1):137-58.

42. Steinemann SG. Titanium--the material of choice? *Periodontol 2000*. 1998 Jun;17 (7-21).

43. Bayramoglu G, Alemdaroglu T, Kedici S, Aksut AA. The effect of pH on the corrosion of dental metal alloys. *J Oral Rehabil*. 2000 Jul;27(7):563-75.

44. Yu P, Zhu X, Wang X, Wang S, Li W, Tan G, et al. Periodic Nanoneedle and Buffer Zones Constructed on a Titanium Surface Promote Osteogenic Differentiation and Bone Calcification In Vivo. *Adv Healthc Mater*. 2004 Dec 3;

45. Zavanelli RA, Pessanha Henriques GE, Ferreira I, De Almeida Rollo JM. Corrosion-fatigue life of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloys in different storage environments. *J Prosthet Dent*. 2000 Sep;84(3):274-9.

46. Uboldi C, Urban P, Gilliland D, Bajak E, Valsami-Jones E, Ponti J, et al. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol In Vitro*. 2004 Nov 10;

47. Wennerberg A, Albrektsson T, Andersson B. Design and surface characteristics of 13 commercially available oral implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993 8(6):622-33.

48. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996 7(4):329-45.
49. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res*. 2000 Feb;49(2):155-66.
50. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J, et al. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res*. 2003 May;82(5):372-6.
51. Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.
52. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper LF. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent*. 2001 Jan;85(1):40-6.
53. Raghavendra S WM, Taylor TD. Early wound healing around endosseous implants: A review of the literature *Web of Scienc*. 2005 Vol.20(3) pp.425-31.
54. Sul YT, Byon E, Wennerberg A. Surface characteristics of electrochemically oxidized implants and acid-etched implants: surface chemistry, morphology, pore configurations, oxide thickness, crystal structure, and roughness. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jul-Aug;23(4):631-40.
55. Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Martini D, Tinti A, Mauro G, et al. Comparison of human mandibular osteoblasts grown on two commercially available titanium implant surfaces. *J Periodontol*. 2005 Mar;76(3):364-72.
56. Balshi SF, Wolfinger GJ, Balshi TJ. Analysis of 164 titanium oxide-surface implants in completely edentulous arches for fixed prosthesis anchorage using the pterygomaxillary region. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Nov-Dec;20(6):946-52.
57. Brechter M, Nilson H, Lundgren S. Oxidized titanium implants in reconstructive jaw surgery. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2005 7 Suppl 1 S83-7.
58. Kim HW, Kim HE, Salih V, Knowles JC. Hydroxyapatite and titania sol-gel composite coatings on titanium for hard tissue implants; mechanical and in vitro biological performance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Jan 15;72(1):1-8.
59. Lacefield WR. Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent*. 1998 7(4):315-22.
60. Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent*. 1997 Jan;77(1):76-82.
61. Papaioannou W, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res*. 1996 Dec;7(4):405-9.
62. Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5.
63. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol*. 2006 Jan;59(1):66-72.

64. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E, Jr., Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987 Dec;2(4):145-51.
65. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int J Artif Organs*. 2005 Nov;28(11):1062-8.
66. Zitzmann NU, Berglundh T, Ericsson I, Lindhe J. Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. *J Clin Periodontol*. 2004 Oct;31(10):845-9.
67. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003 Feb;149(Pt 2):279-94.
68. Kalykakis GK, Mojon P, Nisengard R, Spiekermann H, Zafiropoulos GG. Clinical and microbial findings on osseo-integrated implants; comparisons between partially dentate and edentulous subjects. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1998 Dec;6(4):155-9.
69. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*. 2004 97(6):1311-8.
70. Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):239-44.
71. Herrmann M, Lai QJ, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. *J Infect Dis*. 1993 Feb;167(2):312-22.
72. Furst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Aug;18(4):501-8.
73. do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque RF, Jr. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Feb;37(2):177-80.
74. Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993 Sep;72(9):1304-9.
75. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990 Mar;17(3):138-44.
76. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur Cell Mater*. 2002 Dec 31;4(39-60).
77. Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent*. 1994 22 Suppl 1 S13-6.
78. do Nascimento C, Pedrazzi V, Miani PK, Moreira LD, de Albuquerque RF, Jr. Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Dec;20(12):1394-7.

79. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Dec;9(6):588-94.
80. Knoernschild KL, Lefebvre CA, Schuster GS, Payant LM, Gagnon FM. Endotoxin adherence to and elution from two casting alloys. *Int J Prosthodont.* 1994 Jan-Feb;7(1):22-9.
81. 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 Jun;39(6):459-66.
82. Samaranayake LP, Lamb AB, Lamey PJ, MacFarlane TW. Oral carriage of *Candida* species and coliforms in patients with burning mouth syndrome. *J Oral Pathol Med.* 1989 Apr;18(4):233-5.
83. Laforce FM, Hopkins J, Trow R, Wang WL. Human oral defenses against gram-negative rods. *Am Rev Respir Dis.* 1976 Nov;114(5):929-35.
84. Santos S. Prevalence and in vitro sensibility of the enterobacteriaceae and pseudomonads isolated from the oral cavity and periodontal pocket in patients with chronic periodontitis. 2002 5 (74 – 84).
85. Koka S, Razzoog ME, Bloem TJ, Syed S. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. *J Prosthet Dent.* 1993 Aug;70(2):141-4.
86. Fardal O, Johannessen AC, Olsen I. Severe, rapidly progressing peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 1999 May;26(5):313-7.
87. van Steenberghe D, Klinge B, Linden U, Quirynen M, Herrmann I, Garpland C. Periodontal indices around natural and titanium abutments: a longitudinal multicenter study. *J Periodontol.* 1993 Jun;64(6):538-41.
88. Lindquist LW, Rockler B, Carlsson GE. Bone resorption around fixtures in edentulous patients treated with mandibular fixed tissue-integrated prostheses. *J Prosthet Dent.* 1988 Jan;59(1):59-63.
89. Lindhe J, Berglundh T, Ericsson I, Liljenberg B, Marinello C. Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):9-16.
90. Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1992 Mar;3(1):1-8.
91. Venza I, Visalli M, Cucinotta M, De Grazia G, Teti D, Venza M. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2010 Jan;81(1):99-108.
92. Sivakumar B KS, Narayanan. Fretting corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions behavior of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions. Elsevier. 2010 317-17.
93. Huang HH. Variation in surface topography of different NiTi orthodontic archwires in various commercial fluoride-containing environments. *Dent Mater.* 2007 Jan;23(1):24-33.
94. Ehrensberger MT, Sivan S, Gilbert JL. Titanium is not "the most biocompatible metal" under cathodic potential: The relationship between voltage and MC3T3 preosteoblast behavior on electrically polarized cpTi surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Jun 15;93(4):1500-9.

