

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

**Claudio Zeferino Dal Agnol**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM TITÂNIO  
COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE  
SUPERFÍCIE**

**Passo Fundo**

**2013**

**Claudio Zeferino Dal Agnol**

**FORMAÇÃO DE BIOFILME EM TITÂNIO  
COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE  
SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação da Profª. Dra. Luciana Ruschel dos Santos e coorientação do Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci.

**Passo Fundo**

**2013**

Folha reservada para  
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.  
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela  
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

CIP – Catalogação na Publicação

---

- D136f Dal Agnol, Claudio Zeferino  
Formação de biofilme em titânio com diferentes  
tratamentos de superfície / Claudio Zeferino Dal Agnol.  
– 2013.  
196 p. : il. color. ; 21 cm.
- Dissertação (Mestrado em Odontologia) –  
Universidade de Passo Fundo, 2013.  
Orientadora: Profa. Dra. Luciana Ruschel dos  
Santos.  
Coorientador: Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci.
1. Implantes dentários. 3. Biofilmes. 3. Titânio. 4.  
Bactérias. I. Santos, Luciana Ruschel dos Santos,  
orientadora. II. Cenci, Maximiliano Sergio, coorientador.  
III. Título.

CDU: 616.314-089.843

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/156

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Claudio Zeferino Dal Agnol nasceu em 21 de abril de 1972, no município de Soledade no estado do Rio Grande do Sul. Graduou-se em Odontologia, pela Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), em 20 de agosto de 2005, na cidade de Cachoeira do Sul/RS. No período em que cursava a graduação, foi aluno bolsista voluntário vinculado a projetos de pesquisa e extensão nas áreas de Estomatologia, Periodontia e Saúde Coletiva. Em 2010, obteve o título de especialista em Ortodontia pela Faculdade Sarandi, em Erechim/RS. Atualmente, é mestrando em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo (UPF), com área de concentração em Clínica Odontológica (Biomateriais). Desde a sua formação acadêmica, atua como clínico geral e ortodontista clínico com ênfase em tratamentos interdisciplinares em sua clínica na cidade de Fontoura Xavier/RS.

## OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, orientação, saúde e perdão.

À minha esposa Andresa e meus estimados filhos: Allícia Valentina e ao pequeno Davi, pelo amor, confiança, paciência e compreensão, especialmente quando não estive presente. Obrigado por serem extremamente especiais em minha vida. Amo demais vocês!

Aos meus familiares, especialmente minha mãe, Maria Madalena, por orar por nós e apoio desde quando nasci. E, ao meu pai, mesmo estando em outro plano espiritual, sua virtude continua acesa em meu coração.

Aos meus sogros, Ires e Arlindo Dartora, pela ajuda no cuidado com os meus filhos enquanto estive ausente.

À minha orientadora Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos, pela oportunidade de orientação, amizade, apoio e incentivo em minhas decisões, aceitando minhas limitações.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, pela orientação, empenho e incentivo.

Ao coordenador do mestrado em Clínica odontológica Prof. Dr. Alvaro Della Bona, colaborador constante nessa dissertação.

Aos professores do Programa de Mestrado em Clínica odontológica (PPGOdonto): Bruno Carlini Jr., Márcia Borba, Micheline Sandini Trentin, Vinícius Rosa, Mateus Flôres, Alvaro Della Bona,

Eduardo Dal Magro e Luciana Ruschel dos Santos. Agradeço pelo engrandecimento da minha cultura, que, pelo resultado de um esforço comum, repartiram seus conhecimentos, transformando meus ideais em realizações.

Aos meus colegas de mestrado por nosso crescimento intelectual através da “Faixa de Gaza”: André, Bruno, Betânia, Caroline, Gustavo, Michele, Quéli, Rafael e Yuri.

Aos professores das disciplinas onde estagiei como docente: Miriam Lago Magro, Douglas Cecchim, Fabiane Zanette, Carlos Alberto Kochenborger, Fábio Eduardo Woitchunas, Waleska Voltolini de Azambuja, Larissa Correa Brusco, Márcia Borba e Eduardo Dal Magro. Obrigado pelo acolhimento e valiosa experiência.

À secretária da PPGOdonto, Fabiana Pimentel pela competência, amizade e dedicação.

A doutoranda Françoise Helene Van De Sande, pela ajuda incondicional à execução da parte microbiológica e estatística.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas, em especial: Carmem, Fradane, Thatiana, Fernanda, Tiago e Tamires.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS, nas figuras do Prof. Vladimir do Nascimento e ao doutorando Gustavo Perdoncini.

À banca de defesa de dissertação: Professores doutores: Álvaro Della Bona, Rafael Guerra Lund, Luciana Ruschel dos Santos, Márcia Borba e Flávio Fernando Demarco, pela arguição e correção desta dissertação.

Aos profissionais da minha Clínica de Odontologia, Fernando, Peter, Luciana e minhas auxiliares: Kelly, Adriana e Sandra. Aos meus pacientes, agradeço de coração pela paciência e lealdade de sempre.

Aos meus alunos da graduação em Odontologia da UPF, os quais foram sem dúvida uma experiência marcante, aprendi muito, e, espero ter contribuído para o engrandecimento do conhecimento. Aos pacientes através dos alunos, agradeço pela confiança depositada, peço desculpas se caso não tenha correspondido às expectativas.

Vocês são as molas propulsoras para nosso contínuo aprimoramento.

Obrigado!



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xx</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>22</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>24</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
2.1 O titânio e topografia de superfície .....	29
2.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme em titânio .....	38
2.3 Sistema de boca artificial – técnica do microcosmo .....	55
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 Obtenção do meio definido enriquecido com mucina (DMM) – saliva artificial.....	64
4.2 Coleta e processamento da saliva humana .....	66
4.3 Corpos de prova .....	66
4.4 Desenvolvimento do biofilme .....	69
4.5 Análise do biofilme .....	70
4.6 Diluições seriadas das suspensões de biofilmes (Black, 1999).....	71
4.7 Preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura – MEV – JEOL JSM 6060 .....	73
4.8 Estatística .....	75
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>

5.1 Rugosidade .....	76
5.2 Formação dos biofilmes .....	77
5.3 Análise das topografias superficiais de titânio por meio de MEV JEOL JSM 6060.....	80
5.3.1 Previamente à técnica do microcosmo.....	80
5.4 Análise das superfícies de Ti cp grau 4 após a técnica do microcosmo por meio de microscopia eletrônica de varredura – MEV – JEOL JSM 6060.....	88
5.4.1 Superfície lisa (L) (controle) após 12 horas de adesão e formação de biofilme por meio de MEV .....	88
5.4.2 Superfície lisa (L) (controle) após 24 horas de formação de biofilme.....	90
5.4.3 Superfície lisa (L) (controle) após 48 horas de formação de biofilme.....	93
5.4.4 Superfície lisa (L) (controle) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	95
5.4.5 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	97
5.4.6 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	99
5.4.7 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	101
5.4.8 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	104
5.4.9 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo.....	105
5.4.10 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo.....	107
5.4.11 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo.....	109

5.4.12 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	111
5.4.13 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescida de ataque ácido nítrico (JA) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	113
5.4.14 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	115
5.4.15 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	118
5.4.16 Superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo .....	120
5.5 Discussão .....	123
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>151</b>
<b>ARTIGO A SER SUBMETIDO .....</b>	<b>160</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Titânio e suas composições máximas. Norma ASTM F67-88. São mostradas a composição química do Ti cp empregado na fabricação de implantes dentários (Albrektsson, 1997).....	30
Tabela 2 – O elemento titânio e suas propriedades (Albrektsson, 1997).....	30
Tabela 3 – Distribuição da rugosidade de três pontos dos discos de Ti cp nas diferentes topografias medidas por rugosímetro óptico (Surr-Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ $\lambda_c$ e $\lambda_c$ 0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento ( $R_a$ ) dados em $\mu\text{m}$ .....	76
Tabela 4 – Distribuição da formação de biofilme pela técnica do microcosmo nos diferentes intervalos de tempo. ....	77
Tabela 5 – Diluições decimais do experimento nos tempos e superfícies pela técnica do microcosmo (UFC/mg $\log 10^{-7}$ ). ....	79
Tabela 6 – Valores das médias das unidades formadoras de colônia (UFC/mg) nos diferentes níveis do grupo pelo fator tempo (h) ( $p \leq 0,05\%$ ). ....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Meio DMM sendo preparado e homogeneizado.....	65
Figura 2 – Meio DMM acrescido de solução salina fisiológica, segundo protocolo de Wong e Sissons (2001).....	65
Figura 3 – Remoção da cápsula contendo os discos de Ti cp para a verificação da R <sub>a</sub> .....	67
Figura 4 – Remoção da cápsula contendo os discos de Ti cp para a verificação da R <sub>a</sub> – continuação. ....	67
Figura 5 – Foto mostrando as 4 superfícies de Ti cp grau 4 para o estudo. ....	68
Figura 6 – Foto demonstrando a inoculação da saliva humana (microcosmos) nas placas de micropoços contendo os discos de Ti cp com diferentes tratamentos de superfície. ....	70
Figura 7 – Foto ilustrativa mostrando a remoção dos discos de Ti cp das placas de micropoços para os tubos contendo 1 ml RTF, para posterior sonicação.....	71
Figura 8 – Foto ilustrando as placas de Ágar sangue sendo incubadas em estufa bacteriológica e jarras de anaerobiose para posterior contagem de microrganismos totais (UFC/mg).....	72
Figura 9 – Foto ilustrando uma placa de Ágar sangue sendo inoculada por diluições da suspensão microbiana original inicial para posterior incubação e contagem de microrganismos totais (UFC/mg).....	73

Figura 10 – Foto ilustrativa mostrando a fixação dos discos de titânio com glutaraldeído 2,5% para posterior preparo para análise por meio da MEV .....	74
Figura 11 – Foto mostrando os discos de titânio com diferentes topografias com biofilmes formados pela técnica do microcosmo, imersos em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato nos tempos de 12 e 24 horas.....	75
Figura 12 – Gráfico da disposição das médias e desvios padrões dos grupos pelo tempo na formação de biofilme pela técnica do microcosmo ( $\log 10^{-7}$ UFC/mg). .....	78
Figura 13 –Fotomicrografia mostrando a superfície lisa em um aumento de 2000X.....	84
Figura 14 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa em um aumento de 9000X.....	82
Figura 15 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J). 10 kv 2000X.....	83
Figura 16 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J). 10 kv 5000X.....	83
Figura 17 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J). 10 kv 10000X.....	84
Figura 18 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 500X.....	85
Figura 19 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 2000X.....	85
Figura 20 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 10000X.....	86

Figura 21 – Fotomicrografia mostrando a superfície deformada por jateamento com óxido de alumínio acrescida de ataque ácido nítrico. 10 kv 500X.....	87
Figura 22 – Fotomicrografia mostrando a superfície deformada por jateamento com óxido de alumínio acrescida de ataque ácido nítrico. 10 kv 2000X.....	87
Figura 23 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento microbiano. 10kv 30X.....	88
Figura 24 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) após 12 horas de crescimento microbiano. 10 kv 200X.....	89
Figura 25 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento microbiano. 10 kv 6000X.....	89
Figura 26 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento microbiano. 10 kv 10000X.....	90
Figura 27 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 30X.....	91
Figura 28 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 1000X.....	92
Figura 29 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 4000X.....	93
Figura 30 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 30X.....	94
Figura 31 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 200X.....	94
Figura 32 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 5000X.....	95

Figura 33 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 168 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 200X. ....	96
Figura 34 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 168 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 10000X. ....	97
Figura 35 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	98
Figura 36 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 4000X.....	99
Figura 37 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	100
Figura 38 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	101
Figura 39 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	102
Figura 40 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	103
Figura 41 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	103



Figura 42 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com $\text{Al}_2\text{O}_3$ (J) após 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	104
Figura 43 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com $\text{Al}_2\text{O}_3$ (J) após 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	105
Figura 44 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) nas primeiras 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	106
Figura 45 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) nas primeiras 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 10000X.	106
Figura 46 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	107
Figura 47 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X..	108
Figura 48 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X..	108
Figura 49 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	109
Figura 50 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	110

Figura 51 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	110
Figura 52 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.....	111
Figura 53 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	112
Figura 54 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 4000X.....	112
Figura 55 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X..	113
Figura 56 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	114
Figura 57 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	115
Figura 58 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X..	116

Figura 59 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	117
Figura 60 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	117
Figura 61 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 50X ..	118
Figura 62 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	119
Figura 63 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.....	120
Figura 64 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 100X.....	121
Figura 65 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.....	122

Figura 66 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X. .... 122

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	ataque ácido nítrico
AFM	microscopia de força atômica
Al	alumínio
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	óxido de alumínio
ANOVA	análise de variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
BMM	mucina basal média
Ca	cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	Clorexidina
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
DMM	meio definido enriquecido com mucina
ESL	energia de superfície livre
G	Grama
g/l	grama por litro
H	Hora
H	Hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HF	ácido hidrofluorídrico
HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico
J	jateadas
JA	jateadas com Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico
KGy	kilogray
KHz	quilo hertz
Kv	quilovoltz
l	litro
L	lisa
MEV	microscopia eletrônica de varredura
m <sup>2</sup>	metro quadrado
MG	miligrama
min	minuto

MJ	mégajoule
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
mmol/l	milimol por litro
n=	número total por grupo
N=	número total da amostra
N	nitrogênio
pH	potencial hidrogeniônico
Prom	titânio condicionado com ácido
Pt	titânio puramente usinado
R <sub>a</sub>	parâmetro de rugosidade média
RNA	ácido ribonucléico
RPM	rotações por minuto
RTF	meio de transporte reduzido
S	Segundo
SEI	imagem em elétrons secundários
SPT	spray de plasma de titânio
SS	Supuração
Ti	titânio
Ti-A16-V4	ligas de titânio com alumínio e vanádio
Ti cp	titânio comercialmente puro
TiN	nitrato de titânio revestido
TiO <sub>2</sub>	óxido de titânio
TSA	Ágar de soja tripticase
TSB	caldo triptico de soja
UFC	unidades formadoras de colônia
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
UPF	Universidade de Passo Fundo
V	Velocidade
W	Watts
Δc	comprimento de cut-off
°C	grau Celsius
μl	Microlitro
®	marca registrada
μm	micrômetro
%	por cento

## RESUMO

Claudio Zeferino Dal Agno<sup>1</sup>

Os fatores de risco associados à peri-implantite estão relacionados à composição do biofilme ao redor do implante e a habilidade da bactéria aderir na superfície. O objetivo desse estudo foi avaliar a formação do biofilme sobre as diferentes superfícies de Ti cp grau 4, nos tempos de 12, 24, 48 e 168 horas pela técnica do microcosmo e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram formados biofilmes em placas de micropoços sobre discos de Ti cp (N=160), tendo como inóculo a saliva (microcosmos) de um doador sobre 10 discos para cada inóculo (n=10). Foram 40 espécimes para cada tipo de superfície, sendo elas: lisa (controle – L), jateadas com óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – J), subtração por ataque com ácido nítrico (A) e por último jateadas com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acrescidas de ataque com ácido nítrico (JA). Um disco de cada condição (4) foi avaliado previamente à inoculação quanto a sua topografia pela MEV e rugosidade média (R<sub>a</sub>) e dezesseis foram avaliados pela MEV após a técnica do microcosmo totalizando 20 espécimes. Os dados obtidos foram analisados pelo teste análise de variância (ANOVA) de dois fatores e Tukey para comparação das médias (p<0,05). Houve diferença estatística entre a superfície controle (25,34) e A (19,15) em relação às J e JA (43,83 e 32,06) na contagem de UFC/mg nas primeiras

---

<sup>1</sup> Cirurgião-dentista, aluno do programa de pós-graduação - Mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo (UPF).

12 horas, onde a formação de biofilme foi maior em J ( $R_a=0,62 \mu\text{m}$ ) e JA ( $R_a=0,51 \mu\text{m}$ ). Observou-se que todas as superfícies possibilitaram crescimento microbiano, independentemente do tratamento recebido.

*Palavras-chave:* titânio, microcosmo, biofilmes, peri-implantite.



## ABSTRACT<sup>2</sup>

Risk factors associated with peri-implantitis are related to the composition of the biofilm around the implant and the ability of bacteria to adhere to the surface. The aim of this study was to evaluate the biofilm formation on the different surfaces of commercially pure titanium (CP Ti) grade 4 in the times of 12, 24, 48 and 168 hours by the microcosm technique and scanning electron microscopy (SEM) . Biofilms were formed in microwell plates over cp Ti (N = 160) discs, having the saliva as inoculum (microcosms) from a donor over 10 discs for each inoculum (n = 10). There were 40 specimens for each type of surface, namely: plain (control - L), blasted with aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - J), subtraction by nitric acid attack (A), and finally blasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> added by nitric acid attack (JA). A disc of each condition (4) was evaluated previously to inoculation as to its topography by SEM and average roughness (R<sub>a</sub>), and 16 were evaluated by SEM after the microcosm technique, totaling 20 specimens. Data gathered were analyzed by the two-factor ANOVA variance test and Tukey for comparison of means (p <0.05). There was statistical difference between the control surface (25,34) and A (19,15) regarding J and JA (43.83 and 32.06) in the CFU/ mg counts in the first 12 hours, when biofilm

---

<sup>2</sup> Adhesion and bacterial biofilm formation on titanium surfaces with different topographies.

formation was higher in J ( $R_a = 0.62 \mu\text{m}$ ) and JA ( $R_a = 0.51 \mu\text{m}$ ). It was observed that all surfaces made possible microbial growth, regardless of treatment received.

*Keywords:* titanium, microcosm, biofilms, peri-implantitis.

## 1 INTRODUÇÃO

Na Odontologia os implantes de titânio são utilizados como o material de escolha para uma variedade de casos, desde a substituição de um elemento dentário até reabilitações completas (Mabboux *et al.*, 2004; Pier-Francesco *et al.*, 2006; Elter *et al.*, 2008; Shibli *et al.*, 2008; Pye *et al.*, 2009). A indicação do biomaterial titânio refere-se às suas excelentes características mecânicas, físico-químicas, bioquímicas, tolerância tecidual, biocompatibilidade (Bunetel *et al.*, 2001; Elias *et al.*, 2008; Subramani *et al.*, 2009), solidez, resistência à corrosão, bem como por possuir módulo de elasticidade similar ao osso (Pier-Francesco *et al.*, 2006).

A evolução tecnológica dos implantes propiciou a criação de vários modelos com diferentes tratamentos de superfície (Carvalho *et al.*, 2009) no intuito de aumentar a área disponível para ocorrer osseointegração, fenômeno que foi defendido desde a década de 50 pelo Dr. Per-Ingvar Brånemark (Brånemark *et al.*, 1977; Brånemark, 1986). As alterações na topografia e na energia superficial do titânio podem ser feitas com tipos diferentes de tratamento de superfície, utilizando o emprego do jateamento com partículas abrasivas, ataque ácido, entre outros (Rosenberg, 2004). A topografia superficial ou rugosidade de superfície, ao passo que aumenta a possibilidade de osseointegração,

também foi comprovado que favorece o acúmulo de quantidades de espécies microbianas (biofilme) podendo levar à infecção peri-implantar, resultando em destruição óssea e conseqüentemente falha na reabilitação com esse tipo de restauração (Gonçalves *et al.*, 2009; Grössner-Schreiber *et al.*, 2009).

A peri-implantite é uma doença inflamatória que afeta os tecidos circunjacentes ao implante osseointegrado, resultando em perda óssea (Quirynen e Listgarten, 1990; Yoshinari *et al.*, 2001; Pier-Francesco *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2007) e conseqüente perda do implante (Gonçalves *et al.*, 2009; Grössner-Schreiber *et al.*, 2009). A adesão bacteriana e o acúmulo de biofilme são considerados as principais causas da patogênese dessa doença (Bürgers *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

Em relação à adesão bacteriana inicial, foi relatado como um processo dinâmico que envolve a interação de fenômenos como a ação das forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Gibbons, 1989; Quirynen e Bollen, 1995). Esse processo de ligação bacteriana pela membrana celular é feito por adesinas que se ligam a sítios específicos sobre as superfícies (Dawe *et al.*, 1963) juntamente com a película adquirida. A adesão inicial é sensível, uma vez que os microrganismos podem ser removidos facilmente pelos mecanismos de controle e regulação da microbiota oral, não permitindo a colonização bacteriana na superfície (Curtiss, 1986; Gibbons, 1989; Nassar *et al.*, 1995; Quirynen e Bollen, 1995; Busscher e Van der Mei, 1997; Jorge, 2007). Após a adesão e coadesão interespecies (Fürst *et al.*, 2007), ocorrem o espessamento do biofilme (Park e Yaacob, 1994) e a síntese de glicanos a partir de carboidratos da dieta. Os glicanos permitem firme adesão, promovendo condições favoráveis para a

colonização de outros microrganismos que não teriam a capacidade de se ligar diretamente às superfícies (Curtiss, 1986; Jorge, 2007).

Como a peri-implantite é a principal complicação relacionada à presença de implantes e a sua principal causa de insucesso (Drake *et al.*, 1999; Bunetel *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2009; Subramani *et al.*, 2009), o estudo do biofilme responsável por essa patologia se torna necessário.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi verificar a formação de biofilme em superfícies de Ti cp grau 4, com diferentes topografias, em diferentes períodos de tempo, por método microbiológico (técnica do microcosmo) e visualização por MEV.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O titânio e topografia de superfície**

De acordo com Williams (1981), a descoberta do elemento titânio em 1791 por Wilhelm Gregor, um mineralogista amador, foi o grande marco para os estudos desse metal. Com o tempo e a tecnologia empregada foi possível extrair o titânio dos minerais para que se tornasse um elemento útil para a indústria, o qual foi passível de processamento comercial a partir de 1930. Por apresentar apenas 60% do peso do aço e excelentes propriedades mecânicas como resistência à corrosão, às variações de temperatura, além de permitir sua manufatura nas mais diversas formas requeridas, o metal puro e suas ligas vêm sendo utilizados tanto nas indústrias aeroespaciais e químicas, assim como para a confecção de implantes cirúrgicos.

De acordo com a normatização dos biomateriais, o titânio comercialmente puro é dividido em 4 graus (1, 2, 3, 4) pela norma American Society for Testing and Materials (ASTM) F67-88. A diferença entre os compostos é a concentração de oxigênio e ferro em sua composição.

As principais propriedades do titânio de interesse como biomaterial são evidenciadas nas Tabelas 1 e 2 onde é mostrada a

composição química do titânio empregado na fabricação de implantes dentários (Albrektsson, 1997).

*Tabela 1 – Titânio e suas composições máximas. Norma ASTM F67-88. São mostradas a composição química do Ti cp empregado na fabricação de implantes dentários (Albrektsson, 1997).*

ELEMENTOS (%Máx)	G1	G2	G3	G4
N	0,03	0,03	0,05	0,05
C	0,10	0,10	0,10	0,10
H	0,015	0,015	0,015	0,015
Fe	0,20	0,30	0,30	0,50
O	0,18	0,25	0,35	0,40
Ti	Balanço	Balanço	Balanço	Balanço

Os autores ainda relatam as diferentes propriedades do titânio como, por exemplo, número atômico, peso atômico, ponto de fusão, entre outras, as quais são evidenciadas na Tabela 2.

*Tabela 2 – O elemento titânio e suas propriedades (Albrektsson, 1997).*

PROPRIEDADES	TITÂNIO (TI CP)
Número atômico	22
Configuração eletrônica externa	3d <sup>2</sup> s <sup>2</sup>
Peso atômico	47,90
Densidade do sólido a 20°C,g/cm <sup>3</sup>	4,43
Volume atômico, cm <sup>3</sup>	10,81
Ponto de fusão, °C	1668
Ponto de ebulição, °C	3260
Eletronegatividade	1,6

Mais tarde, Hansson *et al.* (1983) relataram que o titânio havia se tornado o material mais utilizado em implantes intra-ósseos, pois esse metal possui expressivas características físicas e químicas que permitem

a sua instalação nos tecidos vivos sem que haja incompatibilidade entre eles. Propriedades físicas como seu coeficiente elástico, de deformação e sua resistência à tração são diferentes do tecido ósseo, porém não influenciam no sucesso deste tipo de tratamento. Sua grande resistência à fratura possibilita resistir aos esforços necessários para uma boa função mastigatória. Quimicamente o titânio é um metal muito estável, embora haja uma pequena formação de óxidos em sua superfície. Estes óxidos se formam durante o processo de corte, limpeza e esterilização do implante e ficam aderidos à superfície não sendo liberados para o meio. As propriedades citadas acima permitem a cicatrização e a manutenção da adesão das estruturas teciduais à superfície do titânio.

Outros pesquisadores como Ravnholt (1988) salientaram que o Ti cp e as ligas de titânio com alumínio e vanádio (Ti-Al6-V4), se tornaram os metais de escolha para confecção da parte endóssea de implantes dentais. Tais metais têm sido utilizados, entre outros fatores, devido a propriedades biomecânicas, possibilidades de tratamento e acabamento do implante, assim como pela facilidade para procedimentos de esterilização.

Keller *et al.* (1990) enfatizam que os métodos de preparação da superfície do implante durante a fabricação e esterilização podem afetar de forma significativa as propriedades da superfície e subsequentemente as respostas biológicas que iniciam na superfície.

Kilpadi e Lemons (1994) observaram que superfícies de Ti cp que sofreram passivação por ácido nítrico a 30% por 20 minutos à temperatura ambiente (ASTM, 1997) apresentavam uma maior energia de superfície.



Para Ong *et al.* (1997), os implantes endósseos recebem tratamentos de superfície os quais podem ser manufaturados utilizando técnicas diferentes de acordo com algumas necessidades de caracterização, gerando respostas biológicas que são influenciadas fortemente pela composição e propriedades dessas superfícies. Relataram ainda que, para acelerar ou melhorar a interação entre a interface osso-implante fornecendo uma matriz nessa interface com propriedades biomecânicas e histomorfométricas adequadas, a resposta biológica pode ser modulada modificando as características superficiais, alterando o padrão de rugosidade da superfície dos implantes.

No intuito de maximizar a quantidade e qualidade da interface osso-implante, Klokkevold *et al.* (1997) relataram que inúmeras alterações da superfície têm sido propostas, na sua maioria baseadas na teoria de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada mediante alteração da topografia ou rugosidade do implante.

Albrektsson (1997) salientou que a diferença entre superfícies de titânio podem ser visualizadas por diferentes pesquisadores e os mesmos podem apresentar opiniões contrastantes a respeito do que seria uma superfície lisa ou rugosa. Enquanto um autor pode considerar uma superfície rugosa, outro pode determinar a mesma como lisa, e vice-versa.

Kilpadi *et al.* (1998) avaliaram os efeitos da passivação e do processo de esterilização à seco (205°C por 3 h) sobre a topografia e a energia de superfície de implantes de Ti cp grau II. Esses estudiosos observaram que os valores de rugosidade foram menores nas superfícies que foram esterilizadas sem prévia passivação, e que a passivação e a esterilização aumentam a energia de superfície, uma propriedade

desejável para os implantes ósseos. A passivação também tem sido recomendada para minimizar a corrosão dos íons de Ti.

A topografia da superfície está relacionada com os graus de rugosidade e com a orientação das irregularidades superficiais de acordo com Sykaras *et al.* (2000). Para esses pesquisadores os diferentes processos resultam em pouca diferença topográfica e, citam exemplos de métodos usados para alterar a topografia da superfície dos implantes como o eletro-polimento, decapeamento, jateamento abrasivo, borrifação de plasma, adesão superficial e fotolitografia. Existem muitas outras técnicas de caracterização rugosa da superfície tão avançadas quanto às outras, contudo, as informações são limitadas ou insuficientes em relação à técnica usada para criar as rugosidades superficiais das amostras comercializadas.

Para pesquisadores como Cooper (2000), a necessidade de estabelecer parâmetros mais bem definidos de caracterização da topografia da superfície em relação aos implantes usinados é importante. Para eles, esse tipo de implantes não são totalmente polidos e as diferenças de rugosidade não são equivalentes. Foi relatado que a relação entre o comportamento tecidual e celular nesse tipo de superfície foi evidenciada. Os autores enfatizaram ainda que as superfícies são identificadas pelo método de manufatura, e não pela superfície resultante.

Estudo realizados por Hallab *et al.* (2001) testando componentes de energia de superfície de vários materiais com o objetivo de verificar a força de adesão celular, demonstraram que a energia livre de superfície é a característica mais importante do que a rugosidade da superfície para induzir a adesão e proliferação celular.

Li *et al.* (2001) avaliaram os efeitos do jateamento de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e do ataque de ácido oxálico sobre as propriedades químicas e topográficas da superfície do titânio. Para tal, foram utilizados MEV, difratômetro de raios-X e o teste de liberação de íons de Ti, tendo como critério a topografia da superfície do titânio, a inclusão de partículas da areia de abrasão, a contaminação por elementos e a corrosão do titânio. Os resultados mostraram que a superfície áspera criada pelo jateamento era um tanto quanto irregular, com picos afilados e partículas aderidas de areia e taxa de corrosão aumentada. Estas características foram modificadas pelo ácido oxálico. O contorno da superfície áspera se tornou mais regular e arredondado, as partículas introduzidas foram removidas completamente e o grau de corrosão diminuído. A modificação causada pelo condicionamento com ácido oxálico também criou numerosos microporos secundários (2  $\mu\text{m}$  de diâmetro) na base da macrotextura da superfície jateada. Segundo os autores, este tipo de superfície com jateamento modificado é exequível e confiável para ser aplicado em implantes odontológicos, sem nenhum dano à biocompatibilidade do titânio. Superfícies rugosas geralmente têm demonstrado altos valores em provas mecânicas, indicando uma interface osso-implante mais forte.

Com o objetivo de avaliar a morfologia, rugosidade e área de superfície de amostras de titânio com diferentes topografias (Ti cp), Bathomarco *et al.* (2004) realizaram uma análise através de microscopia de força atômica (AFM). Eles utilizaram amostras de superfície maquinada e três com tratamento de condicionamento com banhos de ácido clorídrico (HCl), seguido de ácido hidrofluorídrico (HF) e ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e outra amostra que com jateamento de partículas de

TiO<sub>2</sub> de 50 µm de diâmetro. A última amostra recebeu os tratamentos de jateamento e condicionamento ácido. O estudo concluiu que os implantes que receberam jateamento apresentaram a superfície mais rugosa seguidos pelos que receberam condicionamento ácido. Os implantes jateados que receberam tratamento ácido apresentaram diminuição na rugosidade de superfície e o grupo controle foram os maquinados. Do ponto de vista da energia superficial os implantes que receberam jateamento com TiO<sub>2</sub> deveriam ter mais pontos finos avaliados para os osteoblastos facilitando a aderência sobre superfícies hidrofóbicas. Entretanto, o compromisso entre a área de superfície e a molhabilidade parece ter alcançado maximização para a osseointegração.

Wennerberg *et al.* (2004) foram categóricos em relatar que uma variação de rugosidade de superfície muito específica, com um valor de R<sub>a</sub> entre 1 e 1,5 µm, é fator que aumenta a possibilidade de uma superfície “ideal” para que ocorra a osseointegração.

Conteno *et al.* (2005) estudou o condicionamento ácido em superfícies de titânio e, relatou que esse procedimento causa diferentes graus de corrosão e modificação na superfície com o aumento da R<sub>a</sub>.

Em uma revisão de literatura, Rompen *et al.* (2006) discutiram sobre os efeitos da topografia de superfície em implantes odontológicos sobre a integração com os tecidos moles. Eles concluíram que, apesar da superfície rugosa apresentar melhores condições para a formação e estabilização da rede de fibrinas para a adesão celular, as superfícies maquinadas apresentavam *in vivo*, melhor adesão celular ao titânio.

O sucesso clínico de restaurações com implantes de titânio é conseguido mediante desenho, tratamento e qualidade da superfície, técnica cirúrgica, qualidade óssea e suporte de carga como relataram

Castilho *et al.* (2006). Para esses autores, a composição química da superfície dos implantes pode variar consideravelmente devido à fabricação e acabamento, usinagem, tratamento térmico, decapagem e até mesmo procedimentos de esterilização.

Kim *et al.* (2008) estudaram as superfícies com jateamento de óxido de alumínio e acondicionadas por ataque ácido. Esses autores relataram que as duas superfícies tiveram efeitos benéficos em relação à biocompatibilidade e formação óssea ao redor dos implantes. Por mais que ocorresse uma diminuição no valor de rugosidade após esses tipos de tratamentos de superfície, se desenvolveram pequenas cavidades uniformes de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e picos definidos na superfície.

Carvalho *et al.* (2009) estudaram o tipo de tratamento de superfície nos implantes dentários por meio de uma revisão das diferentes superfícies de implantes citadas na literatura, assim como seus efeitos na qualidade da osseointegração, na biomecânica da distribuição de forças e no sucesso em longo prazo. Esses autores relataram que as modificações no desenho do corpo e na superfície do implante têm sido sugeridas para aumentar o sucesso em ossos menos densos por meio do hipotético ganho de uma melhor ancoragem e uma maior área de superfície para a distribuição das cargas oclusais. As propriedades superficiais mais importantes citadas pela literatura encontrada pelos autores foram topografia, química, carga superficial e molhamento. Processos relevantes para a funcionalidade do dispositivo tais como a adsorção de proteínas, interação célula-superfície e desenvolvimento celular e tecidual na interface entre o organismo e o biomaterial, são afetados pelas propriedades superficiais do implante. Os implantes podem ser classificados de acordo com a sua composição em implantes

de titânio ou constituídos de outros materiais (tântalo, ouro, cerâmicas, zircônia, etc). As superfícies dos implantes de titânio podem ser classificadas em cinco grupos: usinadas, macrotextrizadas, microtexturizadas, nanotextrizadas ou biomiméticas. Foram utilizadas as seguintes bases de dados para a pesquisa: Medline, Bireme, Biblioteca Cochrane, BBO e Lilacs, nos últimos 27 anos. De um total de 267 artigos, foram selecionados 36. A literatura demonstra que os implantes com superfície rugosa apresentam uma maior área de contato osso-implante e melhores características biomecânicas. Os implantes mais utilizados nas pesquisas de análise de superfície foram os de Ti cp. Os tipos de superfície mais estudados na literatura foram a usinada, seguida de spray de plasma de titânio (SPT) e da superfície com cobertura de hidroxiapatita.

O estudo de Elias e Mattos (2009) revelou que o processo de osseointegração dos implantes pode ser modificado pela qualidade e morfologia da superfície dos implantes. Segundo os autores, essas superfícies podem ser submetidas a diversos protocolos de tratamento. O primeiro grupo é formado pelos implantes recobertos por hidroxiapatita com a função de qualificar a osseointegração. Um segundo grupo por jateamento com partículas abrasivas, ataque com ácidos ou deposição de partículas de óxido de titânio. O terceiro grupo realiza tratamentos termoquímicos para aumentar a espessura da camada de óxido e ativar a superfície do titânio. O quarto grupo o implante é usado na condição como usinado.

