



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

MAYRA CARDOSO

**INFLUÊNCIA DA DEPOSIÇÃO DE FILMES DE CARBONO
TIPO DIAMANTE NA INFILTRAÇÃO BACTERIANA PELA
INTERFACE ENTRE IMPLANTES E PILARES PROTÉTICOS**

2013

MAYRA CARDOSO

**INFLUÊNCIA DA DEPOSIÇÃO DE FILMES DE CARBONO TIPO
DIAMANTE NA INFILTRAÇÃO BACTERIANA PELA INTERFACE
ENTRE IMPLANTES E PILARES PROTÉTICOS**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Adj. Lafayette Nogueira Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Argemiro Soares da Silva Sobrinho

São José dos Campos

2013

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

C179i Cardoso, Mayra
Influência da deposição de filmes de carbono tipo diamante na infiltração
bacteriana pela interface entre implantes e pilares protéticos / Mayra Cardoso. -
São José dos Campos : [s.n.], 2013.
122 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Lafayette Nogueira Junior

Co-orientador: Argemiro Soares da Silva Sobrinho.

1. Implantes dentários. 2. Infiltração. 3. Microbiologia. 4. Gases em plasma. 5.
Propriedades de superfície. I. Nogueira Junior, Lafayette. II. Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III.
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ
Estadual Paulista. V. Título

tD74

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 4 de junho de 2013.

Assinatura :

E-mail: mayracardoso.mc@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adjunto Lafayette Nogueira Junior (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adjunta Cristiane Yumi Koga-Ito

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Associado Luiz Carlos Santiago da Costa

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Marcos Massi

Instituto de Ciência e Tecnologia
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Nelson Luiz de Macedo

Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 18 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Mauricio e Maura, pois tudo que sou hoje é fruto do amor, da dedicação e da educação que deles recebi.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Mauricio e Maura, por me apoiarem sempre, por estarem ao meu lado em todos os momentos, e pelos valores e princípios que norteiam minha vida. Vocês são meus maiores exemplos!

Ao meu irmão Mauricio, por ser parte da linda família que formamos, e por cuidar tão bem dela enquanto eu não pude estar presente.

Ao Marcelo, meu amor, por ser companheiro, por suportar a distância e por me dar forças nos momentos de desânimo.

À minha tia Marly, por ser sempre tão amorosa e prestativa, e por unir toda a família.

Ao meu orientador, Prof. Lafayette Nogueira Junior, por me conduzir ao longo deste trabalho, pela amizade e pela confiança que depositou em mim desde o início.

Ao meu coorientador, Prof. Argemiro Soares da Silva Sobrinho, e ao Prof. Marcos Massi, por participarem ativamente deste trabalho, colaborando com seus conhecimentos na área de Física, sem os quais esta tese não seria possível.

À Profa. Cristiane Yumi Koga-Ito, pelo carinho e amizade, e por contribuir ativamente com este trabalho na área de Microbiologia. O mais empolgante deste trabalho foi sua multidisciplinaridade, e a oportunidade de conhecer áreas e pessoas diferentes, que foram fundamentais para o seu desenvolvimento e que me engrandeceram sobremaneira.

Ao Prof. Luiz Carlos Santiago da Costa, meu maior exemplo profissional dentro da Odontologia, e ao Prof. Daniel de Moraes Telles, que me ensinaram a ser mestre. Vocês foram meus maiores incentivadores para buscar um curso de Doutorado fora do Rio, e, ao final desta jornada, agradeço a vocês por ter vivido esta experiência tão enriquecedora.

Aos professores Nelson Luiz de Macedo e Rodrigo Máximo de Araújo, pelas correções importantes deste trabalho.

À UNESP – Univ Estadual Paulista, ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, onde fui acolhida com tanto carinho e onde adquiri experiência em pesquisa científica. Tenho muito orgulho em participar deste grupo.