95. Stajer A, Ungvari K, Pelsoczi IK, Polyanka H, Oszko A, Mihalik E, et al. Corrosive effects of fluoride on titanium: investigation by X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, and human epithelial cell culturing. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Nov;87(2):450-8.
96. Mabilieu G, Bourdon S, Joly-Guillou ML, Filmon R, Basle MF, Chappard D. Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater*. 2006 Jan;2(1):121-9.
97. Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials*. 2002 Jan;23(1):59-63.
98. Popa MV, Vasilescu E, Drob P, Vasilescu C, Demetrescu I, Ionita D. Long-term assessment of the implant titanium material--artificial saliva interface. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):1-9.
99. Fais LM, Fernandes-Filho RB, Pereira-da-Silva MA, Vaz LG, Adabo GL. Titanium surface topography after brushing with fluoride and fluoride-free toothpaste simulating 10 years of use. *J Dent*. 2012 Apr;40(4):265-75.
100. Nogues L, Martinez-Gomis J, Molina C, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, et al. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes with various abrasivities. Part I: wear behavior. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Sep;19(9):3041-8.
101. Toumelin-Chemla F, Rouelle F, Burdairon G. Corrosive properties of fluoride-containing odontologic gels against titanium. *J Dent*. 1996 Jan-Mar;24(1-2):109-15.
102. Campus G, Lallai MR, Carboni R. Fluoride concentration in saliva after use of oral hygiene products. *Caries Res*. 2003 Jan-Feb;37(1):66-70.
103. Tanoue N, Matsumura H, Atsuta M. Wear and surface roughness of current prosthetic composites after toothbrush/dentifrice abrasion. *J Prosthet Dent*. 2000 Jul;84(1):93-7.
104. Kawai K, Iwami Y, Ebisu S. Effect of resin monomer composition on toothbrush wear resistance. *J Oral Rehabil*. 1998 Apr;25(4):264-8.
105. V. Zwilling a MAb, E. Darque-Ceretti a. Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochimica Acta* 1999 921- 29.
106. W.D C. Ciências engenharia de materiais: uma introdução LTC Editora; 1999. 96-97 p.
107. Giessibl FJ. Advances in atomic force microscopy
The American Physical Society
2003 75(949-83.
108. Ichinokawa T. Analytical scanning electron microscopy for solid surface. *J Electron Microscop Tech*. 1989 Jul;12(3):219-27.
109. Castillo U, Myers S, Browne L, Strobel G, Hess WM, Hanks J, et al. Scanning electron microscopy of some endophytic streptomycetes in snakevine--*Kennedia nigricans*. *Scanning*. 2005 Nov-Dec;27(6):305-11.
110. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 1988 Jun;3(2):47-52.

111. Lindholm-Sethson B, Ardlin BI. Effects of pH and fluoride concentration on the corrosion of titanium. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jul;86(1):149-59.
112. Siirila HS, Kononen M. The effect of oral topical fluorides on the surface of commercially pure titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991 Spring;6(1):50-4.
113. Burgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Feb;21(2):156-64.
114. Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol*. 2001 Jul;91(1):47-53.
115. Rivera Moises MM. La rugosidad de la superficie topometria Ingenieria 2001 IV (11).
116. Sosa Oswaldo SM, Vargas Carlos, Salcedo Luis Analisis de rugosidad por microscopia de fuerza atomica (AFM) y software spip aplicado a superficies vitreas. Escuela de Física, Grupo de Física de Materiales¹, Escuela de Matemáticas y Estadística², Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja 2006
117. Koike M, Fujii H. The corrosion resistance of pure titanium in organic acids. *Biomaterials*. 2001 Nov;22(21):2931-6.
118. Reclaru L, Meyer JM. Effects of fluorides on titanium and other dental alloys in dentistry. *Biomaterials*. 1998 Jan-Feb;19(1-3):85-92.
119. Yeo IS. Reality of dental implant surface modification: a short literature review. *Open Biomed Eng J*. 2013 8 (114-9).
120. Yamagami A, Nagaoka N, Yoshihara K, Nakamura M, Shirai H, Matsumoto T, et al. Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant. *Dent Mater J*. 2014 33(6):828-34.
121. Ellingsen JE. Surface configurations of dental implants. *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17(36-46).
122. Larsson C, Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, et al. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials*. 1996 Mar;17(6):605-16.
123. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 May-Jun;18(3):341-8.
124. Yeo IS, Han JS, Yang JH. Biomechanical and histomorphometric study of dental implants with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Nov;87(2):303-11.
125. Zechner W, Tangl S, Furst G, Tepper G, Thams U, Mailath G, et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Apr;14(2):150-7.
126. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 4 (92).