## 2.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme em titânio

Biomateriais para a restauração das funções orais são propensos à colonização bacteriana e formação de biofilme (Mabboux *et al.*, 2004). O biofilme é definido como uma ou mais comunidades de microrganismos embebidas em uma matriz ou glicocálice que recobrem uma superfície sólida (Jorge, 2007). O biofilme está intimamente relacionado ao desenvolvimento das doenças cárie, periodontal (Løe *et al.*, 1965; Van Houte, 1980; Gibbons, 1989; Leite, 2009) e doenças peri-implantares (Subramani *et al.*, 2009; Busscher *et al.*, 2010; Soukos e Goodson, 2011).

Os fatores de risco associados à peri-implantite parecem estar relacionados à composição do biofilme ao redor do implante e a habilidade da bactéria aderir na sua superfície (Quirynen *et al.*, 2002). As irregularidades dos implantes promovem a formação do biofilme porque aumentam a área disponível para a adesão e principalmente, porque protegem as bactérias dos mecanismos de controle e regulação da microbiota bucal, como o sistema salivar, mastigação, deglutição (Newman, 1974) e procedimentos de higiene bucal (Quirynen *et al.*, 1990).

Essa associação entre quantidade de biofilme dentário e rugosidade superficial foi verificada sobre diferentes materiais odontológicos como: cerâmicas, titânio e resinas acrílicas e foi verificado que quanto maior a rugosidade de superfície, maior era o acúmulo de biofilme (Rimondini, 1997; Kawai *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo*, usando variadas metodologias, têm demonstrado diferenças no biofilme dentário formado sobre diferentes materiais, o que parece resultar do efeito das diferentes propriedades dos mesmos (Wise e Dykema, 1975; Auschill *et al.*, 2001; Auschill *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2003).

Foi relatado que a composição dos biomateriais pode ter influência no biofilme (Teughels *et al.*, 2006), além disso, eles são amplamente utilizados nas áreas de Odontologia e Medicina. No entanto, há a problemática de formação de biofilme sobre essas superfícies (Mabboux *et al.*, 2004; Periasamy e Kolenbrander, 2009). A solução desse problema, passaria pelo desenvolvimento de biomateriais que possibilitassem uma perfeita integração com o tecido do hospedeiro, e que limitasse a habilidade de colonização bacteriana (Drake *et al.* 1999).

Os estudos de Rams e Link (1983) e Rams *et al.* (1984) foram os primeiros a investigar a composição da microbiota do sulco e bolsa peri-implantar. Esses últimos colheram amostras de 17 implantes intraósseos colocados há pelo menos 6 meses, em 13 pacientes, utilizando microscópio de contraste de fase. Os pesquisadores encontraram altos níveis de espiroquetas e bastonetes móveis em 3 implantes considerados perdidos.

Mombelli *et al.* (1987) pesquisaram a comparação entre implantes sadios daqueles acometidos por peri-implantite. Os autores utilizaram microscópio de campo escuro e meios de cultura. Os resultados do estudo mostraram que nos implantes com peri-implantite existia uma microbiota complexa com grande proporção de anaeróbios Gram negativos, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, espiroquetas, fusiformes e bastonetes móveis. Já nos sítios sadios havia uma grande



quantidade de cocos e uma pequena quantidade de bastonetes móveis e fusiformes, não estando presentes espiroquetas.

Com relação aos biomateriais, as investigações tem se preocupado com a resposta dos tecidos no que tange a biocompatibilidade. Elagli *et al.* (1992) estudaram os efeitos do titânio em pó sobre cepas bacterianas encontradas na placa dental ou sulco gengival: *Streptococcus sanguis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Veilonella spp.*, *Neisseria mucosa*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces israeli* e *Fusobacterium nucleatum*. Os microrganismos foram expostos ao titânio em pó incorporado ao ágar e em meio de cultura líquido. Todas as cepas bacterianas desenvolveram colônias com distribuição homogênea. Não foram encontradas diferenças entre as placas com titânio em pó nos controles e também não foram observadas áreas com inibição de crescimento bacteriano. Os autores concluíram que as partículas de titânio não tiveram influência no crescimento bacteriano das sete cepas estudadas e comumente encontradas na cavidade bucal.

De acordo com Gatewood *et al.* (1993), o biofilme bacteriano provoca uma reação inflamatória aos tecidos peri-implantares, sendo essa reação semelhante nos tecidos periodontais. Segundo esses autores, fatores como tipo e localização dos conectores protéticos, altura inadequada dos conectores e localização desfavorável do implante dificultam a higienização por parte do paciente, podendo levar ao desenvolvimento de mucosite e/ou de peri-implantite.

Em estudo *in vitro*, Chang e Merritt (1994) verificaram a aderência bacteriana, contaminação e consequente infecção local de implantes. O trabalho foi desenvolvido usando corpos de prova de formato cilíndrico de 3 mm x 10 mm, de materiais ortopédicos grau

cirúrgico de aço inoxidável 316 L, titânio comercialmente puro, polimetilmetacrilato sem gentamicina e com gentamicina. Os corpos de prova de todos os grupos do estudo foram introduzidos em tubos teste contendo caldo de soja tripticase (TSB), inoculado com suspensão de  $10^7$  UFC/ml de *S. epidermidis* RP 62A e incubados sob agitação constante a 37°C. Em seguida os corpos de prova foram lavados com solução salina estéril, colocados em tubos separados contendo solução salina e posteriormente levados ao banho ultrasônico durante 15 minutos. A suspensão bacteriana resultante foi usada para contagem de colônias em Ágar de soja tripticase (TSA). Os resultados obtidos mostraram que a aderência bacteriana ao aço inoxidável foi significativamente maior do que aos outros materiais estudados e que a aderência ao polimetilmetacrilato com gentamicina foi significativamente menor. A diferença na aderência entre polimetilmetacrilato e titânio não foi significativa. Os pesquisadores concluíram que a habilidade do organismo de aderir ao material *in vitro* está relacionada à propensão de causar infecção aos tecidos circunjacentes ao biomaterial.

Persson *et al.* (1996) examinaram a microbiota da superfície interna de 28 componentes de implantes de Brånemark em 10 indivíduos parcialmente edêntulos. Foi avaliada a colonização bacteriana na superfície interna de componentes de implantes a partir de exames microbiológicos e radiográficos de próteses fixas que estiveram em uso por um período de 1 a 8 anos. As amostras bacterianas foram obtidas de várias superfícies internas do sistema implante, onde a identificação foi baseada na coloração de Gram, sensibilidade ao oxigênio e testes bioquímicos. A superfície interna dos diferentes componentes do implante Brånemark, após vários períodos de uso na cavidade oral,

consistiu de microbiota anaeróbia. As amostras individuais mostraram grande variação. A microbiota constituiu de *estreptococcus* facultativos e anaeróbios, bacilos anaeróbios Gram-positivos como: *Propionibacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Prevotella spp.* e *Porphyromonas spp.*

Esposito *et al.* (1998) realizaram uma revisão meta analítica sobre os critérios epidemiológicos de sucesso e dos fatores biológicos que contribuem para a falha dos implantes orais osseointegrados e, dentre os diversos fatores relacionados, verificaram que os implantes com tratamento de superfície apresentavam maior prevalência de perda por peri-implantites do que os implantes usinados, sendo atribuído às diferenças de desenho e características de superfície.

No estudo de Steinberg *et al.* (1998) foi relatado sobre a aderência de *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomicetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* ao titânio (Ti) e a liga de titânio (Ti-6Al-4V) revestido com albumina ou saliva humana. Todas as cepas testadas mostraram adesão maior à liga de titânio do que ao titânio propriamente dito. O estudo concluiu que as bactérias orais têm diferentes afinidades de adesão para titânio e liga de titânio, enquanto que a albumina e a saliva reduzem a aderência bacteriana.

Em relação à influência da modificação de superfície do titânio sobre a adesão inicial da *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomicetencomitans*, Yoshinari *et al.* (2000) relataram que as modificações de superfície foram realizadas por processos secos que incluíram implantação dos íons (Ca<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>, F<sup>+</sup>), oxidação (oxidação anódica e spray de titânio), revestimento com íon (TiN, alumina) e emissão de íons mistos (Ag, Sn, Pt) com Ar<sup>+</sup> sobre placas polidas de

titânio puro. Comparando-se as duas bactérias, foram observadas grandes quantidades de *P. gingivalis* e *A. actinomycetencomitans* aderidas às placas de titânio puro polido. Os resultados indicaram que os implantes de titânio expostos na cavidade oral requerem a modificação de superfície para inibir a aderência bacteriana e que a modificação de superfície com processo seco seria útil para controlar a adesão bacteriana, bem como assegurar a resistência contra a corrosão.

Segundo Heydenrijk *et al.* (2002), a microbiota oral é determinante na composição da microbiota peri-implantar e a microflora presente ao redor de implantes estáveis é semelhante a placa subgingival de pacientes saudáveis, assim como a placa na peri-implantite é a mesma da doença periodontal. Além disso, esses autores afirmaram que os microrganismos potencialmente patogênicos da flora oral não estão necessariamente associados à etiologia da peri-implantite a qual é provavelmente multifatorial, e que as características genéticas do hospedeiro são fatores a serem considerados.

Scarano *et al.* (2003) citam que o nitrato de titânio tem sido utilizado por ser um revestimento cirúrgico fazendo com que os materiais fiquem mais resistentes ao desgaste e à corrosão. Em função dessa característica os autores realizaram uma avaliação *in vivo* para verificar a adesão bacteriana em grupo teste com nitrato de titânio revestido (TiN) e o grupo controle não revestido. Participaram do estudo 6 pacientes com idade entre 21 a 25 anos e excelente saúde sistêmica, boa saúde periodontal e sem sinais de respiração bucal. Foi colocado em cada um dos participantes do estudo um dispositivo de acrílico removível adaptado na região de pré-molares de cada quadrante da mandíbula. Um implante de titânio de 4 x 13 mm foi colocado na face

vestibular de cada dispositivo. O implante passou por pulverização de plasma spray em 11,5 mm do corpo do implante, enquanto que a cervical foi maquinada. Após 24 horas, os implantes foram removidos de cada dispositivo e processados para visualização em MEV para a avaliação da porção usinada do implante coberto por bactérias. Os resultados do estudo mostraram que nos implantes teste a superfície coberta por bactérias foi significativamente menor em relação com a de implantes do grupo controle. A rugosidade da superfície foi semelhante em ambos os grupos, enquanto que as superfícies de TiN mostraram uma significativa redução da presença de bactérias, e este fato poderia ser importante na diminuição da inflamação dos tecidos moles peri-implantares.

Kuula *et al.* (2004) revelaram que estudos *in vitro* têm mostrado a atração bacteriana de diversas espécies às superfícies de titânio através de suas membranas protéicas. Entre elas, a *Fusobacterium nucleatum* parece ter pouca atração pelo titânio. Já a *P. gingivalis* e a *Prevotella intermedia* têm um nível maior de afinidade ao titânio. Se algumas bactérias anaeróbias têm a capacidade de aderir diretamente à superfície inerte do titânio, isso pode ter consequência no manejo da infecção dos tecidos peri-implantares.

Pier-Francesco *et al.* (2006) relatam que o implante tem sido um material muito utilizado na Odontologia por ser uma importante alternativa para o tratamento de dentes perdidos. As falhas desse biomaterial são causadas pela infecção bacteriana (peri-implantite) ocasionando perda de tecido ósseo e conseqüentemente perda do implante. Para esses pesquisadores a adesão bacteriana na superfície dos implantes pode ser influenciada pela rugosidade de superfície do material e energia livre de superfície. Os autores desenvolveram um

estudo sobre essa temática objetivando modificar as propriedades do titânio e identificar o efeito das modificações sobre a adesão bacteriana. Foram preparadas 16 amostras de titânio com diferentes rugosidades ( $R_a=34,57-449,42$  nm) usando procedimentos de polimento específicos. Dessas amostras, seis foram quimicamente alteradas por tratamento com plasma argônio e imersão em solução de silano para produzir diferentes hidrofobicidades de superfície. Um teste de adesão *in vitro* usando *Porphyromonas gingivalis* foi usado para avaliar o efeito da modificação sobre a adesão bacteriana. A superfície do material com  $R_a=155,00\pm 5,79$  nm, categorizada como muito lisa, teve uma significativa redução da adesão bacteriana. Esta redução não ocorreu com as superfícies lisa ( $R_a=155,00\pm 33,36$  nm), rugosa ( $R_a=223,24\pm 9,86$  nm) ou muito rugosa ( $R_a=449,42\pm 32,97$  nm). A alteração da hidrofobicidade da superfície do material não fez efeito sobre a adesão bacteriana. Os autores concluíram que a adesão de *Porphyromonas gingivalis* ao titânio foi inibida para superfície com níveis de rugosidade abaixo daqueles geralmente encontrados para implantes ( $R_a=350$  nm). As considerações sobre esses achados podem ser benéfica na produção de implantes de titânio a fim de reduzir a colonização bacteriana.

Alguns pesquisadores como Jardim Jr. *et al.* (2006) avaliaram as características de topografia superficial e contaminação de implantes desenvolvidos para pesquisas. Utilizaram implantes com tratamento de duplo ataque ácido e analisados através de interferometria a laser e culturas por 3 e 14 dias a 37°C. Os resultados não apresentaram microrganismos na superfície independente da rugosidade superficial.

Segundo Teughels *et al.* (2006) superfícies rugosas acumulam e retêm maior quantidade de placa. Além disso, após vários dias de

formação de placa “sem perturbação”, superfícies rugosas desenvolvem uma placa mais madura caracterizada pelo aumento de colônias, organismos móveis e espiroquetas. Assim, com a consequência de sua forma, superfícies dentárias com a superfície rugosa são mais frequentemente cercadas por um periodonto inflamado, caracterizado por um alto índice de sangramento, aumento do líquido clevicular e aumento do infiltrado inflamatório.

Fürst *et al.* (2007) observaram uma deficiência de informações sobre a colonização inicial e a formação do biofilme nos implantes de titânio, e nenhuma informação do impacto das bactérias presentes nos dentes vizinhos. Assim, em seu estudo avaliaram implantes 30 minutos após a sua colocação, 1, 2, 4, 8 e 12 semanas após, observando que a colonização iniciava 30 minutos após a colocação do implante. Salientaram ainda que a colonização inicial se dá em padrões diferentes quando se considera a superfície dentária e a superfície do implante, principalmente no padrão de distribuição de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e algumas espécies de estreptococos.

Berglundh *et al.* (2007) estudaram superfícies tratadas com a associação de jateamento e condicionamento ácido na progressão espontânea da peri-implantite em cães. Esse estudo concluiu que a progressão da peri-implantite é mais acelerada nas superfícies rugosas do que nas superfícies polidas (lisas).

Alguns pesquisadores como Esposito *et al.* (2007) relataram que apesar de não terem encontrado evidências de que determinada superfície seja fator decisivo para o sucesso a longo prazo dos implantes, concluíram em seu estudo que os implantes usinados têm menores probabilidades de desenvolverem peri-implantite crônica.

Pongnarisorn *et al.* (2007) avaliaram diferentes tipos de tratamento de superfície na porção transmucosa de implantes. Utilizaram os implantes usinados, condicionados com ataque ácido, anodizados e usinados com uma fenda circunferencial. Sugeriram que o desenvolvimento da inflamação associada aos implantes independe do tipo de superfície, mas sim a presença de placa. Além disso, observaram que o tipo da superfície não tem influência na qualidade do infiltrado inflamatório, sendo as células T predominantes em todos os casos, assim como parece não ter influência no tipo de microbiota peri-implantar. Embora a presença de ranhuras na área subgingival facilita o acúmulo de placa e, conseqüentemente, aumenta o infiltrado inflamatório. Essa pesquisa concluiu que não houve relação entre os diferentes tipos de superfícies, tanto na natureza do infiltrado inflamatório e nem na microbiota peri-implantar.

Silva *et al.* (2007) revelaram que as complicações biológicas em implantes relacionadas à mucosite peri-implantar e a peri-implantite, têm sido descritas e evidências sugerem um papel primário do biofilme bacteriano na etiologia destas doenças. Os processos biológicos que podem levar a falha dos implantes após a confecção das próteses ainda são pouco compreendidos. Em relação a isso, diversas variáveis como idade, gênero, índice de higiene bucal, presença de mucosa queratinizada e ausência de terapia periodontal de suporte, têm sido relatadas como potenciais fatores de risco para as doenças peri-implantares e ainda necessitam de maiores investigações científicas. Além disso, são controversos os achados de estudos prévios sobre a influência de determinadas características relacionadas ao indivíduo como presença ou histórico de doença periodontal e outras relacionadas aos implantes,



como o tempo de função, no desenvolvimento dessas doenças. Os autores realizaram um estudo transversal a fim de investigar a prevalência de complicações biológicas em implantes e potenciais indicadores de risco em 125 indivíduos parcialmente desdentados. As prevalências de mucosite peri-implantar e de peri-implantite foram, respectivamente, de 72,8% e 8%. O tempo de função dos implantes foi associado com uma profundidade de sondagem peri-implantar aumentada e com perda óssea. Apesar de indivíduos com periodontite apresentarem maior profundidade de sondagem peri-implantar e supuração sua presença não foi associada significativamente com a ocorrência das doenças peri-implantares. Os resultados deste estudo demonstraram a importância da utilização dos parâmetros clínicos no monitoramento dos implantes osseointegrados, assim como a influência das condições periodontais na manutenção da saúde peri-implantar.

Bjerkkan *et al.* (2009) usaram um modelo *in vitro* de biofilme onde foram comparados quatro métodos de amostragem em superfícies de discos de titânio e aço, os quais foram incubados em caldo de Mueller Hinton. Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, e *Propionibacterium acnes*, foram utilizadas para o estudo. As bactérias não aderidas foram removidas por lavagem. Foram utilizados 10 discos para cada cepa, onde compreendeu a recuperação bacteriana por: (1) sonicação dos discos, (2) raspagem dos discos utilizando lâminas cirúrgicas em placas de ágar, (3) raspagem dos discos seguida por mistura de vórtice das lâminas cirúrgicas e (4) raspagem dos discos seguido de sonicação das lâminas cirúrgicas. Culturas quantitativas de bactérias foram realizadas para cada método de amostragem. Os resultados do estudo demonstraram que com exceção

dos *S. epidermidis* em superfície de aço, a sonicação se mostrou eficiente e confiável, desalojando bactérias do biofilme. Quanto aos métodos de raspagem, não desalojaram bactérias do biofilme. Eles concluíram que a raspagem de superfícies metálicas não é um método adequado para utilização de amostras de bactérias do biofilme *in vitro*.

As inovações nas técnicas cirúrgicas, na forma e superfície dos implantes e nos componentes protéticos, têm trazido resultados cada vez melhores na reabilitação com implantes segundo Gonçalves *et al.* (2009). Para os autores, entre os inúmeros discursos positivos podem-se verificar algumas dúvidas, principalmente relacionadas à manutenção dos implantes provocada pela peri-implantite, doença que pode ocasionar a perda óssea e o fracasso da restauração. Assim como a doença periodontal, a peri-implantite também apresenta caráter multifatorial e vem sendo discutidos, além de várias terapias sugeridas para o seu tratamento, entre elas estão os procedimentos mecânicos de raspagem e remoção do biofilme peri-implantar, associados ou não às terapias antimicrobianas locais ou sistêmicas. Os autores avaliaram o potencial de redução bacteriana do laser de diodo 980 nm em três diferentes tipos de superfícies de implantes dentários contaminados com *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis*, bem como estudar por microscopia eletrônica de varredura possíveis alterações na superfície dos implantes irradiados. Foram utilizados 72 implantes com diferentes tratamentos de superfície (usinado, jateados com óxido de titânio e ataque ácido). Os implantes foram contaminados com duas cepas bacterianas, *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis*, e, posteriormente, irradiados pelo laser de diodo 980 nm, nas potências de 2,5 e 3,0 W. Após os tratamentos a laser, o número de unidades

formadoras de colônias foi analisado e o grupo controle, não contaminado, mas irradiado pelo laser, foi submetido à microscopia eletrônica de varredura, para a avaliação de possíveis alterações na superfície dos implantes. Os resultados mostraram que houve 100% de redução bacteriana nos implantes irradiados com 3,0 W, e redução bacteriana total dos implantes contaminados com *Porphyromonas gingivalis*, mesmo quando irradiados com 2,5 W. A redução bacteriana só não foi total para os implantes contaminados com *Enterococcus faecalis* irradiados com potência de 2,5 W e com superfície jateada com óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) (78,6%), e com superfície com ataque ácido (49,4%). A análise em microscopia eletrônica de varredura mostrou que, com os parâmetros energéticos utilizados nesta pesquisa, não houve alteração da superfície dos implantes. Foi concluído que o laser de diodo 980 nm foi efetivo na descontaminação do *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* sem promover a alteração na superfície dos implantes.

Mioralli (2009) estudou a aderência bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio comercialmente puro de superfície lisa e modificada por irradiação a laser. Foram usados corpos de prova em forma de discos com dimensões 12 mm x 2 mm e duas cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis*. A topografia das superfícies foi visualizada por MEV. Os discos de Ti cp foram incubados em meio de cultura caldo de Mueller Hinton inoculado com suspensão bacteriana da ordem de 10<sup>8</sup> (UFC/ml), durante 1, 6, 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo de tempo os discos foram retirados, lavados em solução salina fisiológica e após foram colocados em novos tubos contendo 5,0 ml de solução salina fisiológica esterilizada e submetida ao banho

ultrassônico de 40 kHz por 8 minutos. Foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ), semeadas em ágar Mueller Hinton e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C para aguardar o desenvolvimento bacteriano. As colônias crescidas foram contadas, numeradas e o valor expresso em UFC/ml para cada diluição. Os discos removidos do banho ultrassônico foram preparados para observação em MEV. A medida do ângulo de contato foi verificada por meio de goniômetro. O resultado da avaliação da viabilidade das células de biofilme de *S. mutans* sobre a superfície lisa em média foi de  $1,66 \pm 1,67 \times 10^6$  e sobre a superfície rugosa  $1,06 \pm 1,07 \times 10^6$  num intervalo de confiança de 5%, as medidas não foram significativamente diferentes. Em média as células viáveis do biofilme de *S. epidermidis* sobre a superfície lisa foram de  $6,68 \pm 5,83 \times 10^6$  num intervalo de confiança de 5%, as médias não são significativamente diferentes. Em média as células viáveis do biofilme de *S. epidermidis*, recuperadas em vários intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72 h) da superfície rugosa  $7,16 \pm 2,34 \times 10^6$  ( $\alpha=5\%$ ) são significativamente diferentes. Apesar de a superfície lisa ser hidrofóbica, com um ângulo de  $75^\circ$  e a superfície rugosa hidrofílica, ambas as superfícies permitiram a aderência bacteriana e formação de biofilme, o que foi comprovado por MEV e por cultura. Quando comparadas as superfícies lisa e rugosa, não foi observada redução significativa no número de bactérias aderidas à superfície rugosa, o que permitiu os autores concluir que a modificação de superfície por laser de alta intensidade cria superfície favorável para aderência de *S. mutans* e *S. epidermidis*, sem reduzir a aderência bacteriana, o que pode ser fator de risco para adquirir infecção.

O sucesso dos implantes dentários depende da osseointegração entre o implante e osso circundante e de uma mucosa livre de processo inflamatório, segundo Bürgers *et al.* (2010). Esses autores revelaram que enquanto os problemas na cicatrização óssea de implantes parecem estar em grande parte resolvida, a vedação da superfície do implante pode ser crucial para o sucesso terapêutico em longo prazo. A adesão microbiana e a acumulação do biofilme desempenham papéis importantes na patogênese da peri-implantite e consequente perda do implante. Eles objetivaram desenvolver um estudo *in vitro* e *in vivo*, tendo duas finalidades: avaliar a formação inicial de biofilme em superfícies diferentes de implante de titânio, por meio de duas técnicas fluorescentes altamente sensíveis e, segundo, para correlacionar os dados com diferentes propriedades da superfície. Para a formação de biofilme *in vivo* foram colocados discos de titânio na face vestibular de dentes molares de seis participantes do estudo durante 12 horas. Como tratamentos de superfície foram utilizados discos de titânio puramente usinado (Pt) e jateados seguido de ataque ácido (Prom), para verificação da adesão bacteriana *in vitro*. Foi utilizada após a incubação a suspensão de *Streptococcus sanguinis* (37°C, por 2 h). Bactérias aderentes foram quantificadas pela técnica de fluorescência: coloração de resazurina em combinação com um leitor de fluorescência automatizado para verificação de células vivas e mortas e microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que na superfície Prom a rugosidade média ( $R_a$ ) foi significativamente maior (0,95 mm). Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram uma adesão significativamente maior de bactérias em Prom do que a superfície Pt. A formação inicial de biofilme em Pt correspondeu à modificação da superfície circular sobre o substrato.

Ambas as observações podem ser atribuídas à influência predominante da superfície rugosidade na adesão bacteriana. Essa pesquisa concluiu que a adesão bacteriana inicial às superfícies de titânio com texturas diferentes é primariamente influenciada pela  $R_a$ , enquanto que a influência da energia livre de superfície parece ser de menos importância. Assim, as partes microestruturadas de um implante que são expostos à cavidade bucal devem ser altamente polidas para evitar o acúmulo de placa bacteriana. Ambas as técnicas fluorescentes testadas, mostraram-se altamente sensíveis e reprodutíveis para a quantificação e formação do biofilme sobre superfícies de implantes de titânio.

Romeiro *et al.* (2010) enfatizaram que a aderência de microrganismos às superfícies bucais rígidas como o esmalte, material restaurador ou implante, é um pré-requisito para a formação do biofilme, que pode, eventualmente ocasionar cárie, doença periodontal ou peri-implantite. Esses autores analisaram *in vitro* a aderência bacteriana de *Streptococcus sanguinis* às superfícies dos implantes dentários tratados com jateamento de fosfato de cálcio, anodização, duplo ataque ácido e os de superfície lisa. Foram selecionados 40 implantes, sendo 10 de cada superfície. Para análise da aderência, foram preparadas suspensões do microrganismo contendo  $10^6$  células/ml em espectrofotômetro. O implante foi removido da embalagem e colocado diretamente no caldo. Em seguida, foram acondicionados separadamente em poços de placas de cultura de células contendo caldo sacarosado (placa *in vitro*) e a suspensão do microrganismo. Após 24 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , os implantes foram lavados três vezes durante um minuto em solução salina estéril e colocados em sonicador com 10 ml de salina para dispersão das células aderidas. A seguir, foram realizadas diluições

seriadas e semeaduras em meios de cultura específico para cada microrganismo. Após 48 h de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram uma grande aderência dos microrganismos às superfícies estudadas. A superfície anodizada apresentou os menores valores de aderência dos dois microrganismos, já a superfície submetida ao duplo ataque ácido apresentou maiores valores de UFC/ml.

Fröjd *et al.* (2011) relataram que o tecido mole ao redor dos implantes dentários forma uma barreira entre o meio bucal e do osso-implante, sendo um fator crucial para o sucesso a longo prazo da terapia. Revestimentos de derivados nanoporosos em TiO<sub>2</sub> têm sido utilizados para melhorar a fixação do tecido ao implante. No entanto, o seu efeito na adesão e formação de biofilme por bactérias orais é desconhecido. Em virtude disso, esse estudo investigou as propriedades de superfície em pilares de implantes torneados, revestidos de sol-gel de TiO<sub>2</sub> nanoporoso e superfícies anodizadas Ca<sup>+2</sup>, verificando a formação de biofilme de dois colonizadores orais: *Streptococcus sanguinis* e *Actinomyces naeslundii*. As bactérias foram detectadas usando a hibridização fluorescente *in situ* com microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados do estudo com interferometria e microscopia de força atômica revelaram incubação das bactérias *S. sanguinis* e *A. naeslundii* em toda superfície lisa. Não houve diferenças na adesão entre as superfícies no período de 2 horas. Após 14 horas, o nível de crescimento do biofilme foi baixa, e, novamente, não houve diferenças entre as superfícies estudadas. A presença de saliva diminuiu o volume de biofilme de *S.*

*sanguinis* e *A. naeslundii* em 10 vezes em comparação quando não havia presença de saliva, isso se deve a adesão aumentada ao invés do crescimento do biofilme. O estudo concluiu que a modificação nanotopográfica da superfície de titânio lisa não teve nenhum efeito na adesão bacteriana no início do experimento, em comparação com as superfícies transformadas ou aquelas tratadas com oxidação anódica na presença de  $Ca_2$ . A presença de saliva levou a um significativo aumento no volume do biofilme, mas não foram observadas diferenças significativas entre as superfícies de teste. Estes dados observados sugerem que a modificação com sol-gel de  $TiO_2$  nanoporoso *in vivo*, não causaram maior formação de biofilme se comparada as outras superfícies testadas.

### **2.3 Sistema de boca artificial – técnica do microcosmo**

O estudo da placa *in vivo* se torna difícil devido a sua heterogeneidade, a pouca quantidade disponível, acesso limitado, os ambientes variados e sem a possibilidade de controle, além dos problemas éticos. A placa dental humana é um biofilme complexo com diferentes concentrações de espécies bacterianas nos diferentes ambientes. Frente às limitações citadas, Wong e Sissons (2001) desenvolveram um sistema de cultura de placa em “boca artificial”, com o intuito de estudar o microcosmo, a fim de solucionar as limitações do estudo dos biofilmes. O microcosmo é definido como uma entidade microbiológica que representa a placa dental natural *in vitro*. Deste



modo, o microcosmo retém a complexidade natural do biofilme oral, sua biodiversidade e estrutura heterogênea (Sissons *et al.*, 1991; Sissons, 1997).

As propriedades de crescimento e patogenicidade da placa bacteriana resultam da interação entre a microbiota e o ambiente oral e têm sido estudadas através de modelos experimentais compostos por espécies isoladas ou pequenos grupamentos como relatam os pesquisadores Wong e Sissons (2001). Segundo os autores, a formação da placa a partir de microcosmos é uma versão *in vitro* da placa natural, e tem sido explorada como um modelo de microflora porque está situada num ambiente mais controlado e manipulável. O microcosmo é obtido a partir de uma “boca artificial”, ou seja, é um sistema de cultivo de placa das bactérias da flora natural *in vivo*. O meio de cultivo é a saliva humana. Para a obtenção deste meio, coleta-se saliva de um doador que se absteve de higiene oral por 24 h, visando aumentar as bactérias na saliva). O objetivo desse estudo foi examinar se uma nova constituição química definida de saliva artificial ou meio definido enriquecido com mucina (DMM), poderia substituir por o meio utilizado anteriormente, chamado de mucina basal média (BMM), um análogo da saliva em grande escala para a cultura de biofilme. O meio DMM contém vários íons, mucina, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento em concentrações geralmente semelhantes aos descritos na saliva, enquanto que BMM continha extrato de levedura, peptonas e mucina. Concluiu-se que houve taxas reais e padrões de crescimento de biofilmes em placas de microcosmos, com os meios DMM e BMM. No entanto, o uso de DMM permite modificações específicas nas condições de nutrientes

durante a cultura em grande escala de biofilme no sistema de "boca artificial" ou microcosmos.

Atualmente, alguns pesquisadores têm buscado a utilização da técnica do microcosmo a partir da saliva de pacientes devido a sua maior capacidade de mimetizar a realidade da cavidade bucal para os mais diferentes estudos, na maioria deles, voltada para as áreas de Cariologia e testes com substâncias antimicrobianas (Sissons *et al.*, 1991; Sissons, 1997; Filoche *et al.*, 2007; Filoche *et al.*, 2008; Leite, 2009; Zaura *et al.*, 2011). Esses pesquisadores utilizaram a técnica do microcosmo para estudar biomassa e viabilidade bacteriana pós-tratamentos com antissépticos orais, concluindo que a biomassa foi diminuída por todas as soluções testadas.

Noar *et al.* (2003) utilizaram a técnica do microcosmo e relataram que a formação de biofilme em superfícies metálicas combinadas com um elevado teor de água gerado a partir de saliva, produz um ambiente ideal para o processo de corrosão na boca. Grandes agregados de bactérias formam catodos locais ou anodos, que resultam em uma corrente de corrosão. Além disso, a atividade do metabolismo das bactérias pode levar à acumulação de ácidos que podem favorecer a corrosão. Esses autores avaliaram o comportamento (*in vitro*) corrosivo de restaurações de amálgama de prata revestidas com magnetos neodímio-ferro-boro. As placas foram cultivadas por microcosmo em discos de neodímio-ferro-boro ou amálgama num fermentador. Os biofilmes foram formados a partir de saliva artificial e o crescimento foi determinado por contagem de células viáveis. Os resultados mostraram que a corrosão dos magnetos de neodímio-ferro-boro tiveram uma perda média diária de  $0,115 \pm 0,032\%$ . No entanto, quando os magnetos

estavam em estreita proximidade com o amálgama, a quantidade de corrosão foi reduzida a uma perda diária de  $0,066 \pm 0,023\%$ . A maior perda de elementos constituintes provenientes dos produtos de corrosão dos magnetos foi observada para o ferro. A composição das placas a partir dos microcosmos entre os dois materiais, foram diferentes significativamente. *Streptococcus veillonella spp.*, presentes nos biofilmes, cresceram em magnetos na presença de amálgama. Os resultados mostraram que a corrosão de neodímio-ferro-boro é limitada e, na presença de amálgama é ainda mais reduzida. Estes autores sugerem que o amálgama presente na boca não irá causar um aumento do risco clínico, em termos de biocompatibilidade com neodímio-ferro-boro.

Walker e Sedlacek (2007) relataram que diversos modelos de biofilme têm sido descritos para o estudo de bactérias associadas com a placa bacteriana subgengival. No entanto, existem poucos modelos disponíveis para o estudo da placa subgengival. Portanto, os autores objetivaram desenvolver e validar um modelo que imitava a composição da flora subgengival. Eles descreveram um modelo de biofilme de placa subgengival por meio de discos de hidroxiapatita os quais foram revestidos durante a noite com 10% de saliva estéril, colocados em placas de cultura de fundo plano contendo caldo tripticase de soja, diretamente inoculados com uma pequena alíquota de placa subgengival e incubadas anaerobicamente. Esses discos foram transferidos para meio úmido em intervalos de 48 horas até o seu completo crescimento e formação do biofilme em 10 dias. Os resultados do estudo mostraram que com base em amostras de 8 indivíduos com periodontite e 8 indivíduos saudáveis, o modelo rendeu um biofilme com multiespécies, com resultado heterogêneo, consistindo de espécies gram-positivas e

gram-negativas. Ainda o estudo revelou 15 a 20 espécies cultiváveis de bactérias associadas com a flora subgengival e comparáveis com as amostras de placa iniciais de indivíduos saudáveis e os biofilmes maduros apresentavam similaridade de espécies em 81% e similaridade de 70% nas proporções presentes. Os biofilmes formados a partir de amostras obtidas de indivíduos periodontalmente doentes foram 69% semelhantes em espécies. O estudo concluiu que esse modelo de biofilme reproduziu a composição da placa subgengival de espécies cultiváveis. Existiam diferenças entre biofilmes cultivados a partir de sítios doentes e não doentes com presença de agentes periodontais patogênicos em níveis microbianamente significativos.