Aos docentes desta instituição, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, e que hoje são responsáveis por uma parte muito importante da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Ivan Balducci, não só pela ajuda na análise estatística deste trabalho, mas por todos os nossos “encontros estatísticos”, nos quais eu aprendi muito e aprimorei meus conhecimentos de estatística.

À Profa. Márcia Carneiro Valera, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, e ao Prof. Marco Antonio Bottino, coordenador da Especialidade Prótese Dentária do referido programa, pela imensa dedicação à pós-graduação e pela ajuda material a este trabalho.

Ao Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA, onde fui muito bem recebida e onde desenvolvi toda a parte de deposição de filmes deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, onde realizei parte das análises para caracterização dos filmes de DLC.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À Conexão Sistemas de Prótese, pela doação dos implantes e componentes utilizados neste trabalho.

À Jorgiana Sangalli, minha grande amiga e companheira neste trabalho, que realizou comigo todos os experimentos microbiológicos. Sofremos juntas todas as adversidades de uma pesquisa, mas também nos divertimos juntas e construímos uma grande amizade. Obrigada pelos ensinamentos de microbiologia e até mesmo pelas broncas. Os frutos deste trabalho também são seus.

Aos demais amigos da Microbiologia: Guilherme, Bruno, Néia, Aline, Daniel, Ana Luíza, Antônio, Pollyanna. Obrigada por prontamente me ajudarem quando precisei, e pela convivência tão agradável durante estes anos.

Ao Leandro Lameirão Ferreira, que trabalhou comigo durante todo o processo de deposição e caracterização dos filmes de DLC. Obrigada pela disponibilidade, pela paciência e pelos ensinamentos sobre plasma e outros assuntos que eu desconhecia quase que completamente. Os frutos deste trabalho são seus também.

Aos demais amigos do ITA: Sara, Tiago, Fabiano, Roberson, Eduardo, Juliano, Elisa. Agradeço pela convivência agradável e pelas discussões científicas tão produtivas.

À Polyana Alves Radi Gonçalves, pela realização das análises tribológicas.

Às amigas Maria José, Maria Carolina e Gabriela, que foram as primeiras a me receber, de braços e corações abertos, quando cheguei a São José. Vocês tornaram minha adaptação a uma nova cidade mais tranquila e prazerosa. Obrigada por tudo o que fizeram por mim.

À grande amiga Carolina Martinelli, colega de curso e companheira para todas as horas. Você foi meu porto seguro neste Doutorado, pois sabia que se tudo desse errado, sempre poderia contar com você. Agradeço a você e a sua família pelo carinho com que sempre me trataram.

Às minhas companheiras de apartamento, cada uma a seu tempo, Marina, Marília e Fernanda. Pessoas tão diferentes, que me ensinaram a conviver. Aprendi muito com vocês, com as peculiaridades e a cultura de cada uma.

Ao colega José Renato, pela amizade e pela ajuda na elaboração do projeto de pesquisa desta tese.

Aos colegas da pós-graduação: Priscilla, Humberto, Caroline Cotes, Sâmia, Anelyse, Pedro, Sabrina, Alecsandro, Lilian, Vanessa, Suzana, Paula, Flávia, Lucas, Gabriel, Regina, Gustavo, Anderson, Luís Guilherme, Anna Karina, Fernanda Papaiz, Ana Carol, Vivian, Júlia, César, Rodrigo, Arianne, Viviane, Elen, Laura, Frederico, Talitha, Gabriela, Nathália, Sarina, Ronaldo, Aline, Carolina, Lígia, Júlio, Vinícius, Evelyn, Rafael. Agradeço pela convivência diária, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pelos momentos de trabalho e de lazer. Vocês tornaram estes anos de Doutorado muito mais leves e prazerosos. Sentirei muito a falta de todos vocês.

Aos funcionários do laboratório Marcos Vestalli e Thaís Cachuté Paradella, por quem tenho muito carinho, por serem sempre solícitos e dispostos a ajudar.