Ledder *et al.* (2009) utilizaram uma técnica de microcosmo para avaliação de enzimas hidrolíticas como agentes de controle de placa, porém esse microcosmo foi criado a partir de culturas puras de *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Polymorphum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Neisseria subflava*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* e *Veillonella dispar* que cresceram em anaerobiose a 37°C por 7 dias em meio Wilkins-Chalgren antes da inoculação.

Mei *et al.* (2009) também se utilizaram da técnica de microcosmo artificial para avaliação de biofilmes sobre superfície braquete-adesivo-esmalte.

Já Guggenheim *et al.* (2009) utilizaram essa mesma técnica para avaliar a interação do biofilme formado com uma cultura primária de células epiteliais humanas para buscar um melhor entendimento entre o biofilme e os tecidos do hospedeiro.

Van De Sande *et al.* (2011) salientaram que comunidades de biofilmes naturalmente formados *in vivo* são frequentemente difíceis de estudar na maioria das condições experimentais, porque apresentam uma série de variáveis não controladas e questões éticas. Segundo esses autores, o desenvolvimento de metodologias que proporcionam a criação de biofilmes sob condições controladas tem sido útil para estudar processos naturais. Os biofilmes formados pelo microcosmo têm demonstrado a dinâmica da complexa comunidade e são semelhantes ao biofilme dental natural. Segundo esses estudiosos os sistemas de biofilmes são desenvolvidos em microplacas parecem ser uma alternativa vantajosa para obter resultados rapidamente quando vários testes precisam ser abordados. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo pré-clínico de formação de biofilme determinando o tempo de formação e regime de concentração em exposição à sacarose. Foram usados como substrato discos de esmalte bovino (5 mm de diâmetro x 2 mm de espessura), onde foram colocados em placas de 24 poços, com um inóculo de saliva humana com fatores de crescimento (nutrientes) o meio definido enriquecido com mucina (DMM) com pH 6,8. Os biofilmes foram cultivados por até 10 dias com o meio DMM suplementado com sacarose e avaliados em 5 e 10 dias em regime de sacarose a 1% durante 6 horas. Os dados foram coletados com leituras de pH e a porcentagem da mudança de dureza da superfície do esmalte. Uma avaliação de dose-resposta foi realizada com clorexidina (CHX) que afeta significativamente o pH e a perda mineral. Em geral os parâmetros estabelecidos do modelo, 5 dias de crescimento do biofilme em exposição intermitente à sacarose 1% de 6 h por dia, mostrou-se

adequado como modelo pré-clínico para estudos de desmineralização de esmalte e de dose-resposta.

Stefenon (2012) estudou o desenvolvimento de biofilme através da técnica de microcosmo sobre superfície de titânio e de discos padronizados de esmalte/dentina. O objetivo era comparar a formação do mesmo nas duas superfícies e em diferentes tempos, assim como, analisar a rugosidade superficial dos materiais antes e depois do experimento e o pH do meio de cultura. As análises mostraram que não houve diferença estatística entre as médias de rugosidade inicial e final. O biofilme formado foi maior na superfície de esmalte/dentina sendo o pico de crescimento em 24 horas. O pH do meio sofreu alcalinização com o passar do tempo sendo mais básico em 48 h. Foi concluído que mais análises são necessárias para testar a competência experimental do modelo, porém os dados obtidos sugerem que o modelo apresentado seja analisado em até 48 h e que mais estudos comparativos entre as superfícies devem ser feitos para justificar a diferença na formação de biofilme que foi maior nas amostras de tecido dentário.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a formação de biofilme sobre diferentes superfícies de titânio em diferentes períodos de tempo, por método microbiológico e microscopia eletrônica.

E, pelos objetivos específicos:

- Avaliar e correlacionar a rugosidade média das diferentes superfícies de Ti cp grau 4: lisas (L) (controle) e rugosas: jateadas com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J), subtração por ataque ácido nítrico (A) e jateadas com óxido de alumínio acrescido de ataque ácido nítrico (JA), por meio de rugosímetro óptico e visualização por meio da microscopia eletrônica de varredura, previamente à formação de biofilme.

- Avaliar a formação do biofilme sobre as diferentes superfícies de titânio: lisas (L) (controle), jateadas com óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (J), subtração por ataque ácido nítrico (A) e jateadas com óxido de alumínio acrescido de ataque ácido nítrico (JA) nos tempos de 12, 24, 48 e 168 horas, por método microbiológico (técnica do microcosmo) e MEV.

Tem-se como hipótese que existe maior formação de biofilme nos grupos com tratamento de superfície (discos rugosos) do que o grupo controle (L) em todos os tempos da pesquisa.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Passo Fundo (UPF) sob parecer número 141/2012 e protocolo nº 062/2012 (Apêndice 1). Um doador assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndice 2).

Foi realizado um estudo *in vitro*, aleatorizado, no qual foram formados biofilmes em placas de micropoços sobre discos de Ti cp grau 4, tendo como inóculo a saliva (microcosmos) de um doador, portador de doença periodontal, não fumante, que não havia utilizado antibióticos no último mês e que permaneceu sem higienização por 24 h, previamente selecionado pelo pesquisador. Os parâmetros para seleção eram bolsas periodontais com mais de 4 mm de profundidade com sangramento e/ou supuração (SS) à sondagem periodontal e com níveis de inserção clínica de no mínimo 4 mm (NI) (Socranski *et al.*, 1998). Após a coleta da saliva, o voluntário foi encaminhado para tratamento periodontal na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) na Clínica de Periodontia.

Os biofilmes foram crescidos independentemente por até 168 horas (7 dias), sobre 10 discos para cada inóculo (n=10) e analisados em quatro tempos (12, 24, 48 e 168 horas), totalizando 40 espécimes de cada tipo de superfície (N=160). Desses, 20 espécimes foram avaliados por



meio de MEV, 4 anterior à formação de biofilme para avaliação das superfícies e 4 de cada superfície em cada tempo após a técnica do microcosmo, somando 16 corpos de prova.

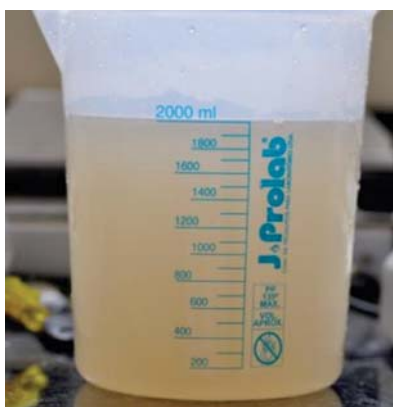
#### **4.1 Obtenção do meio definido enriquecido com mucina (DMM) – saliva artificial**

A obtenção do meio DMM foi realizada conforme protocolo descrito por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5 g/l), ureia (1,0 mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl<sub>2</sub>, 1,0; MgCl<sub>2</sub>, 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH<sub>4</sub>Cl, 2,0), mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/peptídeo (em mmol/l), em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina (2,38), leucina (3,68), serina (3,46), treonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38), e caseína (5,0 g/l).

Nas Figuras 1 e 2 são mostradas as etapas para obtenção da saliva artificial pelo meio DMM.



*Figura 1 – Meio DMM sendo preparado e homogeneizado.*



*Figura 2 – Meio DMM acrescido de solução salina fisiológica, segundo protocolo de Wong e Sissons (2001).*

#### **4.2 Coleta e processamento da saliva humana**

Foi realizada a coleta de 70 ml de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm “M”®, American National Can TM, Chicago, IL, EUA) de um doador, portador de doença periodontal que havia suspenso a higiene oral por 24 horas e ficado em jejum previamente a manhã da coleta. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril, transportada em caixa de isopor com gelo ao Laboratório de Microbiologia da UFPel. A saliva foi filtrada através de lã de vidro estéril, armazenada em um recipiente estéril e homogeneizada em vortex (Filoche *et al.*, 2007). Foram separadas da saliva coletada do voluntário, duas alíquotas para quantificação bacteriana (dados em UFC/ml).

#### **4.3 Corpos de prova**

Os discos de Ti cp grau 4, foram adquiridos estéreis por meio de radiação gama com dose de 25 KGy. Os corpos de prova possuíam 5 mm de diâmetro e 3 mm de espessura e foram doados pela empresa Titanium Fix® - AS Technology Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil, já com os tratamentos de superfície desejados para o estudo e padronizados em sua embalagem final.

Nas Figuras 3 e 4 são mostrados os corpos de prova em sua embalagem final prontos para o experimento.



*Figura 3 – Remoção da cápsula contendo os discos de Ti cp para a verificação da  $R_a$ .*



*Figura 4 – Remoção da cápsula contendo os discos de Ti cp para a verificação da  $R_a$  – continuação.*

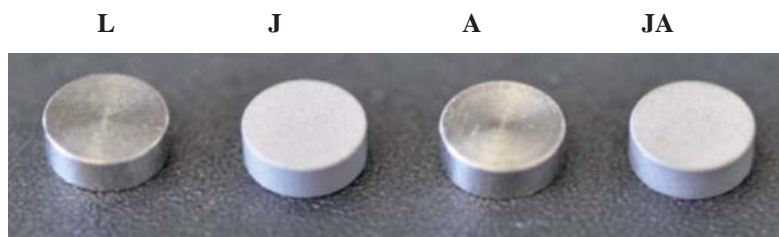
Os espécimes foram divididos em quatro grupos, como seguem:

- superfície lisa (L): grupo controle
- deformação por jateamento (J) com  $Al_2O_3$

- subtração por ataque ácido nítrico (A)
- jateamento com óxido de alumínio acrescido de ataque ácido nítrico (JA).

As partículas de óxido de alumínio eram com tamanho de 60 a 100  $\mu\text{m}$ , informação dada pela empresa doadora dos corpos de prova. A forma como foram realizados os tratamentos de superfície e a concentração de ácido utilizado para a manufatura dos discos, não foram revelados pelo fabricante, porque segundo eles, constitui segredo da empresa.

A Figura 5 mostra os corpos de prova para o estudo. Da esquerda para a direita L, J, A e JA, respectivamente.



*Figura 5 – Foto mostrando as 4 superfícies de Ti cp grau 4 para o estudo.*

Foi realizada a avaliação da rugosidade inicial de um disco de cada condição, escolhidos aleatoriamente, anterior à formação dos biofilmes, a fim de verificar a  $R_a$ . A avaliação foi realizada por meio de rugosímetro ótico (Surr-Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ $\lambda_c$  e  $\lambda_c$  0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento ( $R_a$ ), como fator de comparação das superfícies. Para cada corpo-de-prova

foram realizadas três medições em cada lado, de forma que essas cobrissem a maior área possível da superfície e em diferentes direções, para que se realizasse a média de rugosidade (ABNT NBR ISO 4288).

#### **4.4 Desenvolvimento do biofilme**

A saliva foi inoculada logo após a coleta sobre os corpos de prova de Ti cp em placas de micropoços, em um volume de 400 µl por poço, após ter sido homogeneizada em vortex. Após 1 hora, a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços, e, 1,8 ml de saliva artificial pelo meio DMM previamente preparado foi adicionado em cada micropoço. As placas foram incubadas em condições atmosféricas da anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 10% H<sub>2</sub>), sob temperatura controlada (37°C) por um período de até 168 horas (Schwarz *et al.*, 2007), e mantidas em repouso na incubadora.

Diariamente as placas foram agitadas cuidadosamente, o sobrenadante removido, o pH medido para mantê-lo constante (pH metro – Anolion PM608 plus, São Paulo, SP) e o meio DMM renovado.

A Figura 6 mostra o momento em que acontece a etapa de inoculação da saliva humana sobre os espécimes nas placas de micropoços.



*Figura 6 – Foto demonstrando a inoculação da saliva humana (microcosmos) nas placas de micropoços contendo os discos de Ti cp com diferentes tratamentos de superfície.*

#### **4.5 Análise do biofilme**

Após 12, 24, 48 e 168 horas (Leonhardt e Dahlen, 1995; Schwarz *et al.*, 2007), os discos foram removidos dos poços com pinça estéril, e as células não aderidas foram removidas gentilmente por lavagem em solução salina estéril (2 ml). Após, os discos foram colocados em tubos contendo 1 ml meio de transporte reduzido (RTF), e sonicados (Sonicador Vibra Cell – Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) com potência de 40 W, amplitude de 5%, usando 3 pulsos de 9 segundos cada para obtenção do biofilme de suspensão homogênea. Entre cada pulso foi realizado um intervalo de 5 s, sendo os tubos mantidos em gelo durante o processo.

A Figura 7 mostra o momento da remoção dos espécimes das placas de micropoços e imediatamente introduzidos em tubos contendo 1 ml de salina fisiológica em RTF.



*Figura 7 – Foto ilustrativa mostrando a remoção dos discos de *Ti cp* das placas de micropoços para os tubos contendo 1 ml RTF, para posterior sonicação.*

#### **4.6 Diluições seriadas das suspensões de biofilmes (Black, 1999)**

Após essa etapa procedeu-se às diluições seriadas das suspensões de biofilme para contagem de microrganismos totais, onde uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  foi retirada da suspensão original e diluída em séries de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-7}$  em RTF (Syed e Loesche, 1972) e imediatamente inoculadas em duplicata em Ágar sangue para contagem de microrganismos totais. As



placas foram incubadas em condições de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>), a 37°C por 96 h.

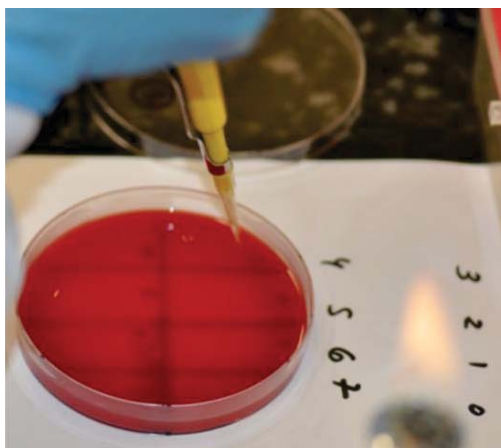
A Figura 8 mostra as placas de Ágar sangue armazenadas em estufa bacteriológica.



*Figura 8 – Foto ilustrando as placas de Ágar sangue sendo incubadas em estufa bacteriológica e jarras de anaerobiose para posterior contagem de microrganismos totais (UFC/mg).*

As unidades formadoras de colônia foram contadas com o auxílio de uma lupa em estereomicroscópio e, os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso seco) por área de disco (Bollen *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1999; Burgers *et al.*, 2010).

A Figura 9 mostra uma placa de Ágar sangue sendo inoculada com as diferentes diluições da suspensão bacteriana original inicial.



*Figura 9 – Foto ilustrando uma placa de Ágar sangue sendo inoculada por diluições da suspensão microbiana original inicial para posterior incubação e contagem de microrganismos totais (UFC/mg).*

Após a remoção da alíquota da suspensão microbiana inicial (original) para quantificação, o espécime foi removido da suspensão e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi armazenado a -80 °C para análises futuras.

#### **4.7 Preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura – MEV – JEOL JSM 6060**

O MEV JSM 6060, opera numa tensão de 0,1 a 30 Kv, podendo ser utilizado em observações convencionais de imagem em elétrons

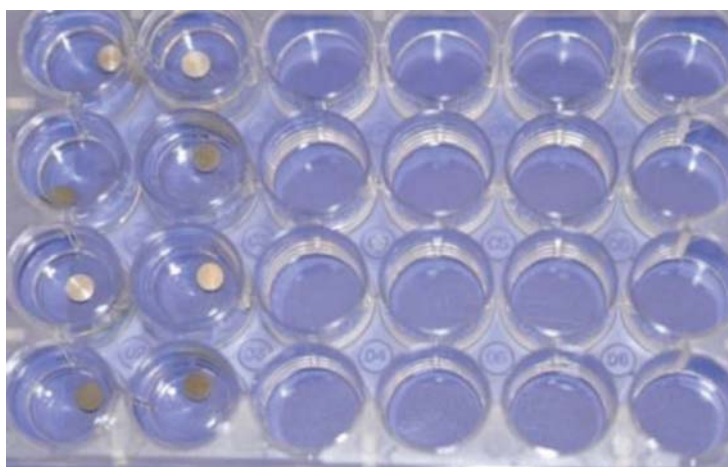
secundários (SEI). Foram utilizados para o estudo 20 corpos de prova, sendo 1 escolhido aleatoriamente em cada condição e tempo (16) e, mais 4 de cada condição antes da formação de biofilmes pela técnica do microcosmo. Os discos foram cuidadosamente colocados com pinça estéril em uma placa de 24 poços e imersos em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (20 vezes a mais do que o volume da peça) e transportados em embalagem de isopor contendo gelo ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde foram preparados para a visualização.

A Figura 10 ilustra o momento da fixação dos espécimes em solução de glutaraldeído 2,5.



*Figura 10 – Foto ilustrativa mostrando a fixação dos discos de titânio com glutaraldeído 2,5% para posterior preparo para análise por meio da MEV.*

A Figura 11 mostra os espécimes nos tempos de 12 e 24 horas com os biofilmes formados imersos em solução de glutaraldeído 2,5%.



*Figura 11 – Foto mostrando os discos de titânio com diferentes topografias com biofilmes formados pela técnica do microcosmo, imersos em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato nos tempos de 12 e 24 horas.*

#### **4.8 Estatística**

Os resultados experimentais desse estudo foram expressos pelos testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey de dois fatores, com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância pelo Software IBM SPSS Statistics versão 2.0. Para todos os testes foi considerado o valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rugosidade

Os resultados obtidos através da medição da  $R_a$  dos corpos de prova nas 4 condições experimentais, podem ser visualizados na Tabela 3.

*Tabela 3 – Distribuição da rugosidade de três pontos dos discos de Ti cp nas diferentes topografias medidas por rugosímetro óptico (Surr-Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros  $V$  200,  $H$  25 mm/ $\lambda c$  e  $\lambda c$  0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento ( $R_a$ ) dados em  $\mu m$ .*

<b>SUPERFÍCIES DE Ti cp</b>	<b>RUGOSIDADE 3 PONTOS</b>			<b>RUGOSIDADE MÉDIA (<math>R_a</math>)</b>
L	0,196	0,256	0,191	0,214
J	0,632	0,583	0,658	0,624
A	0,316	0,313	0,335	0,321
JA	0,538	0,493	0,499	0,510

## 5.2 Formação dos biofilmes

Após a análise dos biofilmes formados sobre os discos de Ti cp com diferentes topografias, pode-se verificar que houve adesão bacteriana inicial e formação de biofilme em todas as superfícies e em todos os tempos avaliados no presente experimento (Tabela 4 e Figura 12).

*Tabela 4 – Distribuição da formação de biofilme pela técnica do microcosmo nos diferentes intervalos de tempo.*

PERÍODO/INCUBAÇÃO/H	SUPERFÍCIES DE TITÂNIO COM DIFERENTES TOPOGRAFIAS			
	L	J	A	JA
12	+	+	+	+
24	+	+	+	+
48	+	+	+	+
168	+	+	+	+

Sinal positivo (+) houve crescimento microbiano.

A Figura 12 mostra o crescimento ascendente de microrganismos (contagem em UFC/mg) com maior formação de biofilme no último período experimental (168 horas) independentemente da superfície estudada (L, J, A ou JA).

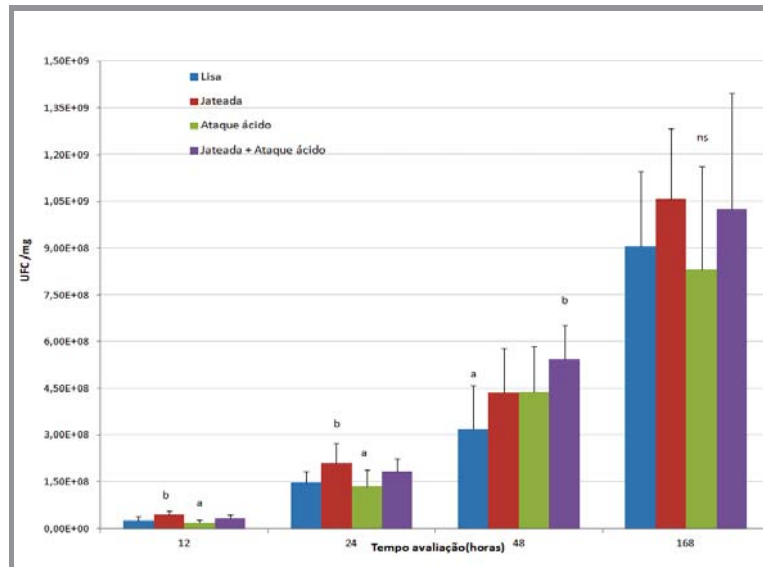


Figura 12 – Gráfico da disposição das médias e desvios padrões dos grupos pelo tempo na formação de biofilme pela técnica do microcosmo ( $\log 10^{-7}$  UFC/mg).

Após a compilação dos dados demonstrados na Figura 12, pode-se notar que nos corpos de prova de superfície com tratamento de superfície (J, A, JA) e controle (L), as médias de diluição decimal de microrganismos ( $10^{-7}$ ) (Tabela 5), demonstraram crescimento homogêneo de biofilmes possibilitando a contagem de UFCs/mg.

Na Tabela 5 são mostradas as contagens ascendentes de unidades formadoras de colônia nas diferentes topografias e intervalos de tempo, bem como os valores médios das porcentagens de crescimento entre os períodos experimentais, que variaram entre 64 a 68%.

Tabela 5 – Diluições decimais do experimento nos tempos e superfícies pela técnica do microcosmo (UFC/mg log 10<sup>-7</sup>).

SUPERFÍCIES	TEMPO/h				%
	12	24	48	168	
L	25,34	146,09	320,13	905,55	68
J	43,83	210,94	437,64	1.058,33	64
A	19,15	135,00	439,72	831,94	67
JA	32,07	183,59	544,16	1.025,00	65

% - Percentual médio de variação de crescimento de biofilmes nos intervalos entre os tempos.

São apresentadas na Tabela 6 as comparações do fator grupo: L, J, A, JA, pelo fator tempo (h): 12, 24, 48, 168 horas, respectivamente.

Tabela 6 – Valores das médias das unidades formadoras de colônia (UFC/mg) nos diferentes níveis do grupo pelo fator tempo (h) ( $p \leq 0,05\%$ ).

TEMPO	L	J	A	JA
12	7,348 AB	7,622 C	7,241 A	7,477 BC
24	8,153 AB	8,309 B	8,103 A	8,255 AB
48	8,468 A	8,619 AB	8,623 AB	8,728 B
168	8,941 NS	9,014 NS	8,878 NS	8,984 NS

NS: não significativo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si. Teste Student-Newman-Keuls com 5% de significância.

No tempo de 12 horas de crescimento de biofilmes a superfície jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (J) foi estatisticamente diferente (maior crescimento de biofilme) das superfícies controle (L) e com ataque ácido (A). E a



superfície com ataque ácido (A) foi diferente do jateamento acrescido de ataque ácido (JA) ( $p=0,03$ ).

Em 24 horas de crescimento dos biofilmes houve diferença estatística ( $p=0,02$ ) entre a superfície J em comparação à superfície A (Tabela 6 e Figura 12).

No período de 48 horas houve diferença estatística entre a superfície JA ( $5,44E+0,8$ ) em comparação à superfície controle (L) ( $3,2E+0,8$ ) como pode ser conferido na Figura 12 e na Tabela 6, havendo maior adesão e formação de biofilme na superfície JA ( $p\leq 0,01$ ).

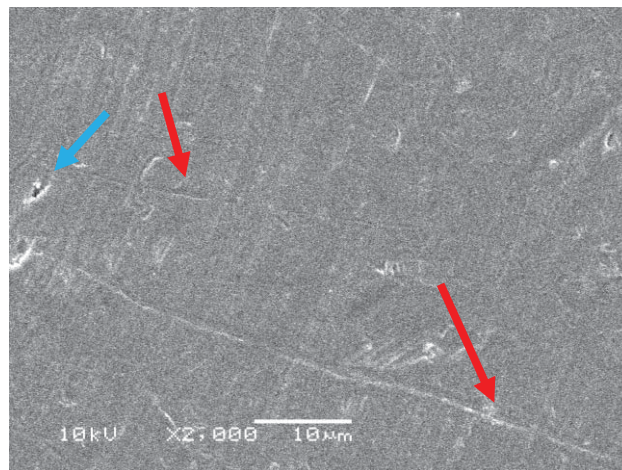
Em 7 dias de avaliação (168 horas), ou seja, no último período de tempo da presente pesquisa, os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ).

### **5.3 Análise das topografias superficiais de titânio por meio de MEV JEOL JSM 6060**

#### **5.3.1 Previamente à técnica do microcosmo**

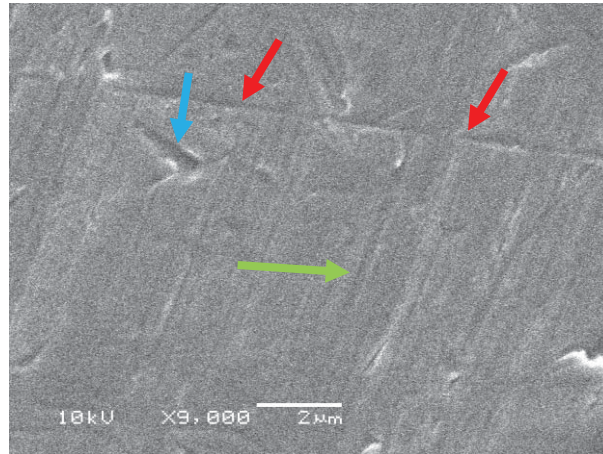
A visualização das superfícies em MEV apresentaram diferenças morfológicas entre os corpos de prova nos aumentos propostos (500X, 2000X, 5000X, 9000X e 10000X). As fotomicrografias das superfícies Ti cp L (controle) podem ser vistas nas Figuras 13 e 14. Esse tipo de superfície não recebeu nenhum tratamento adicional e, portanto, como esperado não estava perfeitamente lisa. Apresentou-se com morfologia

plana e parcialmente lisa se comparada à superfície com jateamento de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e JA. É possível notar pequenas irregularidades provavelmente providas do processo de usinagem do titânio. No entanto, não são notadas arestas de metal ou grandes irregularidades que possam descaracterizar a superfície. Observa-se também que a superfície lisa possui marcas das ferramentas de usinagem com a direção facilmente identificável dos sulcos de orientação. As ranhuras de usinagem podem ser observadas na Figura 14 no aumento de 9000X.



*Figura 13 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa em um aumento de 2000X.*

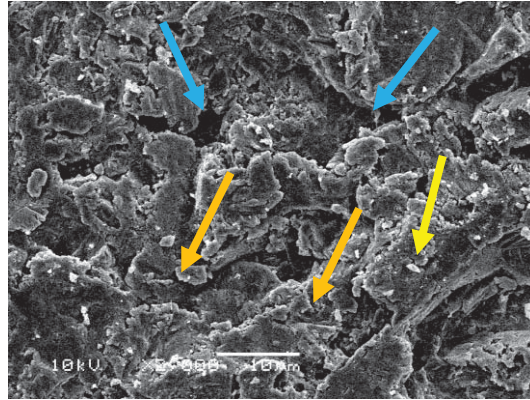
A seta em vermelho mostra ranhuras de usinagem e a seta azul pequena fenda.



*Figura 14 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa em um aumento de 9000X.*

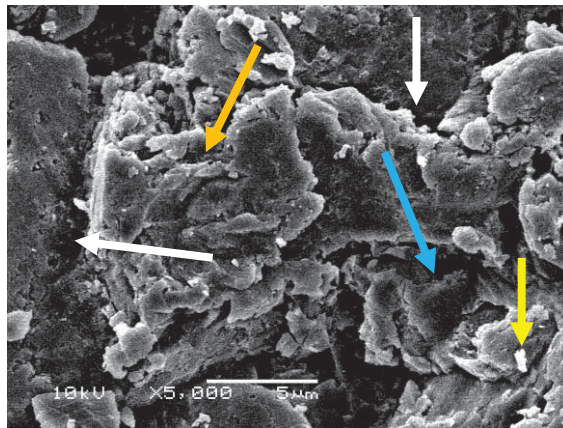
A seta em vermelho mostra ranhuras de usinagem; a seta verde representa os sulcos de orientação; azul representa fenda no Ti cp.

Nas fotomicrografias da superfície J mostraram-se com topografia acidentada, com rugosidade homogênea, ou seja, com porosidades e áreas descamativas generalizadas. Outras características podem ser visualizadas como: fendas, vales e resíduos de partículas de alumina (Figuras 15, 16 e 17) como resultado do provável processo de decapagem do metal.



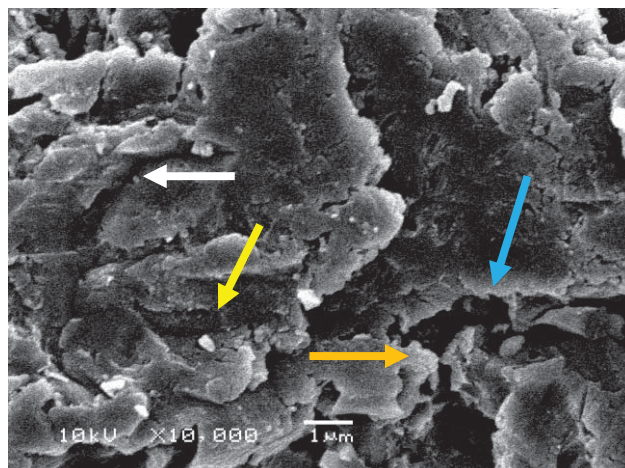
*Figura 15 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J).  
10 kv 2000X*

As setas azuis mostram fendas no Ti cp; seta amarela partículas de alumínio e setas alaranjadas representam áreas descamativas generalizadas.



*Figura 16 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J).  
10 kv 5000X.*

A seta em azul mostra uma fenda; seta alaranjada representa áreas descamativas generalizadas e a seta branca identifica os vales existentes no Ti cp e amarela identifica partículas de alumínio.

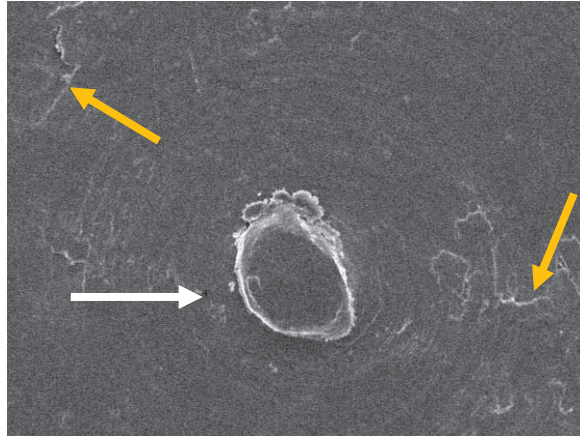


*Figura 17 – Fotomicrografia da superfície com jateamento de óxido de alumínio (J). 10 kv 10000X.*

A seta em azul mostra uma fenda; seta alaranjada representa áreas descamativas generalizadas; a seta branca identifica os vales; e em amarelo partículas de alumina existentes no Ti cp.

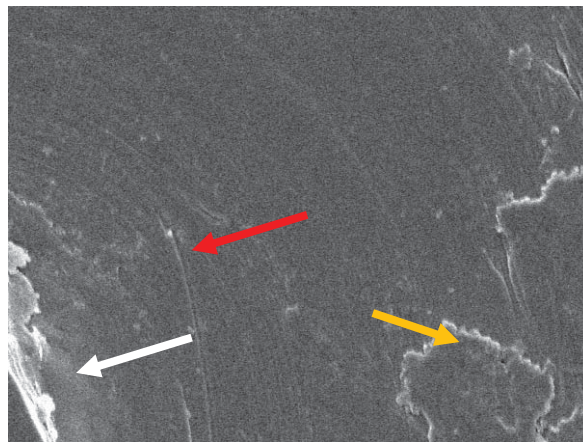
Em relação à microtopografia das superfícies nos discos com subtração por ácido nítrico (A) foram observadas pequenas áreas descamadas bem delimitadas, juntas a zona central do disco se comparados à jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Essas áreas descamadas são mais evidentes nesse tipo de superfície se comparados à superfície lisa (controle), provavelmente em função do condicionamento com ácido nítrico o qual pode propiciar o aumento da energia superficial do Ti cp. Essa característica pode apresentar algumas áreas porosas e descamativas que antes não poderiam ser bem visualizadas já que as duas superfícies L e A são semelhantes (Figuras 18, 19 e 20).





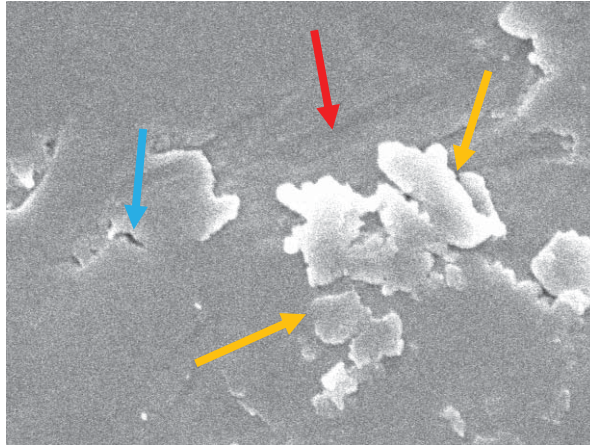
*Figura 18 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 500X.*

A seta branca identifica o centro do disco de Ti cp; setas alaranjadas identificam pequenas áreas descasmativas.



*Figura 19 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 2000X.*

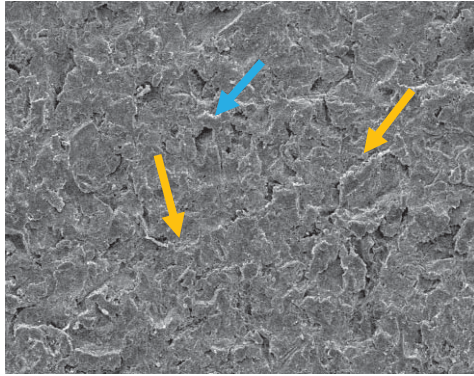
Em maior aumento a mesma região mostrada pela seta alaranjada pequenas áreas descasmativas; seta vermelha mostra sulco de orientação e a seta branca o centro do disco.



*Figura 20 – Fotomicrografia da superfície com ataque ácido nítrico (A). 10 kv 10000X.*

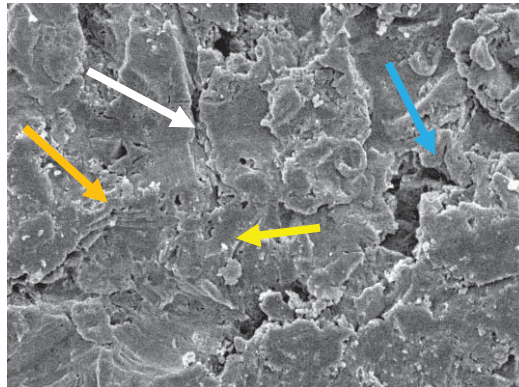
Em maior aumento a mesma região mostrada pelas setas alaranjadas pequenas áreas descamativas; seta vermelha mostra sulco de orientação; a seta azul representa uma fenda.

Nas observações das fotomicrografias da superfície JA (Figuras 21 e 22), há crateras mais homogêneas e menores com presença de fendas. Os grânulos de Ti se tornam mais evidentes devido ao condicionamento ácido sobre a superfície. Os picos são mais definidos na superfície se comparadas àquelas com jateamento com  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Além disso, são evidenciadas áreas descamativas generalizadas semelhantes à superfície do grupo Ti cp jateada (J).



*Figura 21 – Fotomicrografia mostrando a superfície deformada por jateamento com óxido de alumínio acrescida de ataque ácido nítrico. 10 kv 500X.*

Setas alaranjadas representam áreas descamativas generalizadas na superfície e seta azul mostra crateras na superfície do Ti cp.



*Figura 22 – Fotomicrografia mostrando a superfície deformada por jateamento com óxido de alumínio acrescida de ataque ácido nítrico. 10 kv 2000X.*

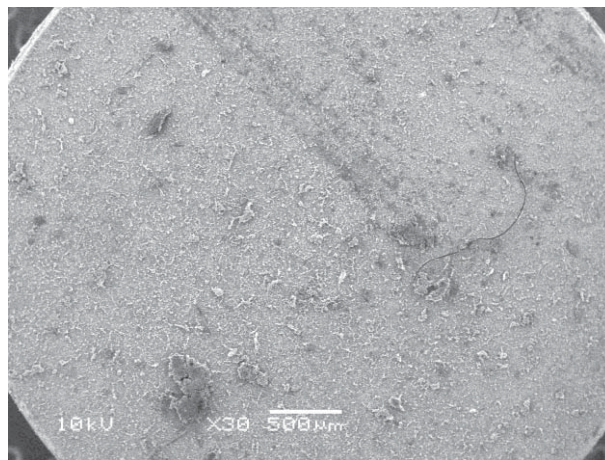
A seta em azul mostra uma fenda; seta alaranjada representa áreas descamativas generalizadas; a seta branca identifica os vales; e em amarelo, partículas de alumina existentes no Ti cp.



#### **5.4 Análise das superfícies de Ti cp grau 4 após a técnica do microcosmo por meio de microscopia eletrônica de varredura – MEV – JEOL JSM 6060**

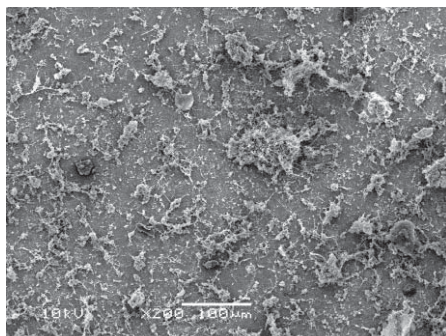
##### **5.4.1 Superfície lisa (L) (controle) após 12 horas de adesão e formação de biofilme por meio de MEV**

A Figura 23 mostra a superfície controle (L) após a técnica do microcosmo no tempo de 12 horas quando ocorreu a adesão microbiana inicial.



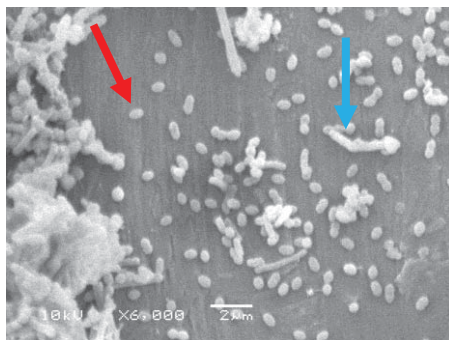
*Figura 23 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento microbiano. 10kv 30X.*

Em maior aumento na Figura 24 observa-se a formação inicial de microcolônias bacterianas.



*Figura 24 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) após 12 horas de crescimento microbiano. 10 kv 200X.*

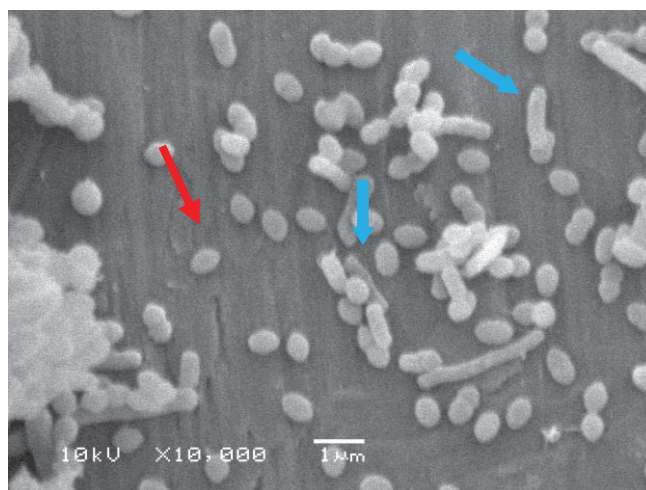
Na Figura 25 pode-se visualizar em maior aumento (6000X) a superfície lisa (L) após 12 horas de crescimento microbiano.



*Figura 25 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento micro-biano. 10 kv 6000X.*

Seta vermelha indica microrganismos cocoides; seta azul bacilos.

Na Figura 26 pode-se visualizar em maior aumento a superfície lisa (L) após 12 horas de crescimento microbiano. Ao fundo a superfície Ti cp apresenta-se com pequenas irregularidades e microrganismos aderido á sua superfície.

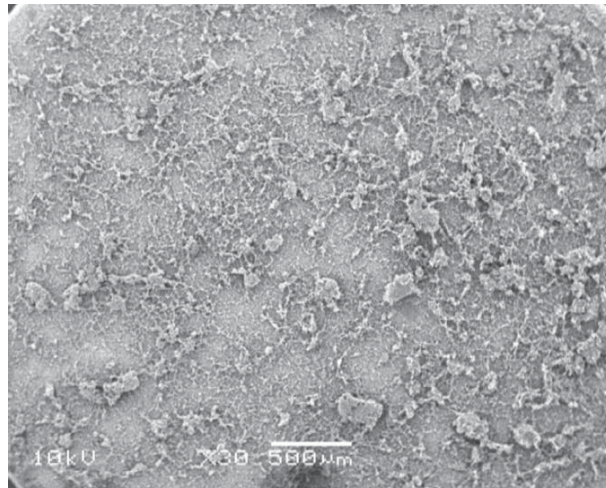


*Figura 26 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 12 horas de crescimento microbiano. 10 kv 10000X.*

Seta vermelha indica microrganismos cocoides; seta azul bacilos.

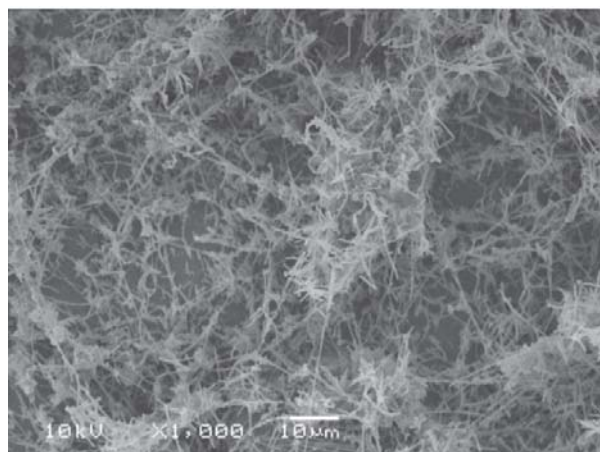
#### 5.4.2 Superfície lisa (L) (controle) após 24 horas de formação de biofilme

A Figura 27 mostra a superfície lisa (L) controle após o segundo tempo do experimento, ou seja, 24 horas de crescimento de biofilme. Pode-se notar a presença de uma camada mais espessa de microrganismos.



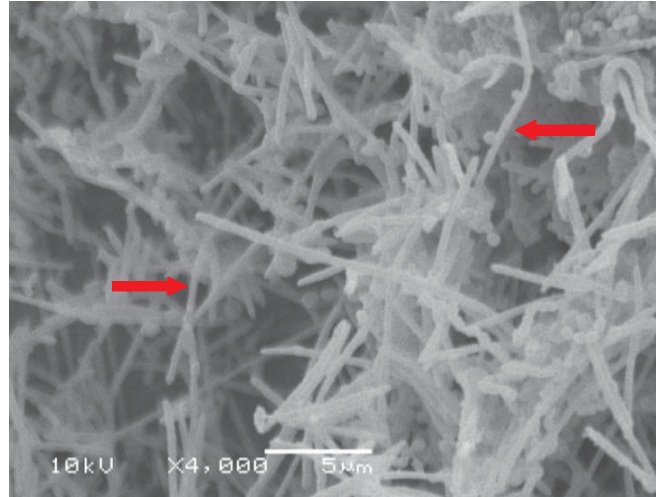
*Figura 27 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 30X.*

A Figura 28 mostra a superfície controle (L) no segundo período do experimento (24 horas). Pode-se notar a formação de biofilme onde há a presença de microfilamentos de microrganismos.



*Figura 28 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 1000X.*

A Figura 29 mostra em maior aumento (4000X) a mesma área do disco de Ti cp controle (L) no segundo período do experimento (24 horas) após a formação de biofilme, onde há a presença de microfilamentos de microrganismos.



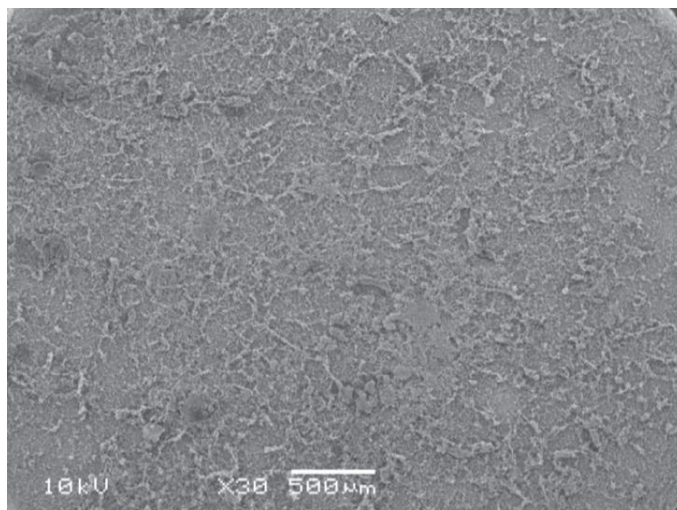
*Figura 29 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 24 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 4000X.*

Seta vermelha indica filamentos bacterianos.

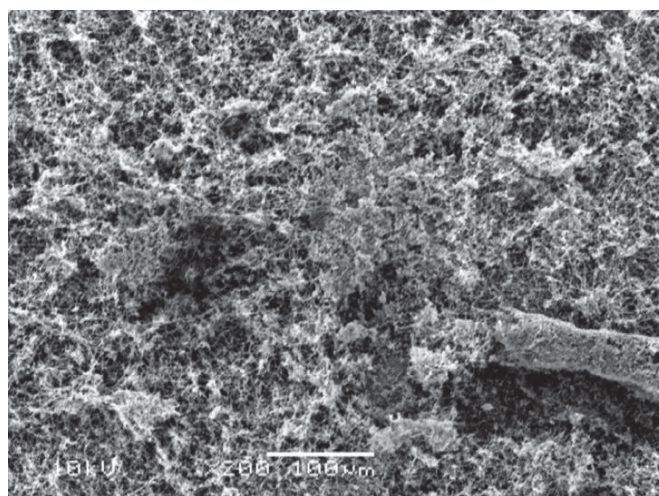
#### 5.4.3 Superfície lisa (L) (controle) após 48 horas de formação de biofilme

As Figuras 30 e 31 mostram a superfície controle (L) no período de 48 horas após a formação de biofilme, onde há a presença de uma camada mais espessa de microrganismos. Podendo ser visualizada em tamanho maior (200X) na Figura 31.



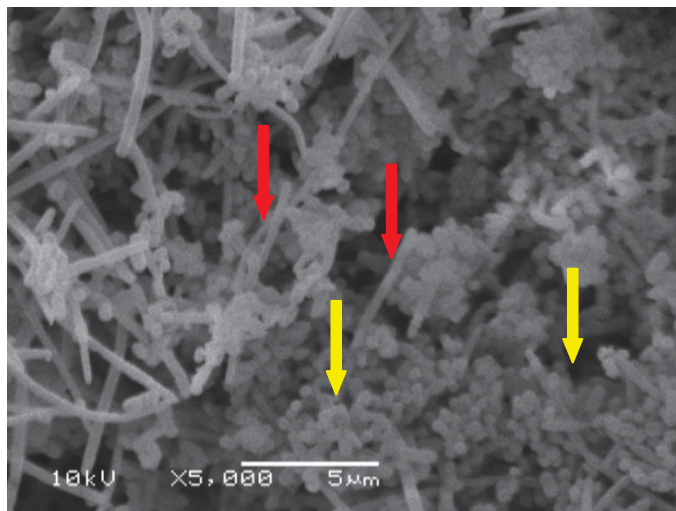


*Figura 30 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 30X.*



*Figura 31 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 200X.*

A Figura 32 mostra a superfície controle após 48 de formação de biofilme pela técnica do microcosmo onde pode-se observar uma camada mais espessa de microrganismos com formação de colônias bacterianas e microfilamentos.



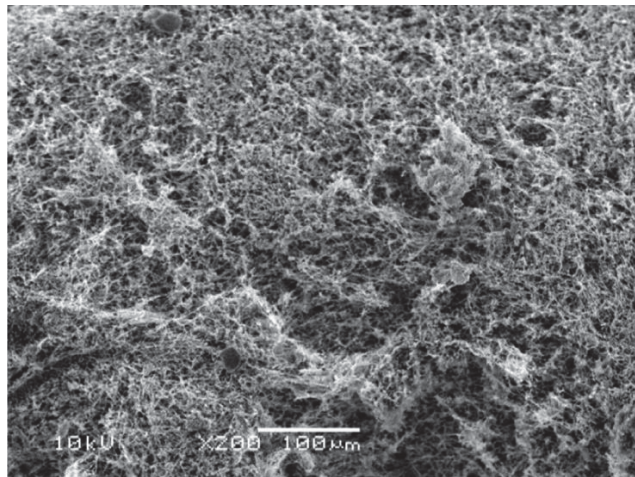
*Figura 32 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 48 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 5000X.*

Setas vermelhas indicam microfilamentos e setas amarelas colônias bacterianas.

5.4.4 Superfície lisa (L) (controle) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

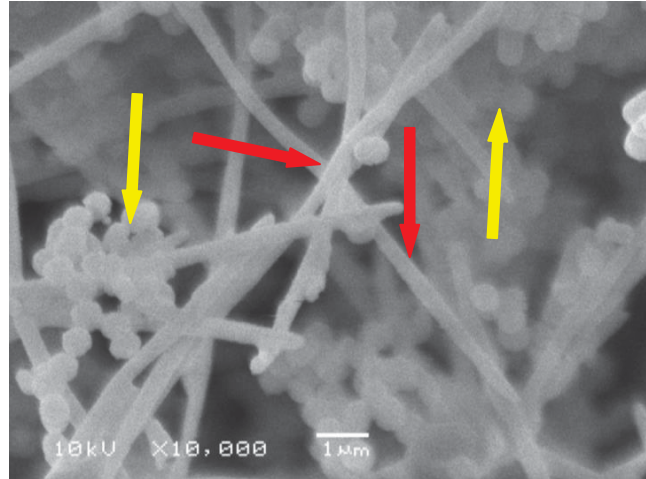


A Figura 33 mostra a superfície controle no período final do experimento (168 horas) de formação de biofilme pela técnica do microcosmo onde se pode observar que a superfície do disco não pode ser mais visualizada em função da camada extremamente espessa de microrganismos podendo ser denominada de biomassa de microrganismos.



*Figura 33 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 168 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 200X.*

A Figura 34 mostra a superfície controle (L) no último período experimental (168 horas) após a formação de biofilme, onde há a presença de microfilamentos e colônias bacterianas melhor visualizadas no tamanho de 10000X.

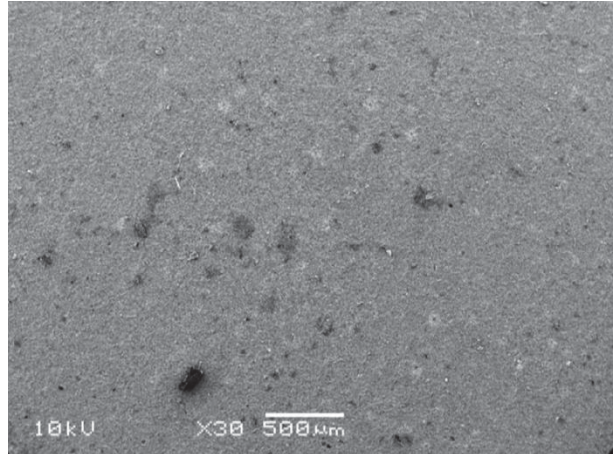


*Figura 34 – Fotomicrografia mostrando a superfície lisa (L) controle após 168 horas de crescimento de biofilme. 10 kv 10000X.*

Setas vermelhas indicam microfilamentos e setas amarelas colônias bacterianas.

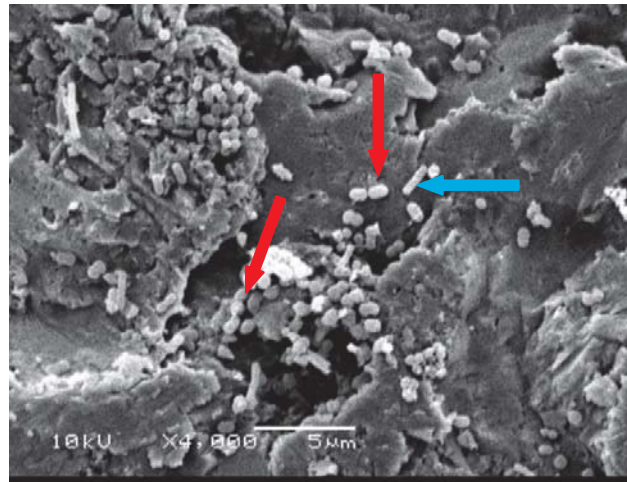
#### 5.4.5 Superfície jateada com $\text{Al}_2\text{O}_3$ (J) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 35 mostra a superfície jateada com óxido de alumínio  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J) no primeiro período experimental (12 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.



*Figura 35 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

A Figura 36 mostra em maior aumento (4000X) a superfície jateada com óxido de alumínio  $Al_2O_3$  (J) após 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. Nessa figura pode-se observar a topografia do disco de Ti cp e o aglomerado de cocoides e bacilos em sua superfície.

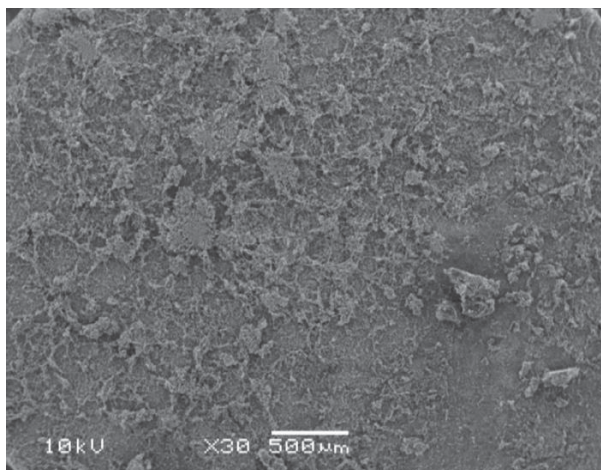


*Figura 36 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 4000X.*

Setas vermelhas identificam cocos e seta azul identificam bacilos.

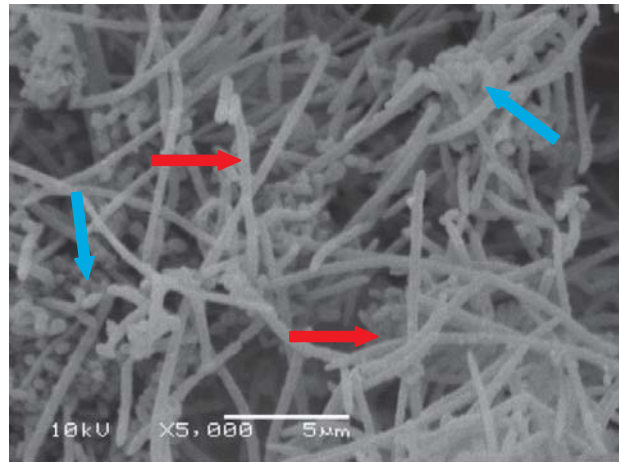
#### 5.4.6 Superfície jateada com $Al_2O_3$ (J) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 37 mostra a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) no segundo período experimental (24 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.



*Figura 37 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

As Figuras 38 e 39 mostram a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) no segundo período experimental (24 horas) em diferentes aumentos. Pode-se notar as colônias e filamentos de microrganismos na superfície do disco. Esses microrganismos podem ser visualizados em um aumento maior na Figura 39 (5000X).

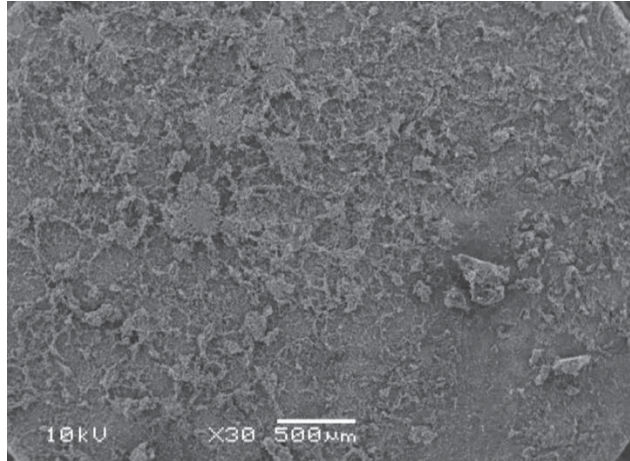


*Figura 38 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

As setas vermelhas indicam microfilamentos e setas amarelas colônias bacterianas.

#### 5.4.7 Superfície jateada com $Al_2O_3$ (J) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 40 mostra a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após o terceiro período experimental (48 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo onde encontra-se uma camada de biofilme mais espessa.



*Figura 39 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

As Figuras 40 e 41 mostram nos aumentos de 1000X e 5000X a superfície jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. Nesses aumentos é possível visualizar o emaranhado de microrganismos com a presença de filamentos bacterianos.



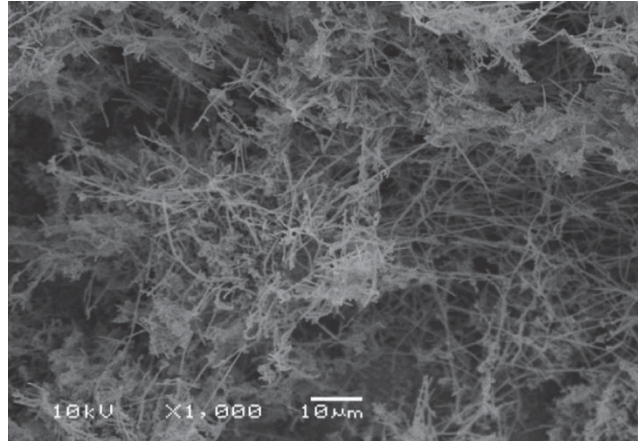


Figura 40 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.

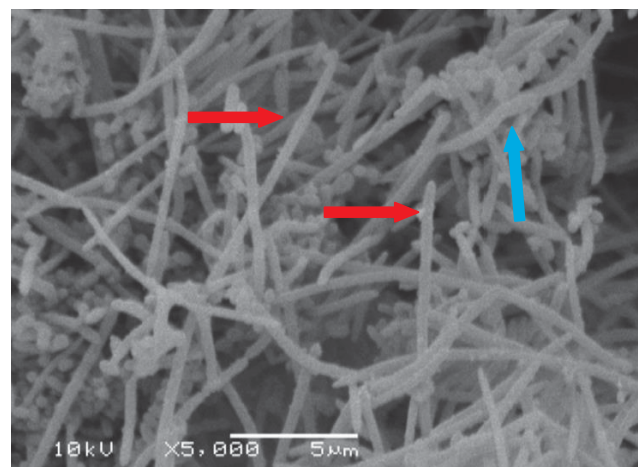


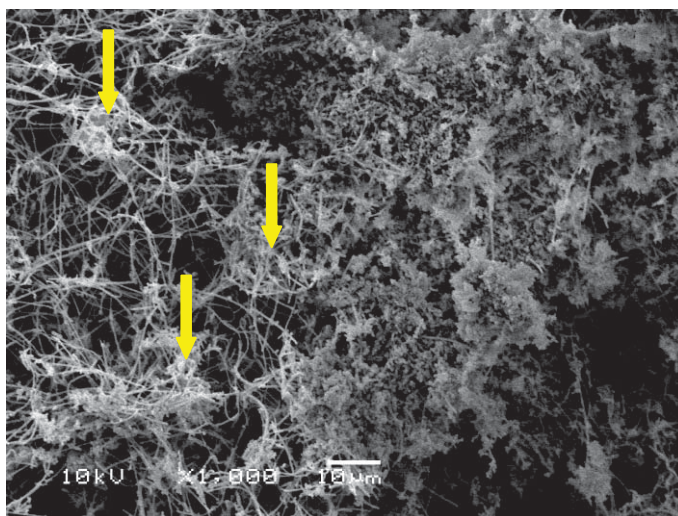
Figura 41 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.

Setas vermelhas identificam filamentos e seta azul colônia bacteriana.



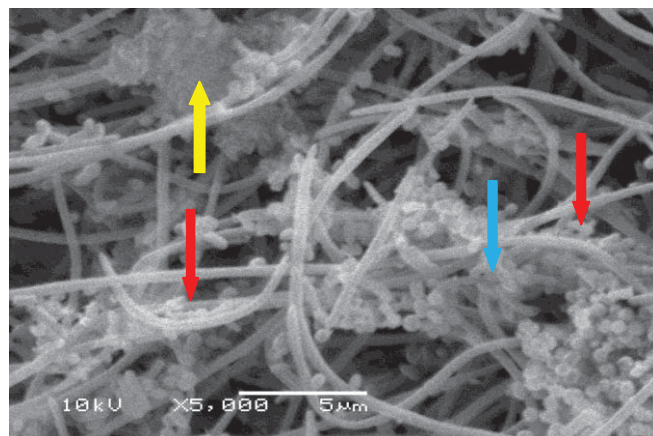
#### 5.4.8 Superfície jateada com $\text{Al}_2\text{O}_3$ (J) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

As Figuras 42 e 43 mostram nos aumentos de 1000X e 5000X a superfície jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J) após o último período experimental (168 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. Nesses aumentos é possível visualizar uma camada extremamente espessa de microrganismos, podendo ser denominada de biomassa de microrganismos e a presença de filamentos bacterianos e exopolissacarídeos.



*Figura 42 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J) após 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*

As setas amarelas identificam os exopolissacarídeos.

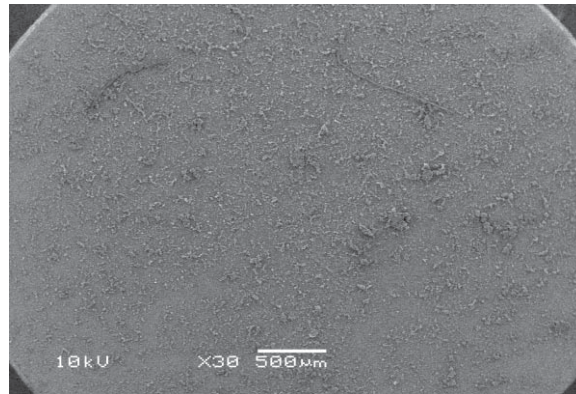


*Figura 43 – Fotomicrografia mostrando a superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) após 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

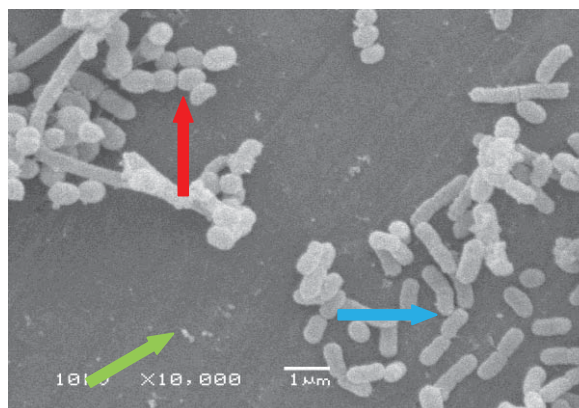
As setas vermelhas identificam filamentos, a seta azul colônias bacterianas e amarela exopolissacarídeos.

#### 5.4.9 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 44 mostra a superfície com ataque ácido nítrico (A) no primeiro período experimental (12 horas) de formação de biofilme pela técnica do microcosmo, onde encontra-se uma camada de biofilme que representa a aderência microbiana inicial no disco de Ti cp. Na Figura 45 em maior aumento (10000X) pode-se visualizar microrganismos cocoides e bastonetes.



*Figura 44 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) nas primeiras 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

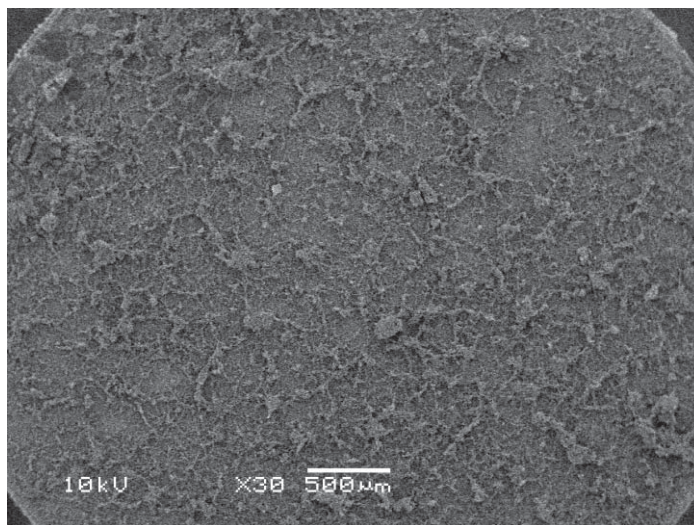


*Figura 45 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) nas primeiras 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 10000X.*

A seta vermelha indica microrganismos cocoides, seta azul bastonetes e abaixo a seta verde representa a superfície de Ti cp A.

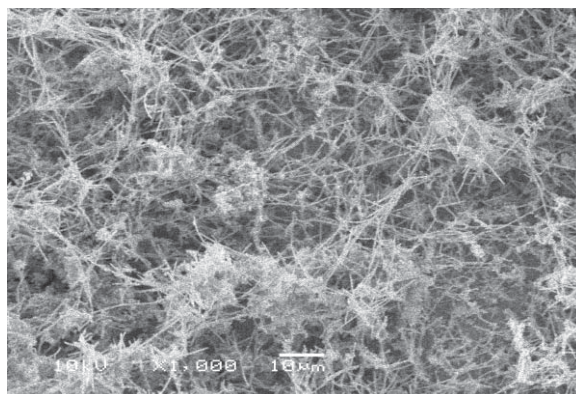
5.4.10 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 46 mostra a superfície com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no segundo período experimental (24 horas) de formação de biofilme pela técnica do microcosmo, onde encontra-se uma camada de biofilme mais espessa de biofilme no disco de Ti cp. Na Figura 48 em maior aumento (10000X) pode-se visualizar microrganismos cocoides e bastonetes.

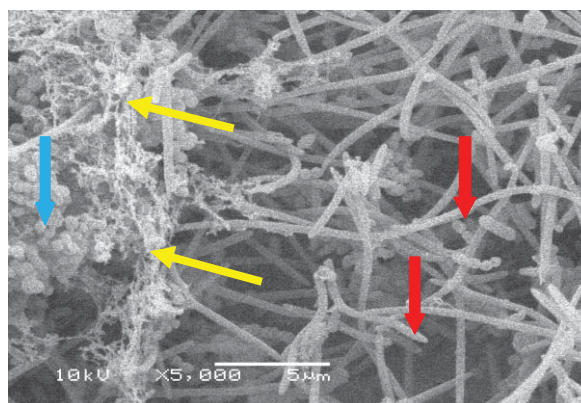


*Figura 46 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*





*Figura 47 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*

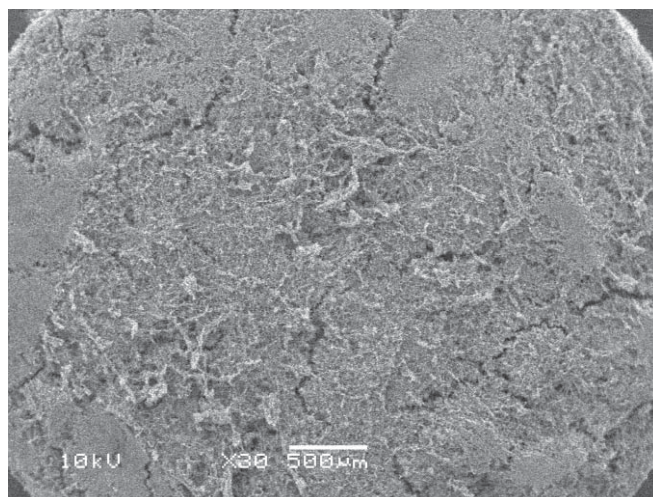


*Figura 48 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco de Ti cp com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

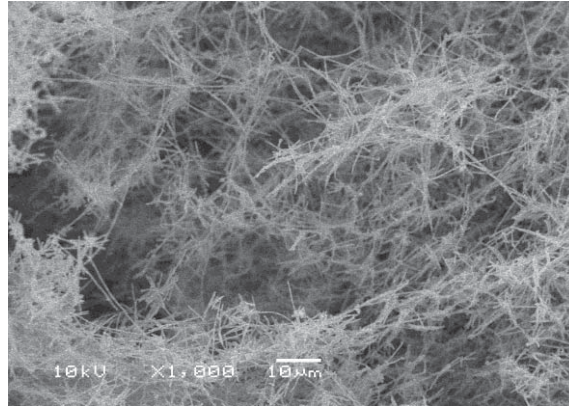
As setas vermelhas indicam filamentos, seta azul colônias bacterianas e as setas amarelas representam exopolissacarídeos a superfície de Ti cp A.

5.4.11 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

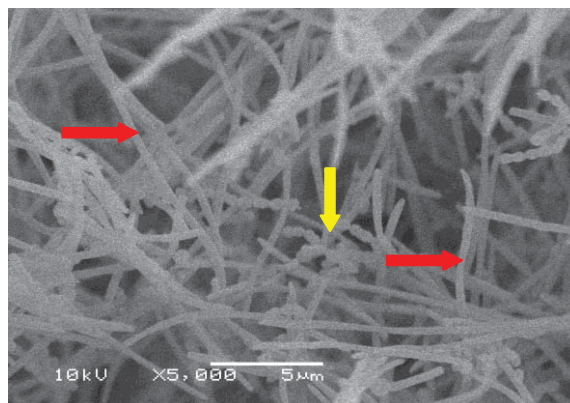
A Figura 49 mostra a superfície com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no terceiro período experimental (48 horas) de formação de biofilme pela técnica do microcosmo, onde encontra-se uma camada de biofilme mais espessa no disco de Ti cp. Nas Figuras 50 (1000X) e 51 em maior aumento (5000X) pode-se visualizar microfilamentos e colônias bacterianas.



*Figura 49 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*



*Figura 50 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*

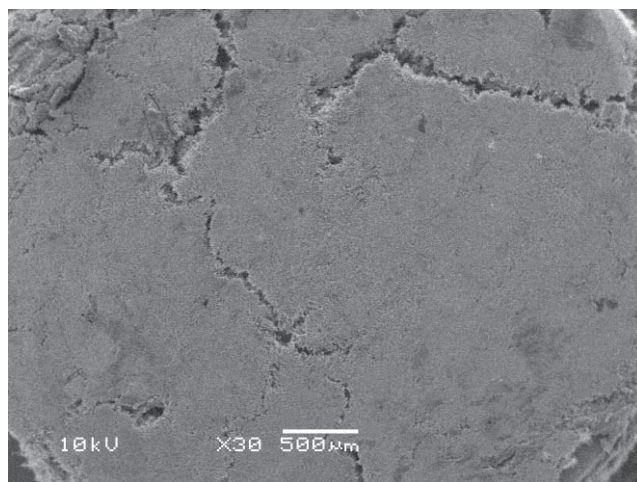


*Figura 51 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

Setas vermelhas identificam microfilamentos bacterianos e a seta amarela revela colônia bacteriana.

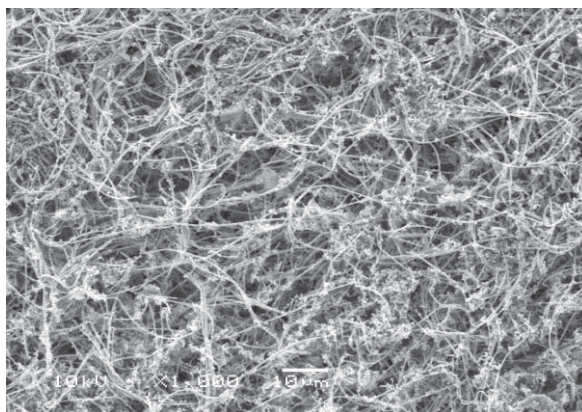
#### 5.4.12 Superfície com ataque ácido nítrico (A) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 52 mostra a superfície com tratamento de ataque ácido nítrico (A) no último período experimental (168 horas) de formação de biofilme pela técnica do microcosmo, onde encontra-se uma camada extremamente espessa de biofilmes no disco de Ti cp, podendo ser denominada de biomassa de microrganismos. Nas Figuras 53 (1000X) e 54 em maior aumento (4000X) pode-se visualizar microfilamentos e colônias bacterianas.

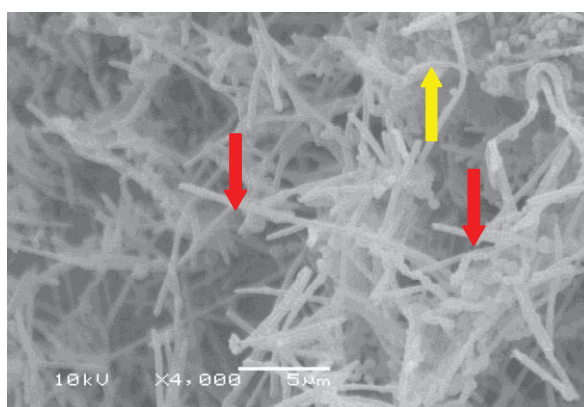


*Figura 52 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*





*Figura 53 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*

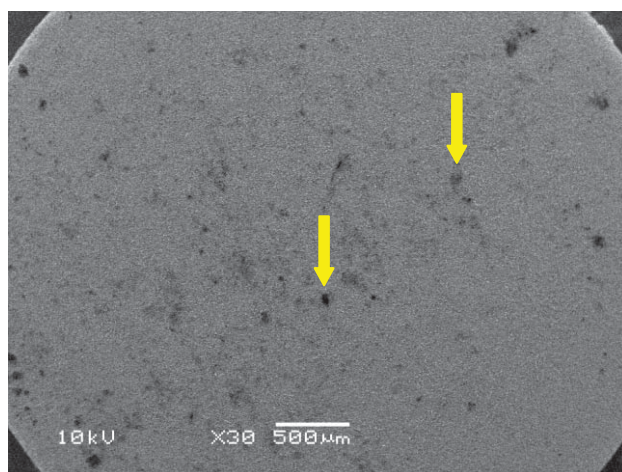


*Figura 54 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco com ataque ácido nítrico (A) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 4000X.*

Setas vermelhas identificam microfíamentos e seta amarela identifica colônias bacterianas.

5.4.13 Superfície jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) após 12 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 55 mostra a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no primeiro período experimental (12 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.

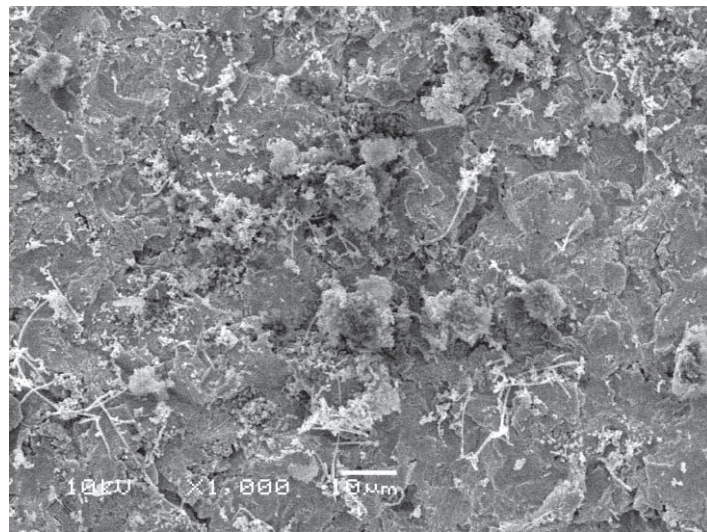


*Figura 55 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

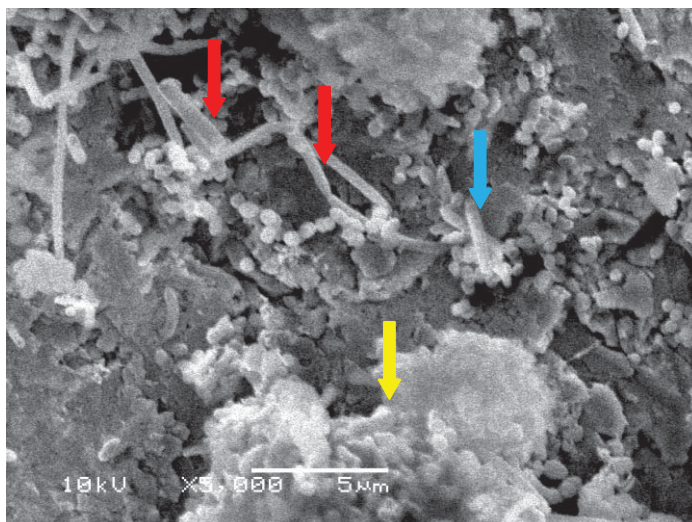
Setas alaranjadas revelam manchas no Ti cp de possíveis agentes contaminantes.

As Figuras 56 e 57 mostram a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no primeiro período experimental (12 horas) de formação de biofilme pela técnica do

microcosmo onde encontra-se uma camada de biofilme que representa a aderência microbiana inicial no disco de Ti cp. Na figura 57, em maior aumento (5000X) pode-se visualizar microrganismos cocoides e bastonetes.



*Figura 56 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*



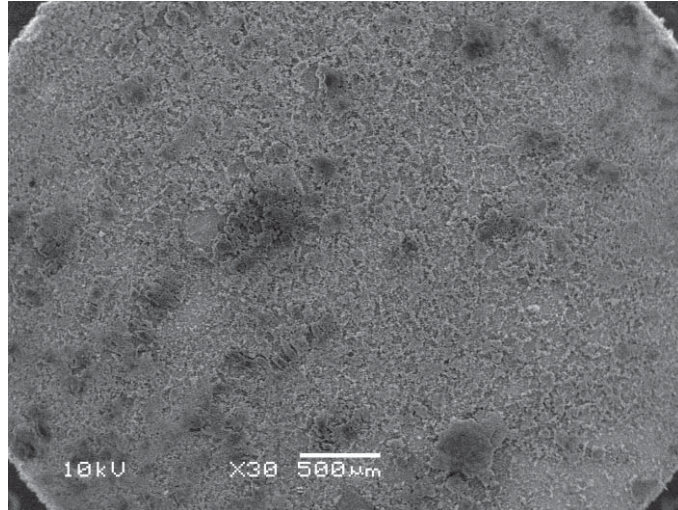
*Figura 57 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 12 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

Setas vermelhas identificam microfilamentos, seta azul representa bacilos e seta amarela identifica colônia bacteriana.

5.4.14 Superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 24 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

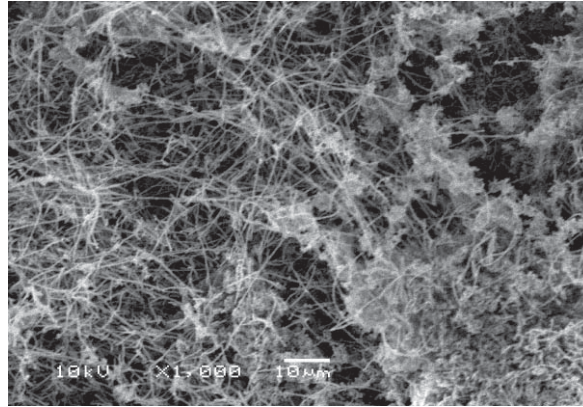
A Figura 58 mostra a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no segundo período experimental (24 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.



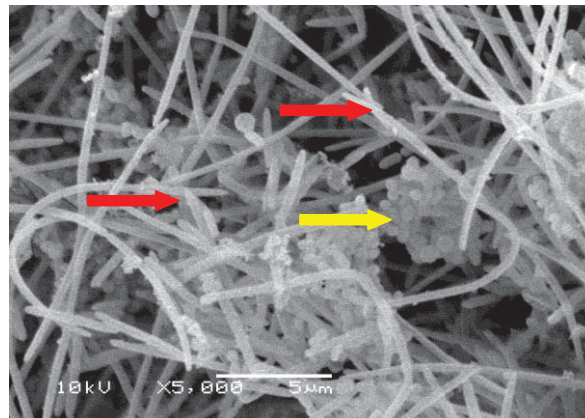


*Figura 58 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 30X.*

As Figuras 59 e 60 mostram a superfície do disco jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no segundo período experimental (24 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo onde encontra-se uma camada de biofilme no disco de Ti cp. Nas Figuras 59 (1000X) e 60 em maior aumento (4000X) pode-se visualizar microfilamentos e colônias bacterianas.



*Figura 59 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*

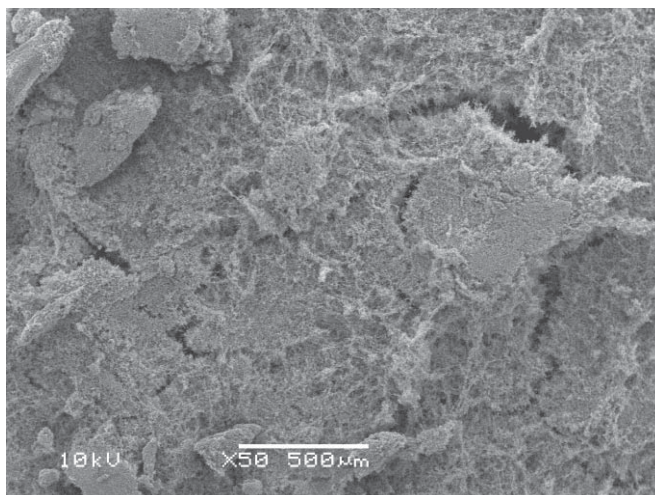


*Figura 60 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 24 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

Setas vermelhas identificam microfilamentos e seta amarela identifica colônia bacteriana.

5.4.15 Superfície jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 48 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

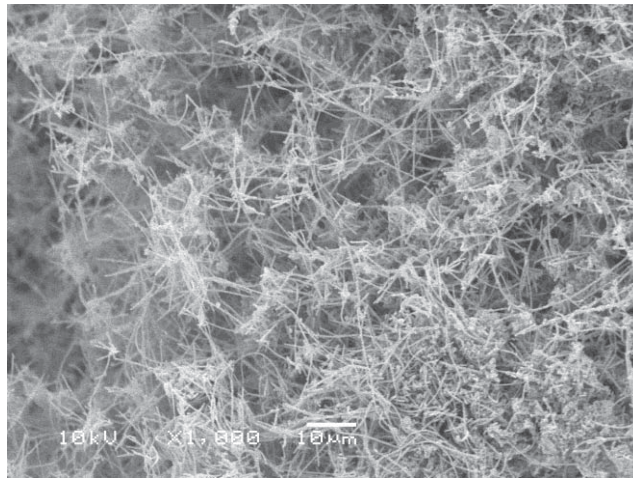
A Figura 61 mostra a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no terceiro período experimental (48 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.



*Figura 61 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 50X.*

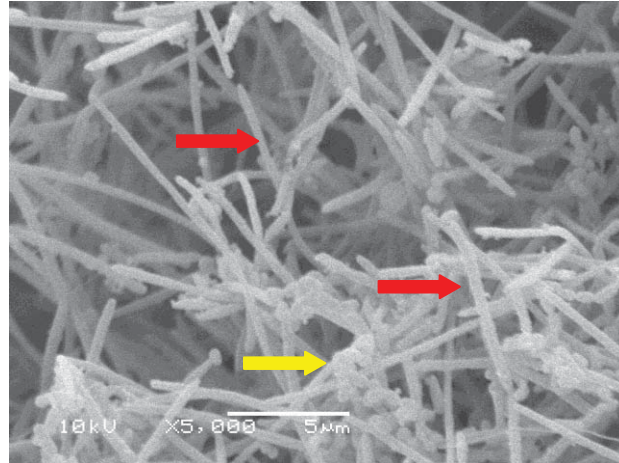
As Figuras 62 e 63 mostram a superfície do disco jateada com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescida de ataque ácido nítrico (JA) no terceiro período experimental (48 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do

microcosmo onde se encontra uma camada mais densa de biofilme no disco de Ti cp. A Figura 63 em maior aumento (4000X) pode-se visualizar microfíamentos e colônias bacterianas.



*Figura 62 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.*



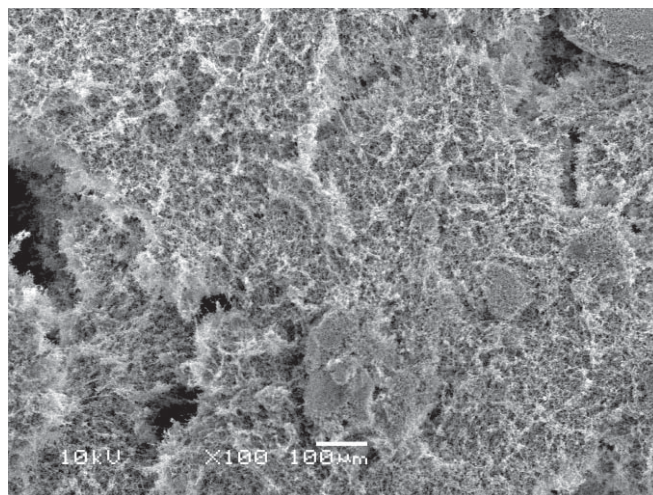


*Figura 63 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 48 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.*

Setas vermelhas identificam microfilamentos e seta amarela identifica colônia bacteriana.

5.4.16 Superfície jateada com  $Al_2O_3$  (J) acrescida de ataque ácido nítrico (A) – (JA) após 168 horas de formação de biofilme pela técnica do microcosmo

A Figura 64 mostra a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no quarto e último período experimental (168 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo.



*Figura 64 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 100X.*

As Figuras 65 e 66 mostram a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no quarto e último período experimental (168 horas) de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo onde se encontra uma camada mais densa de biofilme no disco de Ti cp podendo ser denominada de biomassa de microrganismos. A Figura 66 em maior aumento (5000X) pode-se visualizar microfilamentos e colônias bacterianas.

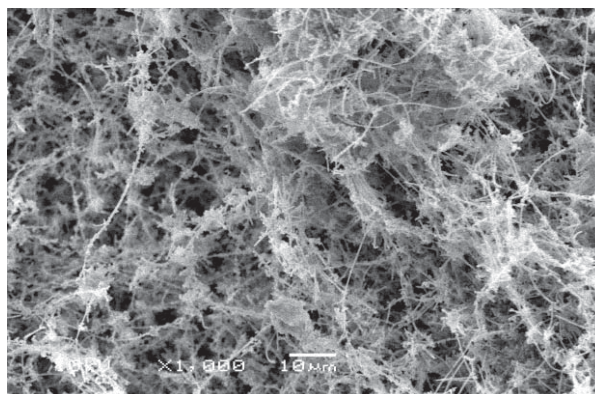


Figura 65 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 1000X.

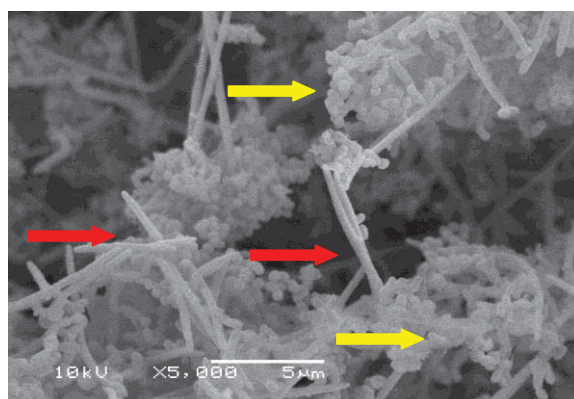


Figura 66 – Fotomicrografia mostrando a superfície do disco jateada com  $Al_2O_3$  acrescido de ataque ácido nítrico (JA) no período de 168 horas de crescimento de biofilme pela técnica do microcosmo. 10 kv 5000X.

Setas vermelhas identificam microfilamentos e setas amarelas identificam colônias bacterianas.

## 5.5 Discussão

Durante as últimas décadas a reabilitação com o uso de implantes odontológicos fabricados com Ti cp teve um aumento considerável para o tratamento de dentes perdidos. Foi comprovado cientificamente que este biomaterial possui inúmeras características benéficas inclusive a biocompatibilidade com os tecidos humanos (Williams, 1981; Hansson *et al.*, 1983; Ravnholt, 1988; Bunetel *et al.*, 2001; Mabboux *et al.*, 2004; Píer-Francesco *et al.*, 2006; Elias *et al.*, 2008; Elter *et al.*, 2008; Shibli *et al.*, 2008; Elias e Mattos, 2009; Pye *et al.*, 2009; Subramani *et al.*, 2009).

Está muito bem documentado pela literatura científica que uma das problemáticas relacionadas à presença dos materiais restauradores da função oral como os implantes odontológicos, é a formação do biofilme bacteriano sobre a superfície, tornando o aparecimento de possíveis complicações relacionadas à doença peri-implantite (Quirynen e Listgarten, 1990; Yoshinari *et al.*, 2001; Píer-Francesco *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009; Grössner-Schreiber *et al.*, 2009; Subramani *et al.*, 2009; Busscher *et al.*, 2010; Soukos e Goodson, 2011). Além disso, o mesmo biofilme pode ser responsável também pelo aparecimento da doença cárie e periodontal (Løe *et al.*, 1965; Van Houte, 1980; Gibbons, 1989; Leite, 2009), tornando necessário o conhecimento sobre o processo de adesão e formação do biofilme sobre as superfícies.

Muitos estudos utilizando diferentes técnicas microbiológicas já tentaram explorar a adesão de espécies microbianas em implantes ou discos de Ti cp no intuito de conhecer a relação entre o biofilme

bacteriano e as superfícies dos implantes (Chang e Merritt, 1994; Persson *et al.*, 1996; Yoshinari *et al.*, 2000; Jardim Jr. *et al.*, 2006; Pier-Francesco *et al.*, 2006; Bjerkan *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2009; Mioralli, 2009; Bürgers *et al.*, 2010; Romeiro *et al.*, 2010; Fröjd *et al.*, 2011).

A técnica do microcosmo ou “boca artificial” idealizada por Wong e Sissons (2001) já foi explorada para testes com substâncias antimicrobianas e na área da Cariologia (Sissons *et al.*, 1991; Sissons, 1997; Filoche *et al.*, 2007; Filoche *et al.*, 2008; Leite, 2009; Van De Sande *et al.*, 2011; Zaura *et al.*, 2011), sendo que os estudos para verificação da adesão e formação de biofilmes em titânio relacionado à doença peri-implantite são escassos (Stefenon, 2012).

Para a execução desse experimento, a utilização dessa técnica microbiológica deveu-se a sua maior capacidade de mimetizar a realidade da cavidade bucal no que tange ao comportamento multiespécies na saliva humana, principalmente de pacientes portadores de doenças periodontais em estudos na área de Implantodontia.

Uma vantagem da utilização do microcosmo foi à viabilidade do estudo de biofilmes em grande escala ao se utilizar a saliva artificial (meio DMM) com condições adequadas de nutrição para os biofilmes. No presente trabalho foram utilizados 160 discos de Ti cp de grau 4, com diferentes topografias de superfície, períodos de crescimento de biofilmes e condições de multiplicação em “boca artificial”. Dessa forma, pode-se observar a adesão, concentração e biomassa de microrganismos em diferentes tempos e em diferentes topografias de Ti cp. A opção pela coleta de saliva de pacientes periodontais originou-se de estudos que demonstraram que a microbiota presente na peri-

implantite é semelhante a da doença periodontal, bem como, sua patogênese (Heydenrijk *et al.*, 2002).

Essa correlação entre acúmulo de biofilme, presença de periodontopatógenos ao nível da perda óssea e ao redor do tecido peri-implantar, já foi estudada (Rams e Link, 1983; Rams *et al.*, 1984; Mombelli *et al.*, 1987; Gatewood *et al.*, 1993; Quirynen *et al.*, 2002; Heydenrijk *et al.*, 2002; Fürst *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007).

Contudo, a peri-implantite não ocorre sem prévia aderência microbiana e subsequente colonização. A adesão depende do tipo de microrganismo, das propriedades físico-químicas da superfície do implante e da presença de fluidos bucais interpostos entre os microrganismos e as superfícies (Curtiss, 1986; Gibbons, 1989; Quirynen e Bollen, 1995; Nassar *et al.*, 1995; Busscher e Van der Mei, 1997; Jorge, 2007), bem como, dos procedimentos de controle pela higiene bucal (Newman, 1974; Quirynen *et al.*, 1990).

Já foi relatado que a formação inicial do biofilme pode ser influenciada por diferentes superfícies de implantes. A adesão de microrganismos a implantes dentários parece ser diretamente proporcional à rugosidade de sua superfície (Newman, 1974; Wise e Dykema, 1975; Rimondini, 1997; Esposito *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2000; Auschill *et al.*, 2001; Quirynen *et al.*, 2002; Auschill *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2003).

Pesquisas comprovaram a relação direta da rugosidade de superfície com a eficiência da osseointegração (Klokkevold *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1997; Cooper, 2000; Sykaras *et al.*, 2000; Fröjd *et al.*, 2011). No entanto, é sensato concluir pelo estudo da literatura vigente que quanto mais rugosa uma superfície, maior será o acúmulo de biofilme

(Rimondini *et al.*, 1997; Kawai *et al.*, 2000) e maiores serão as chances de insucesso. É inegável pensar que exista uma inter-relação direta entre esses fatores.

Essa temática foi estudada por Mioralli (2009) e Teughels *et al.* (2006). Segundo esses últimos autores, superfícies rugosas acumulam e retêm maior quantidade de placa e desenvolvem uma placa mais madura, caracterizada pelo aumento de colônias, organismos móveis e espiroquetas. Já Hallab *et al.* (2001), ao testar componentes de energia de superfície de vários materiais com o objetivo de verificar a força de adesão celular, demonstraram que a energia livre de superfície seria uma característica mais importante do que a rugosidade da superfície para induzir a adesão e proliferação celular.

No presente estudo, os resultados médios das medições de rugosidade das superfícies conforme os tratamentos foram: lisa (L)  $R_a=0,214 \mu\text{m}$ ; jateamento com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J)  $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ; ataque ácido nítrico (A)  $R_a=0,321 \mu\text{m}$  e jateamento acrescido de ataque ácido nítrico (JA)  $R_a=0,510 \mu\text{m}$ .

Em relação a esses resultados provindos dos valores de rugosidade média dos discos (Tabela 3) e crescimento microbiano (Tabela 5), pode-se afirmar que o crescimento manteve-se constante em todos os tempos da pesquisa (12, 24, 48 e 168 horas). No entanto, foi encontrado no primeiro período experimental (12 horas) que as superfícies lisa (L) e ataque ácido nítrico (A) as quais possuem os valores de rugosidade menor ( $R_a=0,214 \mu\text{m}$ ;  $R_a=0,321 \mu\text{m}$ ) tiveram também os valores médios de UFCs menores (7,348 e 7,241) sendo estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) em relação à superfície com jateamento (J) com maiores valores de rugosidade ( $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ) e



contagem de UFCs (7,622). Se forem comparados os dados referentes ao mesmo período experimental das superfícies L e A aos outros dois grupos formados pelo Jateamento com  $Al_2O_3$  (J) e jateamento acrescido de ataque ácido nítrico (JA) os valores de rugosidade média ( $R_a$ ) e crescimento microbiano foram diferentes e remetem ao entendimento que no primeiro período experimental onde ocorre a adesão inicial e o início da formação do biofilme, as superfícies com menor rugosidade aderem menor quantidade de bactérias. Resultados parecidos foram encontrados no trabalho de Pier-Francesco *et al.* (2006) sobre a adesão bacteriana *in vitro* usando *Porphyromonas gingivalis* na superfície de discos de Ti cp e a relação entre rugosidade de superfície do material e energia livre de superfície. Os autores desenvolveram um estudo sobre essa temática objetivando modificar as propriedades do titânio e identificar o efeito das modificações sobre a adesão bacteriana. A superfície do material com  $R_a=0,15 \mu m$ , categorizada como muito lisa, teve uma significativa redução da adesão bacteriana. Esta redução não ocorreu com as superfícies rugosa ( $R_a=0,22 \mu m$ ) ou muito rugosa ( $R_a=0,45 \mu m$ ). Os autores concluíram que a adesão de *Porphyromonas gingivalis* ao titânio foi inibida para superfície com níveis de rugosidade abaixo daquelas geralmente encontrados para implantes ( $R_a=0,35 \mu m$ ). As considerações sobre esses achados podem ser benéficas na produção de implantes de titânio a fim de reduzir a colonização bacteriana.

Com relação ao segundo período experimental (24 horas) foi encontrado que o tratamento ataque ácido nítrico (A) a qual possui valor de rugosidade de  $R_a=0,321 \mu m$  teve o valor médio de UFCs menor do grupo (8,103) sendo estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) em relação à superfície com jateamento (J) com maiores valores de rugosidade



( $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ) e contagem de UFCs (8,309) (Tabela 6). Esse resultado confirma que no primeiro e segundo período experimental onde ocorre a adesão inicial e o início da formação do biofilme, as superfícies com menor rugosidade aderem menor quantidade de bactérias como foi o caso da superfície com tratamento de ataque ácido nítrico (A).

Esses achados são relevantes, uma vez que os resultados do experimento foram semelhantes aos estudos de Bürgers *et al.* (2010) que utilizaram discos de Pt e jateados seguido de Prom, para verificação da adesão bacteriana *in vitro* utilizando após a incubação a suspensão de *Streptococcus sanguinis*. Os achados desse estudo confirmaram que a adesão bacteriana inicial às superfícies de titânio com topografias diferentes é primariamente influenciada pela rugosidade de superfície ( $R_a$ ).

Os resultados referentes ao terceiro período experimental (48 horas) revelaram diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ) entre a superfície JA com rugosidade de  $R_a=0,510 \mu\text{m}$  e média de UFCs/mg 8,728 e a superfície lisa (L)  $R_a=0,214$  e média de UFCs/mg de 8,468 (Tabela 6), onde uma menor quantidade de biofilme formou-se na superfície lisa em relação à uma superfície totalmente rugosa como foi o caso da superfície JA.

Já no período final do experimento (168 horas) as médias de contagens de UFCs/mg não mostraram diferença estatística ( $p<0,05$ ) nas 4 superfícies estudadas (L, J, A, JA) com valores médios de UFCs de 8,941; 9,014; 8,878; 8,984 respectivamente (Tabela 6). Outro ponto importante da pesquisa foi os achados relativos à superfície controle ( $R_a=0,21 \mu\text{m}$ ) apresentou rugosidade três vezes inferior em relação à superfície jateada ( $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ) e, mesmo sendo considerada uma

superfície lisa, possibilitou uma concentração de biofilme estatisticamente igual aos outros tratamentos (J, A, JA) no último período experimental (168 horas) de crescimento microbiano.

Esses resultados estão em concordância com Pongnarisorn *et al.* (2007), os quais relataram que o acúmulo e quantidade de biofilme ocorrem independentemente do tipo de superfície do implante. Esses resultados referentes ao último período de tempo, ou seja, em 7 dias de acompanhamento, revelaram que os biofilmes cresceram a níveis muito superiores em relação ao período inicial. Onde no período inicial e final do experimento (12 e 168 horas) as contagens de UFCs para a superfície L (controle) eram de 25,34 (3E+07) para 905,55 (9E+08), representando um crescimento médio entre períodos de tempo de 68%. Na superfície J os números iniciais e finais foram de 43,83 (4E+07) para 1058,33 (1,06E+09), o que representou um crescimento médio entre os períodos de tempo de 64%. Para a superfície A o período inicial e final representaram um crescimento médio de 19,15 (2E+07) para 831,94 (8,3E+08) variando entre cada período de tempo um percentual de 67%. Já no tratamento JA houve uma variação entre o período inicial e final de 32,07 (3E+07) para 1025,00 (1,03E+09) variando entre cada período experimental um percentual de 65%, como podem ser verificados na Tabela 5.

Esses resultados mostraram que independente do grau de rugosidade dos diferentes tratamentos, não influenciou que o biofilme crescesse a níveis de comunidade clímax, onde uma camada extremamente espessa se concentra no disco e que pode ser denominada de biomassa de microrganismos.

Jardim Jr. *et al.* (2006) avaliaram as características de topografia superficial e contaminação de implantes desenvolvidos para pesquisas utilizando implantes com tratamento de duplo ataque ácido e analisados através de interferometria a laser e culturas por 3 e 14 dias. Os resultados não apresentaram microrganismos na superfície independente da rugosidade superficial.

Relatos diferentes foram evidenciados por Pongnarisorn *et al.* (2007) que avaliaram diferentes tipos de tratamento de superfície na porção transmucosa de implantes usinados, condicionados com ataque ácido e anodizados. Os autores sugeriram que o desenvolvimento da inflamação associada aos implantes independe do tipo de superfície ou rugosidade, mas sim a presença de placa bacteriana. Portanto esses achados reforçam os encontrados no presente experimento onde foi verificada relação entre acúmulo de biofilme e a rugosidade de superfície. Por exemplo, o disco J obteve valor de  $R_a=0,62 \mu\text{m}$ , seguido de JA  $R_a=0,51 \mu\text{m}$  e A  $R_a=0,32 \mu\text{m}$  respectivamente. Ocorrendo acúmulo de biofilme em ordem crescente de UFCs/mg após as 48 horas do estudo em todas as superfícies tanto lisas quanto rugosas, também evidentes pelo teste estatístico ANOVA e comprovados pelas fotomicrografias oriundas da avaliação em MEV (Figuras 30, 31, 32, 40, 41, 42, 50, 51, 52, 62, 63, 64). O que também ocorreu com a superfície controle que possui  $R_a=0,21 \mu\text{m}$ , ou seja, uma rugosidade 3 vezes menor em proporção que a superfície J, mesmo sendo uma superfície lisa, ocorreu concentração estatisticamente iguais aos outros tratamentos ( $p>0,05$ ) no período de 168 horas. Esses dados não diferiram nas condições experimentais, revelando que os achados desse trabalho corroboram com os achados de (Pongnarisorn *et al.*, 2007) os quais

comprovaram que o acúmulo de quantidades de biofilmes ocorrem independentemente do tipo de superfície de implantes.

Os achados do presente estudo mostraram que a superfície de Ti cp que ocorreu menor contagem de UFCs (7,241 e 8,103) nos dois primeiros tempos da pesquisa foi a superfície com condicionamento ácido nítrico (A) o qual possui uma  $R_a=0,32 \mu\text{m}$ , ou seja, uma rugosidade dita intermediária se comparado às superfícies J ( $R_a=0,624$ ) e JA ( $R_a=0,510$ ).

A relação entre a topografia de superfície com ataque ácido nítrico (A), e a diferença de menor quantidade de microrganismos nos dois primeiros períodos de tempo (12 e 24 h), pode estar relacionada a uma diminuição do valor de rugosidade se comparado aos outros tratamentos em virtude do processo de condicionamento ácido, ou a uma possível propriedade antimicrobiana do ácido nítrico utilizado no experimento. Esse fato, se comprovado, pode ser útil para estudos futuros avaliando a resposta biológica e microbiana frente a esse tipo de tratamento de superfície de implantes, embora a concentração de ácido nítrico não tenha sido revelada pelo fabricante.

Observou-se que os fabricantes de implantes não descrevem em detalhes os métodos utilizados para a caracterização das superfícies. Isto pode ocorrer porque os protocolos de tratamentos de superfície utilizados são segredo comercial, como de fato, ocorreu no presente trabalho e confirmado pelo estudo de Sykaras *et al.* (2000). Os autores citam métodos usados para alterar a topografia da superfície dos implantes como o eletro-polimento, decapeamento, jateamento abrasivo, borrifação de plasma, adesão superficial e fotolitografia. Para esses pesquisadores, existem muitas outras técnicas de caracterização rugosa

da superfície tão avançadas quanto às citadas, contudo, as informações são limitadas ou insuficientes em relação à técnica usada para criar as rugosidades superficiais das amostras comercializadas. Além disso, quando utilizados os mesmos métodos e parâmetros na texturização de superfícies, pode-se obter resultados que não necessariamente serão iguais.

No presente estudo foi verificada pouca diferença topográfica em relação às superfícies de Ti cp com jateamento de  $AL_2O_3$  e Jateamento seguido de ataque ácido (JA). Nas fotomicrografias oriundas da visualização em MEV da superfície J mostraram-se com topografia acidentada, com rugosidade homogênea, com porosidades e áreas descamativas generalizadas. Outras características podem ser visualizadas como: fendas, vales e resíduos de partículas de alumina (Figuras 15, 16 e 17) como resultado do provável processo de decapagem do metal. Nas observações das fotomicrografias da superfície JA (Figuras 21 e 22), há crateras mais homogêneas e menores com presença de fendas. Os grânulos de Ti se tornam mais evidentes provavelmente devido ao condicionamento ácido sobre a superfície.

Esses achados também foram verificados por Sykaras *et al.* (2000). Para esses pesquisadores, os diferentes processos podem resultar em pouca diferença topográfica. Já Albrektsson (1997) relatou que a diferença entre superfícies de titânio podem ser visualizadas por diferentes pesquisadores e os mesmos podem apresentar opiniões contrastantes a respeito do que seria uma superfície lisa ou rugosa. Enquanto um autor pode considerar uma superfície rugosa, outro pode determinar a mesma como lisa, e vice-versa.

Pode-se dizer que os fabricantes de implantes dentários desenvolvem tratamentos de superfícies com o intuito de aumentar a rugosidade dos implantes e, conseqüentemente, melhorar o contato com o osso durante a osseointegração (Castilho *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2009; Elias e Mattos, 2009). Dessa forma, cada empresa apresenta uma superfície com tratamento peculiar e, prevendo uma menor aderência em superfícies lisas, as empresas mantêm as primeiras roscas do implante sem tratamento.

Após as análises dos dados deste estudo e dos encontrados na literatura, parece claro que o método pelo qual é feito esse tratamento influencia, não só no potencial de osseointegração como também na aderência de microrganismos, que ocorrerá quando este implante estiver exposto ao meio bucal. Desta forma, na utilização clínica de implantes deve-se levar em consideração não apenas estudos que mostram sua capacidade de osseointegração, mas também sua suscetibilidade a adesão de microrganismos, principalmente os pioneiros na formação do biofilme, que servirão de base para a colonização de microrganismos patogênicos ao tecido peri-implantar.

Keller *et al.* (1990), Klokkevold *et al.* (1997) e Ong *et al.* (1997), com o objetivo de maximizar a quantidade e qualidade da interface osso-implante, relataram que inúmeras alterações da superfície têm sido propostas, na sua maioria baseadas na teoria de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada mediante alteração da topografia ou rugosidade do implante.

Neste contexto, observamos após a leitura em MEV que os discos de Ti cp J e JA mostraram-se com topografia texturizada. As diferentes superfícies apresentaram-se com topografias e rugosidades variadas, no

entanto, as superfícies controle (L) e com ataque ácido nítrico (A) se mostraram visualmente semelhantes. Os grupos que sofreram o jateamento de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J) e JA apresentaram superfícies menos organizadas, caracterizadas por crateras, fossas, sulcos e depressões irregulares se comparados à superfície controle (L).

Uma vez que os valores de  $R_a$  encontrados no presente trabalho foram diferentes entre os grupos, é provável que os resultados biológicos não tenham sido influenciados pela rugosidade conforme os períodos experimentais avaliados (48 a 168 horas) e sim por fatores como: irregularidades da topografia de superfície, contaminação da superfície por partículas de alumínio (Al) ou possíveis alterações na energia de superfície do metal pelos tratamentos realizados.

Esses achados são consistentes uma vez que ao final do período analisado todas as topografias estudadas acumularam quantidades gigantescas de biofilme, como pode ser verificado pelos resultados microbiológicos e pelas fotomicrografias visualizadas em microscopia eletrônica de varredura.

## **6 CONCLUSÕES**

A partir da metodologia empregada, os dados obtidos permitem concluir que:

- A formação de biofilme nas superfícies controle e com subtração por ataque ácido nítrico foi menor nas primeiras 24 horas do experimento.
- Observou-se que todas as superfícies possibilitaram crescimento microbiano, independentemente do tratamento recebido.



## REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T. The response of bone to titanium implants. *CRC Crit Rev Biocompatibility*, v. 1, p. 53-84, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard specification for unalloyed titanium for surgical implant applications. Designation: F67-95. Annual book of ASTM standards. *Medical Devices and Services*, v. 13, n. 1, 1997.

AUSCHILL, T. M.; ARTWEILER, N. B.; NETUSCHIL, L.; BRECX, M.; REICH E.; SCULEAN A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol*, v. 46, n. 5, p. 471-6, 2001.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; BRECX, M.; REICH, E.; SCULEAN, A.; NETUSCHIL, L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci*, v. 110, n. 1, p. 48-53, 2002.

BARTH, E.; MYRVLK, Q. M.; WAGNER, W.; GRISTINA, A. G. In vivo and in vitro comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*, v. 10, p. 325-28, 1989.

BATHOMARCO, R. V.; SOLORZANO, G.; ELIAS, C. N.; PRIOLI, R. Atomic force Microscopy analysis of different surface treatments of Ti dental implant surfaces. *Applied Surface Science*, v. 233, p. 29-34, 2004.

BERGLUNDH, T.; ALBOUY, J.-P.; ABRAHAMSSON, I.; PERSSON, L. G. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res*, v. 18, n. 5, p. 655-61, 2007.

BJERKAN, G.; WITSØ, E.; BERGH, K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop*, v. 80, n. 2, p. 245-50, 2009.

BLACK, J. G. *Microbiology principles and explorations*. 4. ed. Wiley, New York, p. 786, 1999.

BOLLEN, C. M.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, M. D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*, v. 7, n. 3, p. 201-11, 1996.

BRÄNEMARK, P. I.; ADELL, R.; BREINE, U.; HANSSON, B. O.; LINDSTRÖM, J.; OHLSSON, A. Intraosseous anchorage of dental protheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

\_\_\_\_\_.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMEN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, v. 16, n. 1, p. 1-132, 1977.

\_\_\_\_\_. Tissue-Integrated Protheses. *Quintessence Publishing Co*, p. 99-116, 1986.

BUNETEL, L.; GUÉRIN, J.; AGNANI, G.; PIEL, S.; PINSARD, H.; CORBEL, J.C.; BONNAURE-MALLET, M. In vitro study of the effect of titanium on *Porphyromonas gingivalis* in the presence of metronidazole and spiramycin. *Biomaterials*, v. 22, n. 22, p. 3067-72, 2001.

BÜRGERS, 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*, v. 21, n. 2, p. 156-64, 2010.

BUSSCHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*, v. 11, n. 1, p. 24-32, 1997.

\_\_\_\_\_.; RINASTITI, M.; SISWOMIHARDJO, W.; VAN DER MEI, H. C. Biofilm formation on dental restorative and implant material. *J Dent Res*, v. 87, n. 2, p. 657-65, 2010.

CARVALHO, B. M.; PELLIZER, E. P.; MORAES, S. L. D.; FALCÓN-ANTENUCCI, R. M.; FERREIRA JÚNIOR, J. S. Tratamentos de superfície nos implantes dentários. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac*, v. 9, n. 1, p. 123, 2009.

CASTILHO, G. A. A.; MARTINS, M. D.; MACEDO, A. A. Surface characterization of titanium based dental implant. *Brazilian Journal of Physic*, 2006.

CHAN, C.; WEBER, H. Plaque retention on teeth restored with full-ceramic crowns: a comparative study. *J Prosthet Dent*, v. 56, n. 6, p. 666-71, 1986.

CHANG, C. C.; MERRITT, K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. *Journal of Orthopedic Research*, v. 12, p. 526-31, 1994.

CONTERNO, G.; PAZOS, L.; PARODI, M. B.; EGIDI, D. A.; CORENGIA, P. Surface treatment on biomaterials: acid etching on titanium surfaces. In: EUROPEAN CONFERENCE ON BIOMATERIALS, 19th, 2005, Sorrento. *Anais...* Sorrento, 2005. p. 11-5.

COOPER, L. F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent*, v. 84, p. 522-34, 2000.

CURTISS, R. 1984 Kreshover lecture. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence and prospects for an anticaries vaccine. *J Dent Res.*, v. 65, n. 8, p. 1034-45, 1986.

DAWE, C.; JENKINS, G. N.; TONGE, C. H. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. *Br Dent J*, v. 115, p. 65-8, 1963.

DE BOEVER, A. L.; DE BOEVER, J. A. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clinical Oral Implants Res*, v. 17, n. 1, p. 8-17, 2006.

DRAKE, D. R.; PAUL, J.; KELLER, J. C. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 14, n. 2, p. 226-32, 1999.

ELAGLI, K.; NEUT, C.; ROMOND, C.; HILDEBRAND, H. F. In vitro effects of titanium power on oral bacteria. *Biomaterials*, v. 13, n. 1, 1992.

ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C.; SANTOS, M. V. Modificações nas superfícies dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica. *Rev Implant News*, v. 5, n. 5, p. 467-76, 2008.

\_\_\_\_\_.; MATTOS, F. R. Tratamentos das superfícies dos implantes para melhorar a qualidade e a osseointegração. In: OSSEOINTEGRAÇÃO: 20 ANOS DA EXPERIÊNCIA BRASILEIRA, 2009, São Paulo. *Visão contemporânea da implantodontia*. São Paulo: Quintessence, 2009. p. 1-19.

ELTER, C.; HEUER, W.; DEMLING, A.; HANNIG, M.; HEIDENBLUT, T.; BACH, F. W.; STIESCH-SCHOLZ, M. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 23, n. 2, p. 327-34, 2008.

ESPOSITO, M.; HIRSCH, J. M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. Biological factors contributing of failures of osseointegrated oral implants. (I) success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*, v. 106, p. 527-51, 1998.

\_\_\_\_\_.; GRUSOVIN M. G.; WILLINGS M.; COULTHARD P.; WORTHINGTON, H. V. *Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants*. Cochrane Database of Systematic Reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2007.

FILOCHE, S. K.; COLEMAN, M. J.; ANGKER, L.; SISSONS, C. H. A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiological Meth*, v. 69, p. 489-96, 2007a.

\_\_\_\_\_; SOMA, K. J.; SISSONS, C. H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, p. 73-9, 2007b.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C. H. Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 54, p. 27-36, 2008.

FRÖJD, V.; LINDERBÄCK, P.; WENNERBERG, A.; PAZ, L. C.; SVENSÅTER, G.; DAVIES, J. R. Effect of nanoporous TiO<sub>2</sub> coating and anodized Ca<sub>2+</sub> modification of titanium surfaces on early microbial biofilm formation. *BMC Oral Health*, v. 11, p. 8, 2011.

FÜRST, M. M.; SALVI, G. E.; LANG, N. P.; PERSSON, G. R. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, v. 18, n. 4, p. 501-8, 2007.

GATEWOOD, R. R.; COBB, C. M.; KILLOY, W. J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*, v. 4, p. 53-64, 1993.

GIBBONS, R. J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious disease. *J Dent Res*, v. 68, n. 5, p. 750-60, 1989.

GONÇALVES, F.; ZANETTI, L. Z.; ZANETTI, R. V.; RAMALHO, S. A. Estudo in vitro do laser de diodo 980 nm na desinfecção de implantes. *RGO*, v. 57, n. 4, p. 395-9, 2009.

GRÖSSNER-SCHEIBER, B.; GRIEPENTROG, M.; HAUSTEIN, I.; MÜLLER, W. D.; LANGE, K. P.; BRIEDIGKEIT, H.; GÖBEL, U. B. Plaque formation on surface-modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*, v. 12, n. 6, p. 543-51, 2001.

\_\_\_\_\_.; TEICHMANN, J.; HANNIG, M.; DÖFER, C.; WENDEROTH, D. F.; OTT, S. J. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res*, v. 20, n. 8, p. 817-26, 2009.

GUGGENHEIN, B.; GMUR, R.; GALICIA, J. C.; STATHOPOULUS, P. G.; BENAKANAKERE, M. R.; MEIRER, M.; THURNHEREER, T.; KINANE, D. F. In vitro modeling of host-parasite interactions: the subgingival biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiol*, v. 9, p. 208-92, 2009.

HALLAB, A. P.; SHORT, R. D.; JOHNS, R.; SCHWACH, G. The surface analysis of implant materials. The surface composition of a titanium dental implant material. *Clin Oral Implants Res*, v. 4, n. 3, p. 144-50, 2001.

HANSSON, H. A.; ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P. I. Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants. *J Prosthet Dent*, v. 50, n. 1, p. 108-13, 1983.

HEUER, W.; ELTER, C.; DEMLING, A.; NEUMANN, A.; SUERBAUM, S.; HANNIG, M.; HEIDENBLUT, T.; BACH, F. W.; STIESCH-SCHOLZ, M. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehab*, v. 34, n. 5, p. 377-82, 2007.

HEYDENRIJK, K.; MEIJER, H. J. A.; VAN DER REIJDEN, W. A.; RAGHOEBAR, G. M.; VISSINK, A.; STEGENGA, B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 17, n. 6, p. 829-38, 2002.

JARDIM JR., E. G.; GAETTI-JARDIM, E. C.; OLIVEIRA, A. C.; SEGUNDO, A. S., OLIVEIRA, S. R. Características da topografia superficial e de contaminação microbiana de implantes Sin® desenvolvidos para pesquisa. *Innovations Implant Journal – Biomaterials and Esthetics*, v. 1, n. 2, p. 25-9, 2006.

JORGE, A. O. C. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos, 2007.

KAWAI, K.; URANO, M.; EBISU, S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent*, v. 83, n. 6, p. 664-7, 2000.

KELLER, J. C.; DRAUGHN, R. A.; WIGHTMAN, J. P.; DOUGHERTY, W. J.; MELETIOU, S. D. Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 5, n. 4, p. 360-7, 1990.

KILPADI, D. V.; LEMONS, J. E. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res*, v. 28, n. 12, p. 1419-25, 1994.

\_\_\_\_\_; WEIMER, J. J.; LEMONS, J. E. Effect of passivation and dry heatsterilization on surface energy and topography of unalloyed titanium implants. *Colloids and surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 135, p. 89-101, 1998.

KIM, T. H. LEE, D. W.; KIM, C. K.; PARK, K. H.; MOON, I. S. The biocompatibility of SLA – treated titanium implants. *Biomed Materials*, v. 3, n. 2, p. 1-6, 2008.

KLOKKEVOLD, P. R.; NISHIMURA, R. D.; ADACHI, M.; CAPUTO, A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*, v. 8, n. 6, p. 442-7, 1997.

KONIG, D. P.; SCHIERHOLZ, J. M.; HILGERS, R. D.; BERTRAM, C.; PERDREAU-REMGTON, P. F.; RÜT, J. In vitro adherence and accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP 62A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on four different bone cements. *J Langenbecks Arch Surg*, v. 386, n. 5, p. 328-32, 2001.

KONISHI, N.; TORII, Y.; KUROSAKI, A.; TAKATSUKA, T.; ITOTA, T.; YOSHIYAMA, M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil*, v. 30, n. 8, p. 790-5, 2003.

KUULA, H.; KONONEN, E.; LOUNATMAA, K.; KONTTINEN, Y. T.; KONONEN, M. Attachment of oral gram-negative anaerobic rods to

a smooth titanium surface: an electron microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 19, n. 6, p. 803-9, 2004.

LEDDER, R. G.; MADHWAI, T.; SREENIVASAN, P. K.; DE VIZIO, W.; MCBAIN, A. J. Na in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J Medical Microbiol*, v. 58, p. 482-91, 2009.

LEE, B. C.; JUNG, G. Y.; KIM, D. J.; HAN, J. S. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont*, v. 3, p. 81-4, 2011.

LEITE, F. H. V. S. *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores*. 2009. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, 2009.

LEONHARDT, A.; DAHLEN, G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. *Eur J Oral Sci*, v. 103, n. 6, p. 382-7, 1995.

\_\_\_\_\_.; BREGSTRÖM, C.; LEKHOLM U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implan Dent and Relat Res*, v. 4, n. 4, p. 226-32, 2003.

LI, D. H.; LIU, B. L.; HAN, Y.; XU, K. W. Effects of a modified sandblastig surface treatment on topographic and chemical properties of titanium surface. *Implant Dent*, v. 10, n. 1, p. 59-64, 2001.

LIE, T. Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scand J Dent Res*, v. 85, n. 4, p. 217-31, 1977.

\_\_\_\_\_. Morphologic studies on dental plaque formation. *Acta Odontol Scand*, v. 37, n. 2, p. 73-85, 1979.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, v. 36, p. 177-87, 1965.

MABBOUX, F.; PONSONNET, L.; MORRIER, L.; JAFFREZIE, N.; BARSOTTI, O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-



coated dental implant material – an in vivo study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 39, n. 4, p. 199-205, 2004.

MEI, L.; BUSSCHER, H.; VAN DER MEI, H. C.; CHEN, Y.; VRIES, J.; REN, Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci*, v. 117, p. 419-26, 2009.

MIORALLI, M. *Aderência bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio comercialmente puro de uso odontológico*. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, 2009.

MOMBELLI, A.; VAN OOSTEN, M. A. C.; SCHÜRCH, E.; LANG, N. P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*, v. 2, p. 145-51, 1987.

\_\_\_\_\_; LANG, N. P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000*, v. 17, p. 63-76, 1998.

MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D. W. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, p. 7188-93, 2003.

MYANO, N.; OIE, S.; KAMIYA, A. Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. *Biol Pharm Bull*, v. 26, p. 671-4, 2003.

NASSAR, U.; MEYER, A. E.; OGLE, R. E.; BAIER, R. E. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. *Periodontol 2000*, n. 8, p. 114-24, 1995.

NEWMAN, H. N. Diet, attrition, plaque and dental disease. *Br Dent J*, v. 136, n. 12, p. 491-7, 1974.

NOAR, J. H.; EVANS, R. D.; WILSON, D.; COSTELLO, J.; IOANNOU, E.; AYENI, A.; MORDAN, N. J.; WILSON, W.; PRATTEN, J. An in vitro study into the corrosion of intra-oral magnets in the presence of dental amalgam. *European Journal of Orthodontics*, v. 25, n. 6, p. 615-9, 2003.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, v. 95, n. 4, p. 287-96, 1987.

\_\_\_\_\_; KILIAN, M. Microbiology of early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, v. 95, n. 5, p. 369-80, 1987.

OGA, M.; ARIZONO, T.; SUGIOKA, Y. Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied in vitro. *Acta Orthop Scand*, v. 64, n. 3, p. 273-6, 1993.

ONG, J. L.; CARNES, D. L.; CARDENAS, H. L.; CAVIN, R. Surface roughness of titanium on bone morphometric protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent*, v. 6, p. 19-24, 1997.

PARK, A. W.; YAACOB, H. B. A Synopsis of the origins and function of dental plaque and pellicle. *J Nihon Univ Sch Dent*, v. 36, n. 3, p. 157-74, 1994.

PERIASAMY, S; KOLENBRANDER, P. E. Mutualistic biofilm communities develop with Porphyromonas gingivalis and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol*, v. 191, n. 22, p. 6804-11, 2009.

PERSSON, L. G.; LEKHOLM, U.; LEONHARDT, A.; DAHLÉN, G.; LINDHE, J. Bacterial colonization on internal surfaces of Bränemark system implant components. *Clin Oral Implants Res*, v. 7, p. 90-5, 1996.

PÍER-FRANCESCO, A.; ADAMS, R. J.; WATERS, M. G. J.; WILLIAMS, D. W. Titanium surface modification and its effect on the adherence of Porphyromonas gingivalis: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res*, v. 17, n. 6, p. 633-7, 2006.

PONGNARISORN, N. J.; GEMMELL, E.; TAN, A. E. S.; HENRY, P. J.; MARSHALL, R. I.; SEYMOUR, G. J. Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Impl Res*, v. 18, n. 1, p. 114-25, 2007.

PYE, A. D.; LOCKHART, D. E. A.; DAWSON, M. P.; MURRAY, C. A.; SMITH, A. J. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*, v. 72, n. 2, p. 104-10, 2009.

QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M. A. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res*, v. 1, p. 8-12, 1990.

\_\_\_\_\_; MARECHAL, M.; BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; DARIUS, P. L.; 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*, v. 17, n. 3, p. 138-44, 1990.

\_\_\_\_\_; VAN DER MEI, H. C.; BOLLEN, C. M.; SCHOTTE, A.; MARECHAL, M.; DOORNBUCH, G. I. An in vivo study of the influence of surface roughness of implants on the microbiology of supra and subgingival plaque. *J Dent Res*, v. 72, n. 9, p. 1304-9, 1993.

\_\_\_\_\_; BOLLEN, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol*, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1995.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_.; PAPAIOANNOU, W.; VAN ELDERE, J.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 11, n. 3, p. 169-78, 1996.

\_\_\_\_\_.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl Res*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2002.

RAMS, T. E.; LINK, C. C. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol*, v. 11, p. 93-100, 1983.

\_\_\_\_\_.; ROBERTS, T. W.; TATUM, H.; KEYES, P. H. The subgingival microbial flora associates with human dental implants. *J Prosthetic Dent*, v. 51, p. 529-34, 1984.

RAVNHOLT, G. Corrosion current and pH rise around titanium coupled to dental alloys. *Sacand J Dent Res*, v. 96, n. 5, p. 466-72, 1988.

RIMONDINI, L. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol*, v. 68, n. 6, p. 556-62, 1997.

ROMEIRO, R. L.; PEREIRA, C.; SILVA, A. V.; BERTRAMELO, L. A. JORGE, A. O. C. Aderência de microrganismos em implantes dentários de superfície lisa ou tratada. *Innov Implant J, Biomater Esthet*, v. 5, n. 2, p. 25-9, 2010.

ROMPEN, E.; DOMKEN, O.; DEGIDI, M.; PONTES, A. E. F.; PIATTELLI, A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Impl Res*, v. 17, n. 2, p. 55-67, 2006.

ROSENBERG, E. S. A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally healthy patients: a clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 19, n. 6, p. 873-9, 2004.

SCARANO, A.; PIATTELLI, M.; VRESPIA, G.; CAPUTI, S.; PIATTELLI, A. Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study. *J Oral Implantol*, v. 29, n. 2, p. 80-5, 2003.

SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WIELAND, M.; HORN, N.; NUESRY, E.; BUBE, C.; BECKER, J. Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund Kiefer Gesichts Chir*, v. 11, n. 6, p. 333-8, 2007.

SHACKLETON, J. L.; SLABBERT, J. C.; COOGAN, M. M.; BECKER, P. J. The effect of titanium on the growth of plaque microorganisms in vitro. *J Dent Assoc S Afr*, v. 49, n. 9, p. 453-6, 1994.

SHIBLI, J. A.; MELO, L.; FERRARI, D. S.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; FERES, M. Composition of supra and subgingival biofilm

of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Impl Res*, v. 19, n. 10, p. 975-82, 2008.

SILVA, G. L. M.; FERREIRA, S. D.; ZENÓBIO, E. G.; SOARES, R. V.; COSTA, F. O. Mucosite peri-implantar e peri-implantite: Prevalência e indicadores de risco em indivíduos parcialmente edêntulos. *R Periodontia*, v. 17, n. 3, 2007.

SISSONS, C. H.; CUTRESS, T. W.; HOFFMAN, M. P.; WAKEFIELD, J. S. J. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque grow, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res*, v. 70, n. 11, p. 1409-16, 1991.

\_\_\_\_\_. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dental Res*, v. 11, n. 1, p. 110-26, 1997.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJIE, A. D.; EUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, J. R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J of Clinical Periodontal*, v. 25, p. 134-44, 1998.

SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*, v. 55, p. 143-66, 2011.

STEFENON, L. *Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte*. 2012. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, 2012.

STEINBERG, D.; SELA, M. N.; KLINGER, A.; KHOAVI, D. Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Implants Res*, v. 9, n. 2, p. 67-72, 1998.

SUBRAMANI, K.; JUNG, R. E.; MOLENBERG, A.; HÄMMERLE, C. H. F. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 24, n. 4, p. 616-26, 2009.

SYED, S. A.; LOESCHE, W. J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology*, v. 24, n. 4, p. 638-44, 1972.

SYKARAS, N.; IACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 15, n. 5, p. 675-90, 2000.

TEUGHEL, W.; ASSCHE, N. V.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Impl Res*, v. 17, n. 2, p. 68-81, 2006.

VAN DE SANDE, F. H.; AZEVEDO, M. S.; LUND, R. G.; HUYSMANS, M. C. D. N. J. M.; CENCI, M. S. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling*, v. 27, n. 9, p. 1057-63, 2011.

VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J*, v. 30, n. 4, p. 305-26, 1980.

WALKER, C.; SEDLACEK, M. J. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, n. 3, p. 152-61, 2007.

WENNERBERG, A.; EKTESSABI, A.; HATKAMATA, S. et al. Titanium release from implants prepared with different surface roughness: an in vitro and in vivo study. *Clin Oral Impl Res*, v. 15, p. 505-12, 2004.

WILLIAMS, D. F. *Biocompatibility of clinical implant materials*. Boca Raton: CRC Press, 1981.

WISE, M. D.; DYKEMA, R. W. The plaque-retaining capacity of four dental materials. *J Prosthet Dent*, v. 33, n. 2, p. 178-90, 1975.

WONG, L.; SISSONS, C. H. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grow in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol*, v. 46, n. 6, p. 477-86, 2001.

WU-YUAN, C. D.; EGANHOUSE, K. J.; KELLER, J. C.; WALTERS, K. S. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol*, v. 21, n. 3, p. 207-13, 1995.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K.; HIRAYAMA, A. Influence of surface modification to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. *J Biomed Mater Res*, v. 52, n. 2, p. 388-94, 2000.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Influence of surface modifications to titanium on bacterial activity in vitro. *Biomaterials*, v. 22, n. 14, p. 2043-8, 2001.

\_\_\_\_\_; KATO, T.; MATSUZAKA, K.; HAYAKAWA, T.; SHIBA, K. Prevention of biofilm formation on titanium surfaces modified with conjugated molecules comprised of antimicrobial and titanium-binding peptides. *Biofouling*, v. 26, n. 1, p. 103-10, 2010.

ZAURA, E.; BUIJIS, M. J.; HOOGENKAMP, M. A.; CIRIC, L.; PAPETTI, A.; SIGNORETTO, C.; STAUDER, M.; LINGSTROM, P.; PRATTEN, J.; SPRATT, D. A.; WILSON, M. The effects of fractions from Shiitake Mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *J Biomed and Biotach*, v. 2011, p. 1-10, 2011.

## APÊNDICES



## APÊNDICE 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### PARECER N. 141/2012

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 30/05/12, analisou o protocolo de pesquisa “**Adesão e formação de biofilme em superfícies de titânio com diferentes topografias**”, n. 062/2012, de responsabilidade do pesquisador **Luciana Ruschel dos Santos**.

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a adesão e formação do biofilme bacteriano sobre as diferentes topografias de titânio comercialmente puro (Ti cp) em diferentes tempos, por métodos microbiológicos e microscopia eletrônica.

Será realizado estudo *in vitro*, aleatorizado, no qual serão formados biofilmes em placas de micropoços sobre discos de titânio, tendo como inóculo saliva (microcosmos) de dez voluntários portadores de doença periodontal, não-fumantes, que não tenham utilizado antibióticos no último mês e que permaneçam sem higienização por 24h. Após a coleta da saliva, os pacientes serão encaminhados para tratamento periodontal. Os corpos de prova de titânio lisos e rugosos com os três tratamentos de superfície (duplo ataque ácido e jateamento com óxido de alumínio), serão adquiridos já estéreis, com 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura já contendo as superfícies desejadas para o projeto. Os CPs de titânio serão avaliados quanto a rugosidade inicial por meio de rugosímetro óptico para padronização das superfícies e após esterilizados em auto-clave conforme parâmetros fornecidos pelo fabricante dos implantes. ----- 50 discos de superfície lisa (grupo controle); DISCOS DE Ti (200) ----- 50 discos de superfície com ataque ácido; ----- 50 discos com superfície jateada com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; ----- - 50 discos com superfície com ataque ácido + jateamento com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Será utilizada a técnica do microcosmo onde a saliva dos pacientes periodontais serão preparadas e armazenadas em ágar nutriente e inoculadas em 5 ml de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubadas a 37 °C por 12/24/48 horas para preparação de inóculo com turvação aproximada de 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde a 10<sup>8</sup>

UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL), seguindo o protocolo de MONTVILLE e SCHAFFNER (2003). Após a preparação do inóculo bacteriano, 200 µl da suspensão com uma média de  $10^8$  células/ml serão transferidos para tubos cônicos de poliestireno de 50 mL, contendo 15 ml de caldo Mueller Hinton. Todos os discos de Ti serão introduzidos unitariamente nesses tubos, incubados por 12, 24 e 48 horas a 37°C sob agitação constante de 100 rpm (rotações por minuto) em agitador orbital. Após os períodos de incubação, os discos serão retirados e lavados separadamente com solução salina fisiológica estéril seguindo o protocolo de PIZZOLITTO *et al.* (2000), PIZZOLITTO *et al.* (2001). Todos os CPs de Ti cp serão removidos do caldo de cultura inoculado com bactérias, introduzidos em tubos de vidro contendo 5 ml de solução salina estéril e sonicados a 40 Hz por 8 minutos para desalojar as células bacterianas aderidas sobre a superfície dos corpos de prova. A solução salina será homogeneizada em agitador de tubos (vortex) por 10 segundos, realizada diluições seriadas ( $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ ) e semeadura em Ágar *Tryptic Soy Broth* (TSA) para determinar o número de células viáveis nos corpos de prova. Célula viável é definida como aquela capaz de dividir-se e proliferar. A maneira usual de realizar a contagem individual é determinar o número de células, na amostra, capaz de formar colônias sobre um ágar adequado. Por essa razão, a contagem viável é frequentemente chamada de contagem de colônias e o procedimento de contagem é que cada célula viável possa produzir uma colônia. Um dos métodos para fazer a contagem de colônias é o método do espriamento das colônias bacterianas na superfície de placa com ágar. O volume apropriado de uma cultura diluída, para ser espriado, geralmente, não é maior que 0,1 ml. A placa é então incubada até que as colônias apareçam e o número seja contado. É essencial que o número de colônias, não seja muito baixo, para ter valor estatístico. Na prática, o valor válido estatisticamente é a contagem de colônias realizada em placas com crescimento bacteriano entre 30 e 300 colônias.

Para se obter o número apropriado do número de colônias, a amostra a ser contada deve ser sempre diluída. Para fazer diluições seriadas, a bactéria deve estar em meio líquido. O procedimento é realizado da seguinte forma: Enumerando 8 tubos (18 x 180 mm) de número 1 até 8. Encher os tubos de número 2 a 8 com 9,0ml de água. O tubo número 1 corresponde ao da amostra a ser contada, ou seja, após o procedimento do banho sônico e vortex dos corpos de prova metálicos, 1,0 ml da suspensão bacteriana será transferido para os tubos seguintes; - A partir da amostra contida no tubo nº1, transferir 1 ml para o tubo nº2,

diluição de 1:10 ou  $10^{-1}$ ; homogeneizar e do tubo nº2 transferir 1 ml para o tubo nº3, diluição 1:100 ou  $10^{-2}$ , homogeneizar e do tubo nº3 transferir 1 ml para o tubo nº4, diluição 1:1000 ou  $10^{-3}$ , homogeneizar e do tubo nº4 transferir 1 ml para o tubo nº5, diluição. Após a diluição seriada da suspensão bacteriana, será pipetada 0,1 ml (100 ul) em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio sólido *Tryptic Soy Broth* (TSA). O inóculo será espalhado sobre toda a superfície da placa com alça de Drigalsky. As placas de Petri serão tampadas, revestidas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 horas de incubação as colônias crescidas serão contadas e o resultado da diluição será registrado e multiplicado pelo fator da diluição. Os discos já utilizados na avaliação microbiológica serão imersos em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,1), durante 15 minutos; desidratados em solução de etanol (15, 30, 50, 75, 95, 100%) por 15 minutos; secos em estufa a 37°C e posteriormente colados em suportes metálicos próprios para o MEV; metalizados com ouro (1 KV, 15 mA, 2 minutos, no aparelho Edwards S150 B) e encaixados em câmara a vácuo do microscópio para análise em microscópio eletrônico de varredura.

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do (a) pesquisador (a) e das instituições envolvidas estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Solicita-se ao (a) pesquisador (a) apresentar relatório a este CEP no final do estudo.

**Situação: PROTOCOLO  
APROVADO**

Passo Fundo, 31 de maio de 2012.

Nadir Antonio Pichler  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

## **APÊNDICE 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio com diferentes topografias” de responsabilidade de Claudio Zeferino Dal Agnol, aluno do Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo – Passo Fundo RS.

O Objetivo dessa pesquisa é verificar a adesão e formação de biofilme em superfícies de titânio com diferentes topografias de superfície pela técnica do microcosmo e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes tempos.

A sua participação vai se dar pela coleta de saliva no momento em que for diagnosticada doença periodontal. A coleta será realizada por examinadores da UFPel, acompanhados do pesquisador responsável, nessa instituição. A coleta é realizada com você cuspiendo em um recipiente esterilizado por alguns minutos, e essa saliva será utilizada como inóculo para pesquisa no desenvolvimento de bactérias. Sendo que após a coleta você estará liberado de qualquer compromisso com a pesquisa. Esse procedimento não trás desconforto ou risco à saúde. E em qualquer momento você poderá receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida ou eventual desconforto, podendo ter acesso aos seus dados em qualquer etapa da pesquisa.

Ao participar dessa pesquisa você receberá as orientações sobre a doença periodontal e será encaminhado para tratamento adequado na instituição (UFPel).

Sua participação na pesquisa não é obrigatória e você pode desistir em qualquer momento retirando seu consentimento. Caso tenha alguma despesa relacionada à pesquisa essa será ressarcida, porém, você não receberá pagamento pela participação no estudo. As suas informações geradas a partir da sua saliva serão mantidas em sigilo.

Você não será identificado em nenhum momento da pesquisa bem como, da divulgação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas ou se considera prejudicado(a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com o pesquisador Claudio Zeferino Dal Agnol pelo telefone (54) 91683242, com o curso de Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo (UPF), com a Coordenação da Pós-Graduação da UFPel ou também consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF pelo telefone (54)33168370.

Dessa forma, concordo em participar da pesquisa de acordo com as explicações e orientações acima. Desde já agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua autorização, que será assinada em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o pesquisador.

Pelotas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Claudio Zeferino Dal Agnol  
Cirurgião-dentista - CRO/RS 15.758  
RG: 4049968151  
CPF: 669.819.640-15

\_\_\_\_\_

### APÊNDICE 3 – Informações adicionais – Materiais e métodos

#### Protocolo básico para fixação das amostras de acordo com o manual do CME - UFRGS

Glutaraldeído			
2,5%.....		1,2 ml	
Tampão	fosfato	de	sódio
0,2M.....		5,0 ml	
H2O			
destilada.....		3,8	
ml			
pH			do
meio.....		7,2 – 7,4	

#### Lavagem

Tampão fosfato 0,2M + H2O destilada proporção de 1:1 (pH 7,2 – 7,4). O material passou por 3 lavagens de 30 minutos cada.

#### Desidratação

Acetona	30%.....	10
minutos		
Acetona	50%.....	10
minutos		
Acetona	70%.....	10
minutos		
Acetona	90%.....	10
minutos		
Acetona	90%.....	20
minutos		
Acetona	100%.....	10
minutos		
Acetona	100%.....	20
minutos		

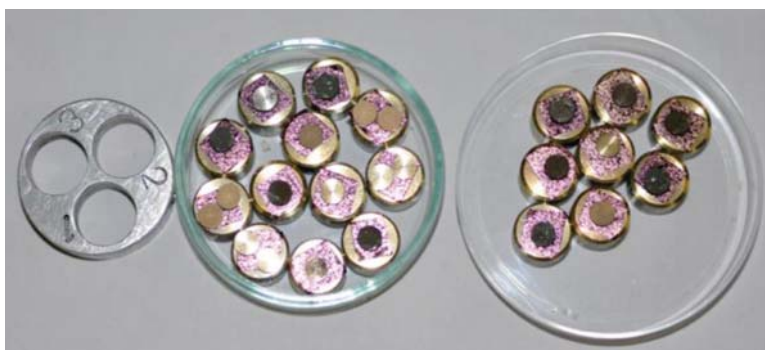
### **Dessecação**

Essa etapa foi realizada por meio do aparelho de ponto crítico (Critical Point Dryer da Blazers CPD030. Após o ponto crítico as peças foram colocadas em Stubs, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização da área de interesse.

### **Metalização**

A metalização foi feita na metalizadora Sputter Coater da Blazers SCD050. Essa etapa torna o material condutivo por meio de deposição de um metal, no caso da presente pesquisa foi utilizado ouro sobre a amostra.

Em seguida são mostrados os espécimes metalizados em stubs que são suportes para que seja possível a visualização por meio de MEV. À esquerda da foto enumerada de 1 a 3 está a peça que prende o stub para ser visualizado.



*Foto mostrando os corpos de prova metalizados em ouro e preparados em stubs, prontos para a visualização pela MEV.*

A figura abaixo mostra o momento da leitura dos espécimes no centro de microscopia eletrônica da UFRGS



*Foto ilustrando o momento da visualização no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6060).*



## ARTIGO A SER SUBMETIDO<sup>1</sup>

### FORMAÇÃO DE BIOFILME EM TITÂNIO COM DIFERENTES TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE<sup>2</sup>

#### RESUMO

Objetivo: avaliar a formação do biofilme sobre diferentes topografias de titânio comercialmente puro (Ti cp) grau 4, nos tempos de 12, 24, 48 e 168 horas pela técnica do microcosmo (saliva artificial) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Materiais e métodos: foram formados biofilmes em placas de micro poços sobre discos de Ti cp (n=160), tendo como inóculo saliva de paciente periodontal e 40 espécimes de cada superfície: lisa (controle – L), jateadas com óxido de alumínio (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – J), subtração por ataque ácido nítrico (A) e jateadas com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acrescidas de ataque ácido nítrico (JA). Um disco de cada condição foi avaliado previamente à inoculação quanto a sua topografia

---

<sup>1</sup> Clinical Oral Implants.

<sup>2</sup> Claudio Zeferino Dal'Agnol – Mestrando em Clínica Odontológica pela Universidade de Passo Fundo/RS.

Leticia Stefenon- Mestrado em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic – Campinas/SP.

Françoise Helene Van De Sande – Doutora em Dentística pela Universidade Federal de Pelotas/RS.

Álvaro Della Bona – Doutor e Professor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo/RS.

Luciana Ruschel dos Santos – Doutora e Professora do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo/RS.

Maximiliano Sérgio Cenci – Doutor e Professor do Departamento de Dentística e Cariologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/RS.

por rugosidade média ( $R_a$ ) e pela MEV e dezesseis novamente por MEV após crescimento bacteriano. Os dados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA e Tuckey para comparação das médias ( $p < 0,05$ ). Resultados: Houve adesão bacteriana e formação de biofilme em todas as superfícies e tempos testados, independentemente da topografia dos corpos de prova. Houve diferença estatística entre a superfície controle (25,34 UFC/mg) e A (subtração por ataque ácido nítrico, 19,15 UFC/mg) em relação às superfícies jateadas e jateadas com  $Al_3O_2$  acrescidas de ataque ácido nítrico ( $J = 43,83$  e  $JA = 32,06$  UFC/mg) nas primeiras 12 horas de análise. A formação de biofilme foi maior nas superfícies J ( $R_a = 0,62 \mu m$ ) e JA ( $R_a = 0,51 \mu m$ ). Conclusões: observou-se que todas as superfícies possibilitaram crescimento microbiano, independentemente do tratamento recebido.

Palavras-chave: titânio, microcosmo, biofilmes, peri-implantite.

## ABSTRACT

Objective: To evaluate biofilm formation on different topographies of commercially pure titanium (CP Ti) grade 4, in the times of 12, 24, 48 and 168 hours the technique of the microcosm (artificial saliva) and scanning electron microscopy (SEM). Materials and methods were formed biofilms in microtiter plates wells on cp Ti discs ( $n = 160$ ), using as inoculum saliva of periodontal patients and 40 specimens of each surface: smooth (control - L), blasted with aluminum

oxide ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  - J), subtraction attack by nitric acid (A) and blasted with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  increased attack nitric acid (JA). A disc of each condition was assessed before inoculation as its topography by average roughness (Ra) and the SEM and SEM after sixteen again for bacterial growth. Data were analyzed by ANOVA and Tukey for comparison of means ( $p < 0,05$ ). Results: There was biofilm formation on all surfaces and times tested, regardless of the topography of the specimens. There was no statistical difference between the control surface (25.34 CFU / mg) and A (subtraction attack nitric acid, 19.15 CFU / mg) compared to surfaces blasted and blasted with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  plus nitric acid attack (J = 43, JA = 83 and 32.06 CFU / mg) in the first 12 hours of analysis. The bacterial adhesion and biofilm formation on the surfaces were higher J (Ra = 0.62 mM) and JA (Ra = 0.51  $\mu\text{m}$ .) Conclusions: It was observed that all surfaces possible microbial growth, regardless of the treatment received.

Keywords: titanium, microcosm, biofilms, peri-implantitis.

## INTRODUÇÃO

Na Odontologia os implantes de titânio são utilizados como o material de escolha para uma variedade de casos, desde a substituição de um único elemento dentário a reabilitações completas (Mabboux et al., 2004; Píer-Francesco et al., 2006; Elter et al., 2008; Shibli et al., 2008; Pye et al., 2009). A indicação do biomaterial titânio refere-se às suas

excelentes características mecânicas, físico-químicas, bioquímicas, tolerância tecidual, biocompatibilidade (Bunetel et al., 2001; Elias et al., 2008; Subramani et al., 2009), solidez, resistência à corrosão e por possuir módulo de elasticidade similar ao osso (Pier-Francesco et al., 2006).

A evolução tecnológica dos implantes, propiciou a criação de vários modelos com diferentes topografias de superfície (Carvalho et al., 2009) no intuito de aumentar a área disponível para ocorrer osseointegração defendido desde a década de 50 pelo Dr. Per. I. Brånemark (Brånemark et al., 1977; Brånemark, 1986). As alterações na topografia e na energia superficial do titânio podem ser feitas com o tratamento de superfície, utilizando o emprego do jateamento com partículas abrasivas e ataque ácido, entre outros (Rosenberg et al., 2004). A topografia superficial ou rugosidade de superfície, ao passo que aumenta a possibilidade de osseointegração, pode acumular espécies microbianas (biofilme), podendo levar à infecção peri-implantar, resultando em destruição óssea e, conseqüentemente, falha na reabilitação com esse tipo de biomaterial (Grössner-Schreiber et al., 2009; Gonçalves et al., 2009). O objetivo desse estudo foi verificar a formação de biofilme em superfícies de Ti cp grau 4, com diferentes tratamentos de superfície, em diferentes períodos de tempo, por método microbiológico (técnica do microcosmo) e visualização por microscopia eletrônica de varredura, testando a hipótese que haverá maior formação de biofilme nas superfícies com tratamento em relação ao controle em todos os períodos experimentais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo (UPF) sob parecer número 141/2012 e protocolo nº 062/2012. Um voluntário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, a fim de autorizar sua participação no estudo. Foi realizado um estudo *in vitro*, aleatorizado, no qual foram formados biofilmes em placas de micropoços sobre discos de Ti cp, tendo como inóculo a saliva (microcosmos) de um doador, portador de doença periodontal, não fumante, que não havia utilizado antibióticos no último mês e que permaneceu sem higienização por 24 h, previamente selecionado pelo pesquisador. Os parâmetros para seleção eram bolsas periodontais com mais de 4 mm de profundidade com sangramento e/ou supuração (SS) à sondagem periodontal e com níveis de inserção clínica aproximadamente de 7 mm (NI). Após a coleta da saliva o voluntário foi encaminhado para tratamento periodontal na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) no setor de Periodontia do Centro de Especialidades Odontológicas (CEO). Os biofilmes foram crescidos independentemente por até 168 horas, sobre 10 discos para cada inóculo (n=10). O experimento foi realizado nos tempos de 12, 24, 48 e 168 horas, totalizando 40 espécimes de cada tipo de superfície (N=160) e 20 espécimes escolhidos aleatoriamente para análise em MEV em cada tempo da pesquisa, anterior e após a contaminação microbiana pela técnica do microcosmo.

## **Obtenção do meio definido enriquecido com mucina (DMM) – saliva artificial**

A obtenção do meio DMM foi realizada conforme protocolo descrito por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5 g/l), ureia (1,0 mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl<sub>2</sub>, 1,0; MgCl<sub>2</sub>, 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH<sub>4</sub>Cl, 2,0), mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/peptídeo (em mmol/l), em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina (2,38), leucina (3,68), serina (3,46), treonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38), e caseína (5,0 g/l).

## **Coleta e processamento da saliva**

Foi realizada a coleta de 70 ml de saliva estimulada com filme de parafina (Parafilm "M"®, American National Can TM, Chicago, IL, EUA) de um doador, portador de doença periodontal. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril, transportada em caixa de isopor com gelo ao Laboratório de Microbiologia da UFPel. Após, a saliva foi filtrada através de lã de vidro estéril, armazenada em um

recipiente estéril e homogeneizada em vortex (Filoche et al., 2007). Foram separadas da saliva coletada do voluntário, duas alíquotas, uma para quantificação bacteriana (dados em UFC/ml), e a outra foi centrifugada (5000 g, a 4°C por 5 min) o sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi congelado para futuras análises microbianas.

### **Corpos de prova**

Os corpos de prova de titânio foram adquiridos estéreis, com 5mm de diâmetro e 3mm de espessura, doados pela empresa Titanium Fix® - AS Technology Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil, já com os tratamentos de superfície desejados para o estudo, onde foram avaliados um disco de cada condição quanto a sua  $R_a$ . Os espécimes foram divididos em quatro grupos: o Primeiro de superfície lisa (L) sendo o grupo controle (como na região cervical dos implantes, ou seja, simulando a localização da colonização bacteriana inicial) e com três tratamentos de superfície, sendo que o segundo grupo era jateado com óxido de alumínio (J), o terceiro com ataque ácido nítrico a 30% (A) e o quarto e último grupo de superfície jateada com óxido de alumínio acrescido de ataque ácido nítrico a 30% (JA).

Foi realizada a avaliação da rugosidade inicial de um disco de cada condição, escolhidos aleatoriamente, anterior a contaminação microbiana, a fim de verificar a  $R_a$  por meio de rugosímetro ótico (Surr-Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ $\lambda c$  e  $\lambda c$  0,25 mm, sendo considerado o valor de

rugosidade média dada pelo equipamento ( $R_a$ ), como fator de comparação das superfícies.

Para cada corpo de prova foram realizadas três medições em cada lado, de forma que essas cobrissem a maior área possível da superfície e em diferentes direções, para que se realizasse a média de rugosidade (ABNT NBR ISO 4288).

## **Desenvolvimento do biofilme**

A saliva foi preparada e inoculada sobre os corpos de prova de Ti cp em placas de micropoços, em um volume de 400  $\mu$ L por poço. Após 60 minutos, a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços e 1,8 ml de saliva artificial pelo meio DMM previamente preparado foi adicionado em cada micropoço. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (80%  $N_2$ , 10%  $CO_2$  e 10%  $H_2$ ) a 37°C por até 168 horas (Schwarz et al., 2007). Diariamente as placas eram agitadas cuidadosamente, o sobrenadante removido, medido o pH (pHmetro – Anolion PM608 Plus, São Paulo, SP) e o meio renovado.

## **Análise do biofilme**

Após 12, 24, 48 e 168 horas (Leonhardt & Dahlen, 1995; Schwarz et al., 2007), os discos foram removidos dos poços com pinça



estéril e as células não aderidas removidas gentilmente por lavagem em solução salina estéril (2 ml). Após, os discos foram colocados em tubos contendo 1 ml de RTF (meio de transporte reduzido) e sonicados (Sonicador Vibra Cell – Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) com potência de 40 W, amplitude de 5%, usando 6 pulsos de 9,9 s cada (BOWEN et al., 1986) para obtenção do biofilme de suspensão homogênea.

### **Diluições seriadas (Black, 1999)**

Após a etapa de sonicação dos tubos com os corpos de prova contendo 1 ml de RTF procedeu-se a fase de diluição seriada das suspensões de biofilme para contagem de microrganismos totais. As suspensões foram diluídas em RTF em séries de até  $1:10^7$  e imediatamente inoculadas em duplicata em Ágar sangue para contagem de microrganismos totais. As placas foram incubadas em anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>) a 37 °C por 96 h. As unidades formadoras de colônia foram contadas e os resultados expressos em UFC/mg de espécime de biofilme (peso seco) (Bollen et al., 1996; Drake et al., 1999; Burgers et al., 2010). Após remoção da alíquota da suspensão microbiana inicial para quantificação, o espécime foi removido da suspensão e centrifugado.

## **Preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura – MEV JSM 6060 – UFRGS**

O MEV JSM 6060 opera numa tensão de 0,1 a 30 Kv, podendo ser utilizado em observações convencionais de imagem em elétrons secundários (SEI). Foram utilizados para o estudo 20 corpos de prova, sendo escolhido aleatoriamente um para cada condição e tempo e mais quatro discos de cada condição antes da contaminação pela técnica do microcosmo. Os discos foram cuidadosamente colocados com pinça estéril em uma placa de 24 poços e imersos em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (solução 20 vezes maior do que o volume da peça), lacrados com fita adesiva e transportados em embalagem de isopor contendo gelo ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) onde foram preparados para a visualização.

## **Estatística**

Os resultados experimentais desse estudo foram expressos pelos testes estatísticos ANOVA e teste de Tukey de dois fatores com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes foi considerado o valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

### Rugosidade

Os resultados das medições de rugosidade dos corpos de prova estão expostos na Tabela 1.

### Formação dos biofilmes

Na avaliação do crescimento dos biofilmes nos diferentes períodos de tempo do experimento observou-se crescimento homogêneo de microrganismos (UFC/mg), com crescimento máximo no tempo de 168 horas (7 dias), independentemente do tipo de superfície estudada (Figura 1).

No presente estudo, os resultados médios das medições de rugosidade das superfícies conforme os tratamentos foram: lisa (L)  $R_a=0,214 \mu\text{m}$ ; jateamento com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (J)  $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ; ataque ácido nítrico (A)  $R_a=0,321 \mu\text{m}$  e jateamento acrescido de ataque ácido nítrico (JA)  $R_a=0,510 \mu\text{m}$ . Observou-se que todas as superfícies possibilitaram crescimento microbiano, independentemente do tratamento recebido.

No segundo período experimental (24 h) foi encontrado que o tratamento com ataque ácido nítrico (A), com rugosidade de  $R_a=0,321 \mu\text{m}$ , teve o valor médio de UFCs inferior aos demais (8,103), estatisticamente significativo ( $p<0,05$ ) em relação à superfície com jateamento (J) com maiores valores de rugosidade ( $R_a=0,624 \mu\text{m}$ ) e contagem de UFCs (8,309). Esses achados são semelhantes ao estudo de

Bürgers *et al.* (2010), que utilizaram discos de titânio puramente usinado (Pt) e jateados seguido de ataque ácido (prom), para verificação da adesão bacteriana *in vitro* de *Streptococcus sanguinis*. Os achados desse estudo confirmaram que a adesão bacteriana inicial às superfícies de titânio com topografias diferentes é primariamente influenciada pela rugosidade de superfície ( $R_a$ ).

Os resultados referentes ao terceiro período experimental (48 horas) revelaram diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre a superfície JA com rugosidade de  $R_a = 0,510 \mu\text{m}$  e média de UFCs/mg 8,728 e a superfície lisa (L)  $R_a = 0,214$  e média de UFCs/mg de 8,468, onde uma menor quantidade de biofilme formou-se na superfície lisa em relação à uma superfície totalmente rugosa, como foi o caso da superfície JA.

Ao final do período de análise (168 horas) as médias de contagens de UFCs/mg não mostraram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as superfícies estudadas com valores médios de UFCs de 8,941; 9,014; 8,878; 8,984, respectivamente (Tabela 2). Outro ponto importante da pesquisa foram os achados relativos à superfície controle ( $R_a = 0,21 \mu\text{m}$ ), que apresentou rugosidade três vezes inferior em relação à superfície jateada ( $R_a = 0,624 \mu\text{m}$ ) e, mesmo sendo considerada uma superfície lisa, possibilitou uma concentração de biofilme estatisticamente igual aos outros tratamentos (J, A, JA) no último período de crescimento microbiano.

Esses resultados estão em concordância com Pongnarisorn *et al.* (2007), os quais relataram que o acúmulo e quantidade de biofilme ocorrem independentemente do tipo de superfície do implante. Esses resultados referentes ao último período de tempo, ou seja, em sete dias

de acompanhamento, revelaram que os biofilmes cresceram a níveis muito superiores em relação ao período inicial.

Os achados do presente estudo mostraram que a superfície de Ti cp onde houve menor contagem de UFCs (7,241 e 8,103), nos dois primeiros tempos da pesquisa (12 e 24 horas), foi a superfície com condicionamento ácido nítrico (A), com rugosidade de  $R_a=0,32\mu\text{m}$ , ou seja, uma rugosidade dita intermediária se comparado às superfícies J ( $R_a=0,624$ ) e JA ( $R_a=0,510$ ).

A relação entre a topografia de superfície com ataque ácido nítrico (A), e a diferença de menor quantidade de microrganismos nos dois primeiros períodos de tempo (12 e 24 h), pode estar relacionada a uma diminuição do valor de rugosidade se comparado aos outros tratamentos em virtude do processo de condicionamento ácido, ou a uma possível propriedade antimicrobiana do ácido nítrico utilizado no experimento.

No presente estudo foi verificada pouca diferença topográfica em relação às superfícies de Ti cp com jateamento de  $\text{AL}_2\text{O}_3$  e jateamento seguido de ataque ácido (JA). As fotomicrografias oriundas da visualização em MEV da superfície J mostraram topografia acidentada, rugosidade homogênea, com porosidades e áreas descamativas generalizadas. Outras características podem ser visualizadas como: fendas, vales e resíduos de partículas de alumina (Figura 2) como resultado do provável processo de decapagem do metal.

Sykaras et al. (2000) citam que os diferentes processos podem resultar em pouca diferença topográfica. Já Albrektsson (1998) relatou que a diferença entre superfícies de titânio podem ser visualizadas por

diferentes pesquisadores e os mesmos podem apresentar opiniões contrastantes a respeito do que seria uma superfície lisa ou rugosa.

Pode-se dizer que os fabricantes de implantes dentários desenvolvem tratamentos de superfícies com o intuito de aumentar a rugosidade dos implantes e, conseqüentemente, melhorar o contato com o osso durante a osseointegração (Castilho et al., 2006; Carvalho et al., 2009; Elias & Mattos, 2009). Dessa forma, cada empresa apresenta uma superfície com tratamento peculiar e, prevendo uma menor aderência em superfícies lisas, mantêm as primeiras roscas do implante sem tratamento.

## **DISCUSSÃO**

Muitos estudos utilizando diferentes técnicas microbiológicas já tentaram explorar a adesão de espécies microbianas em implantes ou discos de Ti cp no intuito de conhecer a relação entre o biofilme bacteriano e as superfícies dos implantes (Pier-Francesco et al., 2006; Jardim Jr. et al., 2006; Bjerkan et al., 2009; Mioralli, 2009; Bürgers et al., 2010; Romeiro et al., 2010; Fröjd et al., 2011).

A técnica do microcosmo ou “boca artificial” idealizada por Wong e Sissons (Wong & Sissons, 2001) já foi usada para testes com substâncias antimicrobianas e na área da Cariologia (Sissons et al., 1991; Sissons, 1997; Filoche et al., 2007; Filoche et al., 2008; Leite, 2009; Van De Sande et al., 2011; Zaura et al., 2011) sendo que os estudos para verificação da adesão e formação de biofilmes em titânio relacionado à doença peri-implantite são escassos (Stefenon, 2012).

No presente trabalho foram utilizados 160 discos de titânio cp de grau 4, com diferentes topografias de superfície, períodos de crescimento de biofilmes e condições de multiplicação em “boca artificial”. Dessa forma, pode-se observar a adesão, concentração e biomassa de microrganismos em diferentes tempos e em diferentes topografias de Ti cp. A opção pela coleta de saliva de pacientes periodontais originou-se de estudos que demonstraram que a microbiota presente na peri-implantite é semelhante a da doença periodontal, bem como, sua patogênese.

Já foi relatado que a formação inicial do biofilme pode ser influenciada por diferentes superfícies de implantes. A adesão de microrganismos a implantes dentários parece ser diretamente proporcional à rugosidade de sua superfície (Newman, 1974; Wise & Dykema, 1975; Rimondini et al., 1997; Esposito et al., 1998; Kawai et al., 2000; Auschill et al., 2001; Quirynen et al., 2002; Auschill et al., 2002; Konishi et al., 2003). Mioralli (2009) e Teughels et al. (2006) mostraram que superfícies rugosas acumulam e retêm maior quantidade de placa e desenvolvem uma placa mais madura, caracterizada pelo aumento de colônias, organismos móveis e espiroquetas.

Keller et al. (1990); Ong et al. (1997) e Klokkevold et al. (1997), com o objetivo de maximizar a quantidade e qualidade da interface osso-implante, relataram que inúmeras alterações da superfície têm sido propostas, na sua maioria baseadas na teoria de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada mediante alteração da topografia ou rugosidade do implante.

Neste contexto foi observado após visualização em MEV que os discos de Ti cp J e JA mostraram topografia texturizada. As diferentes

superfícies apresentaram-se com topografias e rugosidades variadas, no entanto, as superfícies controle (L) e com ataque ácido nítrico (A) se mostraram visualmente semelhantes (Figuras 3 e 4).

Os grupos que sofreram o jateamento de  $Al_2O_3$  (J) e (JA) apresentaram superfícies menos organizadas, caracterizadas por crateras, fossas, sulcos e depressões irregulares se comparados à superfície controle (L) (Figuras 5 e 6).

A partir da metodologia empregada, os dados obtidos permitem concluir que: os resultados biológicos foram influenciados pela rugosidade superficial dos tratamentos nas primeiras 24 horas de observação; a adesão bacteriana nas superfícies controle e com ataque ácido foi menor nas primeiras 48 horas do experimento.

## REFERÊNCIAS

- Albrektsson, T. (1997) The response of bone to titanium implants. *Critical Reviews in Biocompatibility* **1**: 53-84.
- Auschill, T. M., Artweiler, N. B., Netuschil, L., Brex, M., Reich E., Sculean A. (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology* **46**: 471-6.
- Auschill, T. M., Artweiler, N. B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A., Netuschil, L. (2002) The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *European Journal of Oral Sciences* **110**: 48-53.
- Bjerkan, G., Witsø, E., Bergh, K. (2009) Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthopaedica* **80**: 245-50.



- Black, J. G. (1999) *Microbiology principles and explorations*, 4th ed., p. 786. Wiley, New York.
- Bollen, C. M., Papaioanno, W., Van Eldere, J., Schepers, E., Quirynen, M., Van Steenberghe, M. D. (1996) The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research* **7**: 201-11.
- Bränemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Linstrom, J., Hallén, O., Ohmen, A. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Supplementum* **16**: 1-132.
- Bränemark, P. I. (1986) Tissue-Integrated Protheses. *Quintessence Publishing Company*: 99-116.
- Bunetel, L., Guérin, J., Agnani, G., Piel, S., Pinsard, H., Corbel, J.C., Bonnaure-Mallet, M. (2001) In vitro study of the effect of titanium on *Porphyromonas gingivalis* in the presence of metronidazole and spiramycin. *Biomaterials* **22**: 3067-72.
- Bürgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G., Gosau, M. (2010) In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 156-64.
- Carvalho, B. M., Pellizer, E. P., Moraes, S. L. D., Falcón-Antenucci, R. M., Ferreira Júnior, J. S. (2009) Tratamentos de superfície nos implantes dentários. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial* **9**: 123.
- Castilho, G. A. A., Martins, M. D., Macedo, A. A. (2006) Surface characterization of titanium based dental implant. *Brazilian Journal of Physic.*
- Drake, D. R., Paul, J., Keller, J. C. (1999) Primary bacterial colonization of implant surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 226-32.

Elagli, K., Neut, C., Romond, C., Hildebrand, H. F. (1992) In vitro effects of titanium power on oral bacteria. *Biomaterials* **13**.

Elias, C. N., Lima, J. H. C., Santos, M. V. (2008) Modificações nas superfícies dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica. *Revista Implant News* **5**: 467-76.

Elias, C. N., Mattos, F. R. (2009) Tratamentos das superfícies dos implantes para melhorar a qualidade e a osseointegração. In: Osseointegração: 20 Anos da Experiência Brasileira, 2009, São Paulo. *Visão contemporânea da implantodontia*. São Paulo: Quintessence: 1-19.

Elter, C., Heuer, W., Demling, A., Hannig, M., Heidenblut, T., Bach, F. W., Stiesch-Scholz, M. (2008) Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 327-34.

Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U., Thomsen, P. (1998) Biological factors contributing of failures of osseointegrated oral implants. (I) success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Sciences* **106**: 527-51.

Filoche, S. K., Coleman, M. J., Angker, L., Sissons, C. H. (2007a) A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **69**: 489-96.

Filoche, S. K., Soma, K. J., Sissons, C. H. (2007b) Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiology and Immunology* **22**: 73-9.

Filoche, S. K., Soma, K. J., Van Bekkum, M., Sissons, C. H. (2008) Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **54**: 27-36.

Fröjd, V., Linderbäck, P., Wennerberg, A., Paz, L. C., Svensäter, G., Davies, J. R. (2011) Effect of nanoporous TiO<sub>2</sub> coating and anodized Ca<sub>2+</sub> modification of titanium surfaces on early microbial biofilm formation. *BMC Oral Health* **11**: 8.

Gonçalves, F., Zanetti, L. Z., Zanetti, R. V., Ramalho, S. A. (2009) Estudo in vitro do laser de diodo 980 nm na desinfecção de implantes. *Revista Gaúcha de Odontologia* **57**: 395-9.

Grössner-Scheiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Döfer, C., Wenderoth, D. F., Ott, S. J. (2009) Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 817-26.

Jardim Jr., E. G., Gaetti-Jardim, E. C., Oliveira, A. C., Segundo, A. S., Oliveira, S. R. (2006) Características da topografia superficial e de contaminação microbiana de implantes Sin® desenvolvidos para pesquisa. *Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics* **1**: 25-9.

Kawai, K., Urano, M., Ebisu, S. (2000) Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *Journal of Prosthetic Dentistry* **83**: 664-7.

Keller, J. C., Draughn, R. A., Wightman, J. P., Dougherty, W. J., Meletiou, S. D. 1990 Characterization of sterilized CP titanium implant surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **5**: 360-7.

Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M., Caputo, A. (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 442-7.

Konishi, N., Torii, Y., Kurosaki, A., Takatsuka, T., Itota, T., Yoshiyama, M. (2003) Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**: 790-5.

Leite, F. H. V. S. (2009) *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas.

Leonhardt, A., Dahlen, G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. (1995) *European Journal of Oral Sciences* **103**: 382-7.

Mabboux, F., Ponsonnet, L., Morrier, L., Jaffrezie, N., Barsotti, O. (2004) Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant material – an in vivo study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **39**: 199-205.

Mioralli, M. (2009) *Aderência bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio comercialmente puro de uso odontológico*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo (USP), São Carlos.

Newman, H. N. (1974) Diet, attrition, plaque and dental disease. *Brazilian Dental Journal* **136**: 491-7.

Ong, J. L., Carnes, D. L., Cardenas, H. L., Cavin, R. (1997) Surface roughness of titanium on bone morphometric protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dentistry* **6**: 19-24.

Pier-Francesco, A., Adams, R. J., Waters, M. G. J., Williams, D. W. (2006) Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 633-7.

Pongnarisorn, N. J., Gemmell, E., Tan, A. E. S., Henry, P. J., Marshall, R. I., Seymour, G. J. (2007) Inflammation associated with implants with different surface types. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 114-25.

Pye, A. D., Lockhart, D. E. A., Dawson, M. P., Murray, C. A., Smith, A. J. (2009) A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection* **72**: 104-10.

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

Rimondini, L. (1997) The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *Journal of Periodontology* **68**: 556-62.

Romeiro, R. L., Pereira, C., Silva, A. V., Bertramel, L. A. Jorge, A. O. C. (2010) Aderência de microrganismos em implantes dentários de superfície lisa ou tratada. *Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics* **5**: 25-9.

Rosenberg, E. S. (2004) A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally healthy patients: a clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 873-9.

Schwarz, F., Sculean, A., Wieland, M., Horn, N., Nuesry, E., Bube, C., Becker, J. (2007) Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* **11**: 333-8.

Shibli, J. A., Melo, L., Ferrari, D. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Feres, M. (2008) Composition of supra and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 975-82.

Sissons, C. H., Cutress, T. W., Hoffman, M. P., Wakefield, J. S. J. (1991) A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque grow, metabolism, pH, and mineralization. *Journal of Dental Research* **70**: 1409-16.

Stefenon, L. 2012. *Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo.

Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A., Hämmerle, C. H. F. (2009) Biofilm on dental implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 616-26.

Sykaras, N., Iacopino, A. M., Marker, V. A., Triplett, R. G., Woody, R. D. (2000) Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **15**: 675-90.

Teughels, W., Assche, N. V., Sliepen, I., Quirynen, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 68-81.

Van De Sande, F. H., Azevedo, M. S., Lund, R. G., Huysmans, M. C. D. N. J. M., Cenci M. S. (2011) An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* **27**: 1057-63.

Wise, M. D., Dykema, R. W. (1975) The plaque-retaining capacity of four dental materials. *Journal of Prosthetic Dentistry* **33**: 178-90.

Wong, L., Sissons, C. H. (2001) A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grow in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* **46**: 477-86.

Zaura, E., Buijjs, M. J., Hoogenkamp, M. A., Ciric, L., Papetti, A., Signoretto, C., Stauder, M., Lingstrom, P., Pratten, J., Spratt, D. A., Wilson, M. (2011) The effects of fractions from Shiitake Mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**:1-10.

## TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da rugosidade em três pontos dos discos de Ti cp nas diferentes topografias por rugosímetro óptico (Surr-Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ $\lambda_c$  e  $\lambda_c$  0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento ( $R_a$ ) dados em  $\mu\text{m}$ .

SUPERFÍCIES DE Ti cp	RUGOSIDADE TRÊS PONTOS			RUGOSIDADE MÉDIA ( $R_a$ )
L	0,196	0,256	0,191	0,214
J	0,632	0,583	0,658	0,624
A	0,316	0,313	0,335	0,321
JA	0,538	0,493	0,499	0,510

Tabela 2 - Comparações das médias (UFC/mg) nos diferentes níveis do grupo X o fator tempo (h) pelo método Student-Newman-Keuls.

TEMPO	L	J	A	JÁ
12	7,348 AB	7,622 C	7,241 A	7,477 BC
24	8,153 AB	8,309 B	8,103 A	8,255 AB
48	8,468 A	8,619 AB	8,623 AB	8,728 B
168	8,941 NS	9,014 NS	8,878 NS	8,984 NS

*NS: não significativo. Médias seguidas pela letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste Student-Newman-Keuls (5% de significância estatística ou  $p \leq 0,05\%$ ).*

## FIGURAS

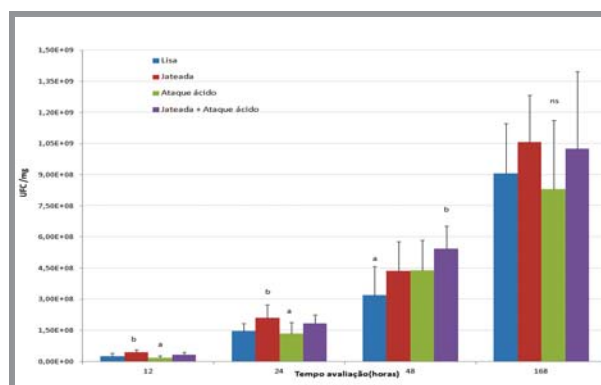


Figura 1 – Disposição das médias e desvios padrões dos grupos x tempos na adesão e formação de biofilme pela técnica do microcosmo ( $\log 10^{-7}$  UFC/mg).

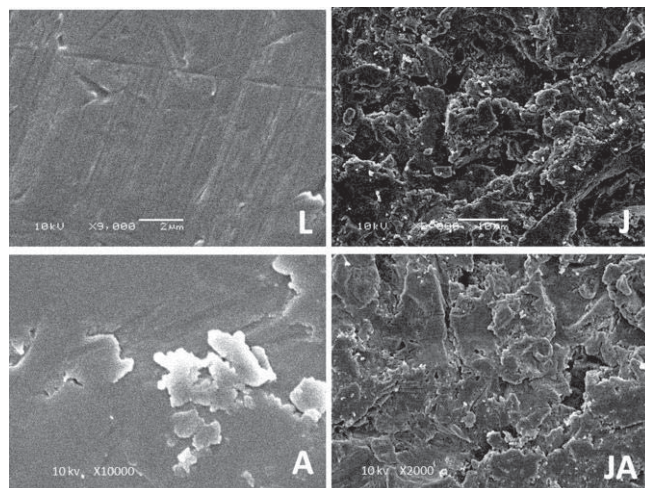


Figura 3 – Fotomicrografia mostrando os diferentes tratamentos de superfície de Ti cp em um aumento de 10000X anterior à técnica do microcosmo.



## **ANEXOS**

**ANEXO 1 – Clinical Oral Implants: Diretrizes para autores traduzidas (quanto ao formato e à estrutura do manuscrito)**



**Diretrizes para Autores**

**5. Formato e estrutura do manuscrito**

Artigos que excedam 10 páginas publicadas estão sujeitas a uma taxa de 160 dólares por página adicional. Uma página publicada equivale aproximadamente a 5.500 caracteres (excluindo figuras e tabelas).

**5.1. Formato**

**Idioma:** O idioma de publicação é o Inglês. Autores para quem o Inglês é a segunda língua podem optar por ter seu manuscrito editado profissionalmente por uma pessoa falante de Inglês antes da apresentação para garantir que o Inglês é de alta qualidade.

**Abreviaturas, símbolos e Nomenclatura:** O símbolo % é para ser usado para por cento; h para hora; min, por minuto; e s por segundo.

In vitro, in vivo, in situ e outras expressões latinas são para ser em itálico.

Use somente abreviaturas padrão.

Não usar algarismos romanos no texto.

Em decimais, será usado um ponto, e não uma vírgula.

Evite abreviações no título.

A expressão/a palavra por extenso deve preceder a abreviatura em seu primeiro uso no texto, a menos que seja uma unidade padrão de medida.

**Nomes científicos:** os nomes próprios de bactérias devem ser binominais e devem ser individualmente sublinhados no texto datilografado. O nome completo adequado (por exemplo, Streptococcus sanguis) deve ser grafado quando da primeira referência. O nome genérico pode ser abreviado em seguida com a primeira letra do gênero (por exemplo, S. sanguis).

## 5.2. Estrutura

Todos os manuscritos submetidos a implantes de Pesquisa Clínica Oral devem incluir Página de Título, Texto, Abstract principal e Agradecimentos, tabelas, figuras e legendas, conforme apropriado.

**Página título:** deve conter o título do artigo, nome completo do (s) autores (não mais do que 6) e filiação institucional (s), um título sintético não superior a 60 letras e espaços, bem como o nome, telefone e números de fax, e-mail e endereço completo do autor responsável pela correspondência. O autor deve listar as palavras-chave adequadas para fins de indexação.

**Resumo:** não deve exceder 250 palavras. Ele deve ser estruturado em: objetivos, materiais e métodos, resultados, conclusões, e nenhuma outra informação.

**Texto principal do artigo original de pesquisa** deve incluir Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão.

**Introdução:** Resumir os fundamentos e objetivos do estudo, dando apenas referências estritamente pertinentes. Deve constar claramente a hipótese de trabalho.

**Material e Métodos:** devem ser apresentados em detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente. Indique os métodos estatísticos utilizados, se aplicável.

**Resultados:** Apresentar os resultados em uma sequência lógica no texto, podendo recorrer a tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações. As observações importantes devem ser enfatizadas.

**Discussão:** Resumir os resultados sem repetir em detalhes os dados fornecidos na seção Resultados. Relacionar suas observações a outros estudos relevantes e apontar as implicações dos achados e suas limitações. Cite outros estudos relevantes.

**Agradecimentos:** Reconhecer apenas as pessoas que fizeram contribuições substanciais para o estudo. Os autores são responsáveis pela obtenção de autorização por escrito de todos reconhecidos nessa

seção, porque os leitores podem inferir seu endosso quanto aos dados e conclusões. Fontes de apoio financeiro devem ser reconhecidas.

### 5.3. Referências

As referências devem citar o último nome (s) do (s) autor e o ano de publicação (Black & Miller, 1988). Três ou mais autores devem sempre ser referidos como, por exemplo, (Fox et al., 1977).

A lista de referências deve ser dada no final do trabalho e deve seguir as recomendações em:

*Unidades, símbolos e abreviaturas*: um guia para editores biológicos e médicos e autores (1988), p. 52, Londres: The Royal Society of Medicine.

a) a lista das referências deve ser alfabética pelo sobrenome do autor.

b) A ordem dos itens em cada referência deve ser:

(I) para referências revista:

nome do (s) autor (es), ano, título do artigo, título do periódico, número do volume, primeira e última página números.

(ii) para referências de livros:

nome do (s) autor (es), ano, título do livro, número da edição, volume, capítulo e / ou página, cidade de publicação, editora.

c) Os nomes dos autores devem ser organizados assim: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til T.C.,

Os nomes dos autores quando repetidas na próxima referência são sempre escritos por inteiro.

d) O ano de publicação deve estar entre parênteses: (1966).

e) O título do trabalho deve ser incluído, sem aspas.

f) O título da revista deve ser escrito por extenso, em itálico, e seguido por número de volume em negrito, e os números de página.

Exemplos:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **4**: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

#### 5.4. Tabelas, Figuras e legendas

Tabelas: As tabelas devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos. Digite cada tabela em folha separada, com títulos, tornando-os autoexplicativo. Atenção especial deve ser dada às proporções da página impressa.

Figuras: Todas as figuras devem esclarecer o texto e o seu número deverá ser mantido a um mínimo. Cada figura deve ter uma legenda.

Artigos normalmente não devem exceder 10 páginas impressas, incluindo ilustrações e referências. Páginas adicionais serão cobradas para o autor (s) a uma taxa de 160 dólares por página.

## MICROCOSM BIOFILM FORMATION ON TITANIUM SURFACES<sup>5</sup>

### ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to evaluate biofilm formation on different surfaces of commercially pure titanium (CP Ti) grade 4 at 12, 24, 48 and 168 h by the microcosm technique and scanning electron microscopy (SEM). Materials and methods: Biofilms were formed in microwell plates on CP Ti discs (N = 160), using the saliva (microcosm) of a donor as inoculum with 10 discs for each inoculum (n = 10). There were 40 specimens for each type of surface, namely: smooth (control - S), sand-blasted with aluminum oxide (B), etched with nitric acid (E), and sand-blasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> etched with nitric acid (BE). One disc for each condition (4) was evaluated as to its topography by SEM and mean roughness (Ra) prior to inoculation, and 16 were evaluated by SEM after the microcosm technique, totaling 20

---

<sup>5</sup> Claudio Zeferino Dal'Agnol – Master's student in Clinical Dentistry at Universidade de Passo Fundo/RS.

Leticia Stefenon- Master in Oral Pathology at São Leopoldo Mandic Dental School – Campinas/SP.

Françoise Helene Van De Sande – PhD student at Universidade Federal de Pelotas/RS.

Álvaro Della Bona – PhD and Professor at the Dental School of Universidade de Passo Fundo/RS.

Luciana Ruschel dos Santos – PhD and Professor in the Veterinary Medicine Program of Universidade de Passo Fundo/RS.

Maximiliano Sérgio Cenci – PhD at the Department of Dentistry and Cariology of the Dental School of Universidade Federal de Pelotas/RS.

Correspondence to:

Claudio Zeferino Dal'Agnol

specimens. Results: The data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's test for comparison of the means ( $p < 0.05$ ). There was statistical difference between S (25.34) and E (19.15) compared to B and BE (43.83 and 32.06) in the CFU/mg counts in the first 12 h, when biofilm formation was higher in B ( $Ra = 0.62 \mu\text{m}$ ) and BE ( $Ra = 0.51 \mu\text{m}$ ). Conclusions: It was observed that all surfaces exhibited microbial growth, regardless of the treatment they received.

Keywords: titanium, microcosm, biofilms, peri-implantitis.

## RESUMO

Os fatores de risco associados à peri-implantite estão relacionados à composição do biofilme ao redor do implante e a habilidade da bactéria aderir na superfície. O objetivo desse estudo foi avaliar a formação do biofilme sobre as diferentes superfícies de Ti cp grau 4, nos tempos de 12, 24, 48 e 168 horas pela técnica do microcosmo e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram formados biofilmes em placas de micropoços sobre discos de Ti cp (N=160), tendo como inóculo a saliva (microcosmos) de um doador sobre 10 discos para cada inóculo (n=10). Foram 40 espécimes para cada tipo de superfície, sendo elas: lisa (controle – L), jateadas com óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  – J), subtração por ataque com ácido nítrico (A) e por último jateadas com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  acrescidas de ataque com ácido nítrico (JA). Um disco de cada condição (4) foi avaliado previamente à inoculação quanto a sua topografia pela

MEV e rugosidade média ( $R_a$ ) e dezesseis foram avaliados pela MEV após a técnica do microcosmo totalizando 20 espécimes. Os dados obtidos foram analisados pelo teste análise de variância (ANOVA) de dois fatores e Tukey para comparação das médias ( $p < 0,05$ ). Houve diferença estatística entre a superfície controle (25,34) e A (19,15) em relação às J e JA (43,83 e 32,06) na contagem de UFC/mg nas primeiras 12 horas, onde a formação de biofilme foi maior em J ( $R_a = 0,62 \mu\text{m}$ ) e JA ( $R_a = 0,51 \mu\text{m}$ ). Observou-se que todas as superfícies possibilitaram crescimento microbiano, independentemente do tratamento recebido.

*Palavras-chave:* titânio, microcosmo, biofilmes, peri-implantite.

## INTRODUCTION

In Dentistry, titanium implants are used as the material of choice for a wide variety of cases, from the replacement of a single dental element to complete restorations (Mabboux et al., 2004; Píer-Francesco et al., 2006; Elter et al., 2008; Shibli et al., 2008; Pye et al., 2009). Titanium is indicated because of its excellent mechanical, physicochemical and biochemical properties, tissue tolerance, biocompatibility (Bunetel et al., 2001; Elias et al., 2008; Subramani et al., 2009), hardness, corrosion resistance and bone-like modulus of elasticity (Píer-Francesco et al., 2006).

The technological evolution of implants has enabled the development of models with different surface topographies (Carvalho et al., 2009), increasing the available area and allowing for osseointegration



(Bränemark et al., 1977; Bränemark, 1986). Changes in the topography and in the surface free energy of titanium can be made through surface treatment using abrasive particles and acid etching, among others (Rosenberg, 2004). However, although surface roughness allows for osseointegration, it may facilitate the accumulation of microbial species and lead to peri-implant infection, resulting in bone destruction and failure of restorations with this type of biomaterial (Pongnarisorn et al. 2007; Grössner-Schreiber et al., 2009; Gonçalves et al., 2009).

Human dental plaque is a complex biofilm with different concentrations of bacterial species in different environments and *in vivo* study is hindered due to its heterogeneity, available amount and limited access, in addition to ethical problems. Given these limitations, WONG and SISSONS (2001) developed an “artificial mouth” plaque culture system in order to investigate microcosm and to minimize the limitations of biofilm studies. Microcosm is defined as a microbiological entity that represents the natural *in vitro* dental plaque. This way, microcosm maintains the natural complexity of the oral biofilm, its biodiversity and its heterogeneous structure (Sissons *et al.*, 1997; Sissons *et al.*, 1991). The aim of this study was to check biofilm formation in different time periods on titanium surfaces submitted to different surface treatments using the microcosm technique and visualization under scanning electron microscopy.

## MATERIAL AND METHODS

The study protocol (no. 141/2012) was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Passo Fundo (UPF). A randomized *in vitro* study was performed, in which biofilms were allowed to form in microplates on titanium discs and in which saliva (microcosm) was used as inoculum. The saliva was collected from a nonsmoking donor with periodontal disease who had not taken antibiotics in the month before and who had abstained from oral hygiene for 24 hours. The selection parameters were periodontal pockets deeper than 4 mm with bleeding and/or suppuration at periodontal probing and with clinical insertion levels of approximately 7 mm. Biofilms were grown at 12, 24, 48 and 168 hours on 10 discs for each inoculum, totaling 40 specimens of each surface type (N=160). Of these, 20 specimens were selected for SEM before and after microbial contamination by the microcosm technique.

### Specimens

Titanium specimens were donated by Titanium Fix® - AS Technology Ltda (São José dos Campos, SP, Brazil) measuring 5mm in diameter and 3mm in thickness with surface treatments classified into smooth surface (S) or control group; sand-blasted with aluminum oxide (B); etched with nitric acid at 30% (E) and sand-blasted with aluminum oxide and etched with nitric acid at 30% (BE). The initial roughness of a disc in each condition was measured by an optical profilometer (Surr-

Corder SE1200 – Koxaka Lab, Tokyo, Japan), calibrated with V 200, H 25 mm/ $\lambda c$  and  $\lambda c$  0.25 mm, and the mean roughness ( $R_a$ ) was used for comparison of the surfaces. For each specimen, three measurements were performed on each side and in different directions to obtain the mean roughness (ABNT NBR ISO 4288).

### **Artificial saliva (DMM) preparation**

The artificial saliva or defined medium mucin (DMM) was obtained as proposed by Wong and Sissons (2001): porcine gastric mucin (2.5 g/L), urea (1.0 mmol/L), salts (in mmol/L (CaCl<sub>2</sub>, 1.0; MgCl<sub>2</sub>, 0.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; NaCl, 10.0; KCl, 15.0; NH<sub>4</sub>Cl, 2.0), 21 free amino acids, 17 vitamins, and growth factors. The medium contained amino acids for the protein/peptide equivalent (in mmol/L), whose concentrations are based on human saliva. The amino acids included alanine (1.95), arginine (1.30), asparagine (1.73), aspartic acid (1.52), cysteine (0.05), glutamic acid (5.41), glutamine (3.03), glycine (1.95), histidine (1.08), isoleucine (2.38), leucine (3.68), serine (3.46), threonine (1.08), tryptophan (0.43), tyrosine (2.17), valine (2.38), and casein (5.0).

### **Saliva collection and processing**

70 mL of saliva stimulated with parafilm (Parafilm “M”®, American National Can TM, Chicago, IL, USA) was collected from a donor with periodontal disease. The saliva was placed in a sterile graded collector and transported in a foam ice chest to the Laboratory of

Microbiology of Universidade Federal de Pelotas. Thereafter, the saliva was filtered in sterile glass wool and homogenized in a vortex mixer (Filoche et al., 2007a,b), an aliquot of which was used for bacterial quantification (CFU/mL).

### **Biofilm development and analysis**

400  $\mu$ L of the prepared saliva was inoculated onto the titanium specimens on microplates. After 60 minutes, the saliva was gently aspirated and 1.8 mL of artificial saliva was added to each microplate. The plates were incubated under anaerobic conditions (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and 10% H<sub>2</sub>) at 37°C for up to 168 hours and the plates were stirred on a daily basis and the supernatant was removed, the pH was measured (pH meter – Anolion PM608 Plus, São Paulo, SP) and the DMM was replaced. After 12, 24, 48 and 168 hours of incubation (Leonhardt and Dahlen, 1995; Schwarz et al., 2007), the discs were removed from the wells with sterile tweezers and the non-adherent cells were gently removed by washing with sterile saline (2 mL). After that, the discs were placed in tubes containing 1 mL of reduced transport fluid (RTF) and sonicated (Sonicador Vibra Cell – Sonics and Materials, Danbury, CT, USA) at 40 W and at a range of 5%, using six pulses of 9.9 s each. Thereafter, the suspensions were serially diluted to 10<sup>7</sup>, inoculated in duplicate on blood agar and incubated under anaerobic conditions (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>) at 37 °C for 96 h. The colony forming units were counted and the results were expressed in CFU/mg of biofilm specimen (dry weight) (Bürgers *et al.*, 2010).

## **Preparation of samples for scanning electron microscopy (SEM)**

The specimens were placed in 24-well microplates and immersed in 2.5% glutaraldehyde solution in phosphate buffer in a solution 20 times the volume of the specimen, sealed with adhesive tape and transported to the Center for Electron Microscopy of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for visualization under SEM in a JSM 6060 device, which operates with a voltage of 0.1 to 30 Kv. Twenty specimens were used, and one was randomly selected from each treatment and four were chosen after biofilm formation.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The roughness of the specimens and biofilm formation are shown in Tables 1 and 2 while biofilm formation on different surfaces visualized under SEM are shown in Figure 1. Biofilm formation was larger ( $p>0.03$ ) on the surface sand-blasted with  $Al_2O_3$  at 12 hours; there was statistical difference ( $p=0.02$ ) within 24 hours between the sand-blasted surface (8.30 CFU/mg) and the surfaces etched with nitric acid (8.10 CFU/mg). At 48 hours, biofilm formation was larger on the sand-blasted surfaces etched with nitric acid ( $p\leq 0.01$ ), while at 168 hours, there was no statistical difference in biofilm formation between the analyzed groups ( $p>0.05$ ).

It has been documented in the scientific literature that one of the difficulties associated with the presence of oral restorative materials, such as dental implants, concerns bacterial biofilm formation on these surfaces and possible complications related to peri-implantitis (Quirynen and Listgarten, 1990; Yoshinari *et al.*, 2001; Pier-Francesco *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2009; Grössner-Schreiber *et al.*, 2009; Subramani *et al.*, 2009; Busscher *et al.*, 2010; Soukos and Goodson, 2011). The microcosm technique or “artificial mouth” developed by Wong and Sissons (2001) has already been explored for the assessment of antimicrobial substances and in the field of cariology (Sissons *et al.*, 1991; Sissons *et al.*, 1997; Filoche *et al.*, 2007a,b; Filoche *et al.*, 2008; Leite, 2009; Van De Sande *et al.*, 2011; Zaura *et al.*, 2011). However, few studies exist on adhesion and biofilm formation on titanium surfaces and on peri-implantitis (Stefenon, 2012).

In the present paper, we used microcosm because it simulates the oral cavity as to the multi-strain behavior of the bacteria found in human saliva, especially in periodontal patients. Another advantage of using microcosm is the feasibility of biofilm study on a large scale through the use of artificial saliva (DMM) and appropriate nutritional conditions for biofilm growth. By using titanium discs with different topographies, biofilm growth periods, and multiplication conditions in an “artificial mouth,” it is possible to observe the adhesion, concentration and biomass of microorganisms in different time periods and on different surfaces.

The decision to collect saliva from periodontal patients was based on studies that demonstrated that the microbiota in peri-implantitis is similar to the one found in periodontal disease, as well as its pathogenesis (Heydenrijk *et al.*, 2002). This correlation between biofilm

accumulation and presence of periodontal pathogens at the level of bone loss and around the peri-implant tissue was investigated (Rams and Link, 1983; Rams *et al.*, 1984; Mombelli *et al.*, 1987; Gatewood *et al.*, 1993; Quirynen *et al.*, 2002; Heydenrijk *et al.*, 2002; Fürst *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). However, peri-implantitis does not occur without previous adhesion and subsequent microbial colonization. Adhesion depends on the type of microorganism, on the physicochemical properties of the implant surface and on the presence of oral fluids between the microorganisms and the surfaces (Curtiss & Cooper, 1986; Quirynen and Bollen, 1995; Nassar *et al.*, 1995; Busscher and Van der Mei, 1997; Jorge, 2007) as well as on the control procedures associated with oral hygiene (Newman, 1974; Quirynen & Listgarten, 1990).

Initial biofilm formation may be influenced by the implant surface and the adhesion of microorganisms seems to be directly proportional to surface roughness (Newman, 1974; Wise and Dykema, 1975; Rimondini, 1997; Esposito *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2000; Auschill *et al.*, 2001; Quirynen *et al.*, 2002; Auschill *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2003). Other studies confirm the close relationship between surface roughness and the efficiency of osseointegration (Klokkevold *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1997; Sykaras *et al.*, 2000; Fröjd *et al.*, 2011). Thus, the rougher the surface, the larger the accumulation of biofilm (Rimondini, 1997; Kawai *et al.*, 2000) and the greater the chances of failure due to the interplay between these factors.

This issue was investigated by Teughels *et al.* (2006) and Mioralli (2009), who reported on rough surfaces with larger accumulation and plaque retention and development of more mature plaques, characterized by the increase in the number of colonies, mobile organisms and

spirochetes. Hallab *et al.* (2001) tested the energy components on the surface of several materials to verify the strength of cell adhesion and demonstrated that the surface free energy is more important than roughness for induction of adhesion and cell proliferation.

In the present study, the mean roughness of the surfaces was as follows: smooth (S)  $R_a=0.214 \mu\text{m}$ ; sand-blasted with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (A)  $R_a=0.624 \mu\text{m}$ ; etched with nitric acid (E)  $R_a=0.321 \mu\text{m}$  and sand-blasted and etched with nitric acid (BE)  $R_a=0.510 \mu\text{m}$ . With regard to mean roughness and microbial growth (Tables 1 and 2), growth remained constant throughout the study period (12, 24, 48 and 168 hours). Nonetheless, at 12 hours, smooth surfaces (S) and acid-etched surfaces (E) yielded the lowest CFUs (7.348 and 7.241, respectively), which were statistically significant ( $p<0.05$ ), a fact that can be attributed to the initial adhesion and biofilm formation limited to less rough surfaces, as mentioned by Píer-Francesco *et al.*, 2006. The authors evaluated the *in vitro* bacterial adhesion of *Porphyromonas gengivalis* on titanium discs and the relationship between roughness and free surface energy and observed that a surface with  $R_a=0.15 \mu\text{m}$ , classified as very smooth, showed significant decrease in bacterial adhesion, which did not occur on rough ( $R_a=0.22 \mu\text{m}$ ) or very rough ( $R_a=0.45 \mu\text{m}$ ) surfaces. Therefore, they concluded that the adhesion of *P. gengivalis* to titanium was inhibited on surfaces whose roughness is smaller than that often seen in implants ( $R_a=0.35 \mu\text{m}$ ).

In the present study, biofilm formation was smaller at 12 and 24 hours on less rough surfaces (smooth and acid-etched surfaces), in line with the findings of Bürgers *et al.* (2010), who used sand-blasted titanium discs etched with nitric acid to assess the *in vitro* bacterial



adhesion of *Streptococcus sanguinis*, confirming that the initial bacterial adhesion on titanium surfaces is primarily influenced by surface roughness.

At the end of the experiment (168 hours), there was no statistical significance ( $p > 0.05$ ) between CFUs on the analyzed surfaces. Note that the control surface ( $R_a = 0.21 \mu\text{m}$ ) showed a threefold decrease in roughness compared to the sand-blasted surface ( $R_a = 0.624 \mu\text{m}$ ) and, although it is considered to be a smooth surface, it allowed for biofilm formation, being statistically identical to the other treatments. The relationship between surface treatment with nitric acid etching and the lower amount of microorganisms in the first two assessment periods (12 and 24 hours) may be associated with a decrease in roughness if compared to the other treatments due to the acid etching process or to a possible antimicrobial property of the nitric acid used in the experiment. Keller *et al.* (1990), Klokkevold *et al.* (1997) and Ong *et al.* (1997), aiming at maximizing the quantity and quality of the bone-implant interface, reported that several changes in surfaces have been proposed, most of them based on the assumption that a better and quicker osseointegration may be achieved by changing the topography or roughness of the implant.

Since the  $R_a$  values found in the present study were different between the groups, biological results may not have been influenced by roughness according to the experimental periods assessed (48 to 168 hours) but rather by factors such as irregular surface topography, surface contamination by aluminum (Al) particles or possible changes in the surface energy of the metal by the treatments used. The microcosm technique showed that all surfaces allowed for microbial growth,

regardless of the treatment used, and that biofilm formation was smaller within the first 12 hours of assessment on less rough surfaces, corroborating that initial adhesion is directly proportional to surface roughness.

## REFERENCES

- Auschill, T. M., Artweiler, N. B., Netuschil, L., Brex, M., Reich E., Sculean A. (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology* **46**: 471-6.
- Auschill, T. M., Artweiler, N. B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A., Netuschil, L. (2002) The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *European Journal of Oral Sciences* **110**: 48-53.
- Bränemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Linström, J., Hallén, O., Ohmen, A. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Supplementum* **16**: 1-132.
- Bränemark, P. I. (1986) Tissue-Integrated Protheses. *Quintessence Publishing Company*: 99-116.
- Bunetel, L., Guérin, J., Agnani, G., Piel, S., Pinsard, H., Corbel, J.C., Bonnaure-Mallet, M. (2001) In vitro study of the effect of titanium on *Porphyromonas gingivalis* in the presence of metronidazole and spiramycin. *Biomaterials* **22**: 3067-72.
- Bürgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G., Gosau, M. (2010) In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 156-64.

Busscher, H. J.; Van Der Mei, H. C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*, v. 11, n. 1, p. 24-32, 1997.

Busscher, H. J.; Rinastiti, M.; Siswomihardjo, W.; Van Der Mei, H. C. Biofilm formation on dental restorative and implant material. *J Dent Res*, v. 87, n. 2, p. 657-65, 2010.

Carvalho, B. M., Pellizer, E. P., Moraes, S. L. D., Falcón-Antenucci, R. M., Ferreira Júnior, J. S. (2009) Tratamentos de superfície nos implantes dentários. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial* **9**: 123.

Curtiss, R., 1986. Cooper, L. F. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent*, v. 84, p. 522-34, 2000.

Elias, C. N., Lima, J. H. C., Santos, M. V. (2008) Modificações nas superfícies dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica. *Revista Implant News* **5**: 467-76.

Elter, C., Heuer, W., Demling, A., Hannig, M., Heidenblut, T., Bach, F. W., Stiesch-Scholz, M. (2008) Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 327-34.

Esposito, M., Hirsch, J. M., Lekholm, U., Thomsen, P. (1998) Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I) success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Sciences* **106**: 527-51.

Filoche, S. K., Coleman, M. J., Angker, L., Sissons, C. H. (2007a) A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **69**: 489-96.

Filoche, S. K., Soma, K. J., Van Bekkum, M., Sissons, C. H. (2008) Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **54**: 27-36.

Fürst, M. M.; Salvi, G. E.; Lang, N. P.; Persson, G. R. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*, v. 18, n. 4, p. 501-8, 2007.

Fröjd, V., Linderbäck, P., Wennerberg, A., Paz, L. C., Svensäter, G., Davies, J. R. (2011) Effect of nanoporous TiO<sub>2</sub> coating and anodized Ca<sub>2+</sub> modification of titanium surfaces on early microbial biofilm formation. *BMC Oral Health* **11**: 8.

Gatewood, R. R.; Cobb, C. M.; Killoy, W. J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. *Clin Oral Implants Res*, v. 4, p. 53-64, 1993.

Gonçalves, F., Zanetti, L. Z., Zanetti, R. V., Ramalho, S. A. (2009) Estudo in vitro do laser de diodo 980 nm na desinfecção de implantes. *Revista Gaúcha de Odontologia* **57**: 395-9.

Grössner-Scheiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Döfer, C., Wenderoth, D. F., Ott, S. J. (2009) Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clinical Oral Implants Research* **20**: 817-26.

Hallab, A. P.; Short, R. D.; Johns, R.; Schwach, G. The surface analysis of implant materials. The surface composition of a titanium dental implant material. *Clin Oral Implants Res*, v. 4, n. 3, p. 144-50, 2001.

Heydenrijk, K.; Meijer, H. J. A.; Van Der Reijden, W. A.; Raghoobar, G. M.; Vissink, A.; Stegenga, B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 17, n. 6, p. 829-38, 2002.

Jorge, A. O. C. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos, 2007.

Kawai, K., Urano, M., Ebisu, S. (2000) Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *Journal of Prosthetic Dentistry* **83**: 664-7.

Keller, J. C., Draughn, R. A., Wightman, J. P., Dougherty, W. J., Meletiou, S. D. 1990 Characterization of sterilized CP titanium implant

surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **5**: 360-7.

Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M., Caputo, A. (1997) Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research* **8**: 442-7.

Konishi, N., Torii, Y., Kurosaki, A., Takatsuka, T., Itota, T., Yoshiyama, M. (2003) Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**: 790-5.

Leite, F. H. V. S. (2009) *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas.

Leonhardt, A., Dahlen, G. Effect of titanium on selected oral bacterial species in vitro. (1995) *European Journal of Oral Sciences* **103**: 382-7.

Mabboux, F., Ponsonnet, L., Morrier, L., Jaffrezie, N., Barsotti, O. (2004) Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant material – an in vivo study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **39**: 199-205.

Mombelli, A.; Van Oosten, M. A. C.; Schürch, E.; Lang, N. P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*, v. 2, p. 145-51, 1987.

Mioralli, M. (2009) *Aderência bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio comercialmente puro de uso odontológico*. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo (USP), São Carlos.

Nassar, U.; Meyer, A. E.; Ogle, R. E.; Baier, R. E. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. *Periodontol* **2000**, n. 8, p. 114-24, 1995.

Newman, H. N. (1974) Diet, attrition, plaque and dental disease. *Brazilian Dental Journal* **13**: 491-7.

Ong, J. L., Carnes, D. L., Cardenas, H. L., Cavin, R. (1997) Surface roughness of titanium on bone morphometric protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dentistry* **6**: 19-24.

Pier-Francesco, A., Adams, R. J., Waters, M. G. J., Williams, D. W. (2006) Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 633-7.

Pongnarisorn, N. J., Gemmell, E., Tan, A. E. S., Henry, P. J., Marshall, R. I., Seymour, G. J. (2007) Inflammation associated with implants with different surface types. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 114-25.

Pye, A. D., Lockhart, D. E. A., Dawson, M. P., Murray, C. A., Smith, A. J. (2009) A review of dental implants and infection. *Journal of Hospital Infection* **72**: 104-10.

Quirynen, M.; Bollen, C. M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol*, v. 22, n. 1, p. 1-14, 1995.

Quirynen, M.; Listgarten, M. A. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res*, v. 1, p. 8-12, 1990.

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

Rams, T. E.; Link, C. C. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *J Oral Implantol*, v. 11, p. 93-100, 1983.

Rams, T. E.; Roberts, T. W.; Tatum, H.; Keyes, P. H. The subgingival microbial flora associates with human dental implants. *J Prosthetic Dent*, v. 51, p. 529-34, 1984.

Rimondini, L. (1997) The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *Journal of Periodontology* **68**: 556-62.

Rosenberg, E. S. (2004) A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally healthy patients: a clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **19**: 873-9.

Silva, G. L. M.; Ferreira, S. D.; Zenóbio, E. G.; Soares, R. V.; Costa, F. O. Mucosite peri-implantar e peri-implantite: Prevalência e indicadores de risco em indivíduos parcialmente edêntulos. *R Periodontia*, v. 17, n. 3, 2007.

Schwarz, F., Sculean, A., Wieland, M., Horn, N., Nuesry, E., Bube, C., Becker, J. (2007) Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* **11**: 333-8.

Shibli, J. A., Melo, L., Ferrari, D. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Feres, M. (2008) Composition of supra and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 975-82.

Sissons, C. H., Cutress, T. W., Hoffman, M. P., Wakefield, J. S. J. (1991) A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *Journal of Dental Research* **70**: 1409-16.

Sissons, C. H.; Cutress, T. W.; Hoffman, M. P.; Wakefield, J. S. J. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dental Res*, v. 11, n. 1, p. 110-26, 1997.

Soukos, N. S.; Goodson, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*, v. 55, p. 143-66, 2011.

Stefenon, L. 2012. *Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo.

Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A., Hämmerle, C. H. F. (2009) Biofilm on dental implants: a review of the literature. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 616-26.

Sykaras, N., Iacopino, A. M., Marker, V. A., Triplett, R. G., Woody, R. D. (2000) Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **15**: 675-90.

Teughels, W., Assche, N. V., Sliepen, I., Quirynen, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 68-81.

Van De Sande, F. H., Azevedo, M. S., Lund, R. G., Huysmans, M. C. D. N. J. M., Cenci M. S. (2011) An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* **27**: 1057-63.

Wise, M. D., Dykema, R. W. (1975) The plaque-retaining capacity of four dental materials. *Journal of Prosthetic Dentistry* **33**: 178-90.

Wong, L., Sissons, C. H. (2001) A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* **46**: 477-86.

Yoshinari, M.; Oda, Y.; Kato, T.; Okuda, K.; Hirayama, A. Influence of surface modifications to titanium on bacterial activity in vitro. *Biomaterials*, v. 22, n. 14, p. 2043-8, 2001.

Zaura, E., Buijjs, M. J., Hoogenkamp, M. A., Ciric, L., Papetti, A., Signoretto, C., Stauder, M., Lingstrom, P., Pratten, J., Spratt, D. A., Wilson, M. (2011) The effects of fractions from Shiitake Mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**:1-10.



Table 1 – Mean roughness of titanium discs with different surface treatments.

Surface treatments	Roughness
Smooth	0.196
Sand-blasted	0.256
Acid-etched	0.191
Sand-blasted and acid-etched	0.214
	0.632
	0.583
	0.316
	0.335
	0.499
	0.510

Table 2 – Incubation period and biofilm formation (CFU/mg) on titanium discs with different surface treatments.

Hours	Smooth	Sand-blasted	Acid-etched	Sand-blasted and acid-etched
12	7.348 AB	7.622 C	7.241 A	7.477 BC
24	8.153 AB	8.309 B	8.103 A	8.255 AB
48	8.468 A	8.619 AB	8.623 AB	8.728 B
168	8.941 NS	9.014 NS	8.878 NS	8.984 NS

NS: not significant. Means followed by upper-case letters in the column do not differ between themselves on Student-Newman-Keuls test (statistical significance of 5% or  $p \leq 0.05\%$ ).

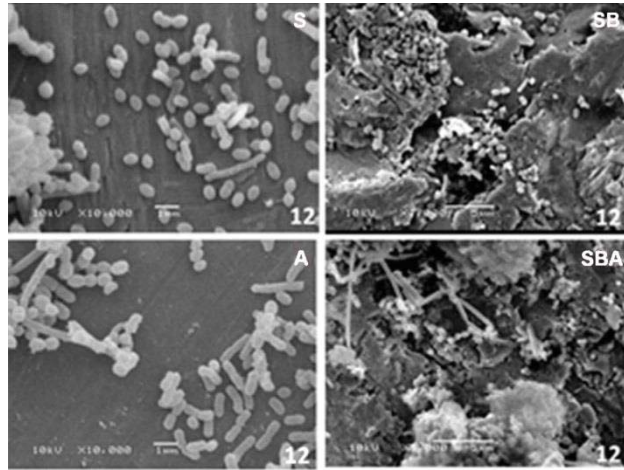


Figure 1 – Photomicrograph of smooth titanium surface (control – S), sand-blasted with aluminum oxide (SB), etched with nitric acid (A) and sand-blasted with aluminum oxide and etched with nitric acid (SBA) after 12 hours of biofilm formation by microcosm. 10 kv 10000X, 4000X and 5000X.

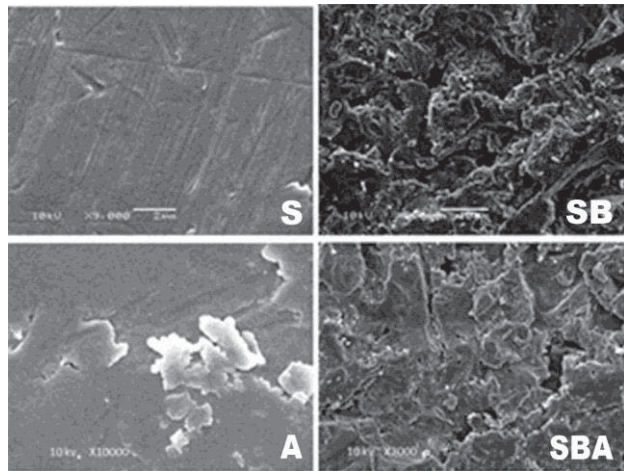


Figure 2 – Photomicrograph showing the different surface treatments of Ti cp in an increase of 2000X, 9000X and 10000X previous technical microcosm.