Aos funcionários da Secção de Pós-graduação, Rose, Erena, Bruno e Ivan, e aos funcionários Reginaldo e Eliane, por nos ajudarem sempre que precisamos.

Aos demais funcionários do Instituto de Tecnologia de São José dos Campos, por nos atenderem sempre com respeito, educação e gentileza.

À Prefeitura Municipal de Angra dos Reis, por me conceder licença para que eu pudesse me dedicar integralmente ao Doutorado. Agradeço especialmente ao Marcelo Freire e ao Neucimar Duarte pelo empenho em me ajudar a conseguir este benefício.

Aos meus amigos Ludimilla, Mariana, Marcelo, Marisa, Neco, Lilian, Munique. Obrigada por torcerem sempre por mim. O apoio de vocês foi fundamental nesta jornada.

A todos os familiares, amigos e colegas que participaram direta ou indiretamente deste Doutorado, e assim contribuíram para que eu concluísse mais esta etapa. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Estado atual da terapia com implantes osteointegrados	26
2.2 A interface entre o implante e o pilar protético	29
2.3 Eventos histológicos e clínicos relacionados à presença da microfenda entre o implante e o pilar protético	34
2.4 Penetração bacteriana e de fluidos pela interface implante/pilar	41
2.5 Nanofilmes de carbono tipo diamante (DLC)	52
2.6 Técnicas de deposição dos nanofilmes	56
2.7 Incorporação de nanopartículas e efeito bactericida	56
3 PROPOSIÇÃO	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Material	60
4.2 Métodos	61
4.2.1 Deposição dos filmes de DLC	61
4.2.2 Caracterização dos filmes de DLC	64
4.2.2.1 Medida da espessura	64
4.2.2.2 Espectroscopia de Espalhamento Raman	65
4.2.2.3 Análise tribológica	67

4.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	68
4.2.2.5 Rugosidade	69
4.2.2.6 Ângulo de contato (goniometria)	70
4.2.3 Verificação da aderência microbiana aos filmes de DLC	71
4.2.4 Verificação da infiltração bacteriana pela interface implante/pilar	74
4.2.5 Análise estatística	81
5 RESULTADOS	83
5.1 Caracterização dos filmes de DLC	83
5.1.1 Espessura	83
5.1.2 Espectroscopia de Espalhamento Raman	84
5.1.3 Análise tribológica	85
5.1.4 MEV e EDS	86
5.1.5 Rugosidade	89
5.1.6 Ângulo de contato	90
5.2 Aderência microbiana aos filmes de DLC	90
5.3 Infiltração bacteriana pela interface implante/pilar	92
6 DISCUSSÃO	101
7 CONCLUSÃO	109
8 REFERÊNCIAS	110
ANEXO	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) reator para deposição dos filmes de DLC por PECVD; B) fonte de descarga contínua acoplada ao reator	61
Figura 2 – A) porta-amostras no interior do reator (aberto) com oito amostras de titânio e uma de silício, antes do processo de deposição (a seta indica o termopar acoplado ao porta-amostras); B) vista do porta-amostras durante o processo de deposição, em plasma de argônio, através da janela do reator	62
Figura 3 - A) perfilômetro utilizado para medir a espessura dos filmes de DLC; B) amostra de silício parcialmente coberta com filme em perfilômetro	65
Figura 4 – Sistema utilizado para a análise de espectroscopia de retroespalhamento Raman	66
Figura 5 – Espectro Raman típico de um filme de carbono amorfo hidrogenado obtido por PECVD em plasma de metano (Bonetti, 2008)	66
Figura 6 – A) tribômetro utilizado para os testes de coeficiente de atrito e aderência dos filmes; B) esquema representativo do funcionamento de um tribômetro típico (Bonetti, 2008)	68
Figura 7 – Microscópio eletrônico de varredura	69

Figura 8 – Amostra em rugosímetro	70
Figura 9 – Goniômetro utilizado para medida do ângulo de contato ..	71
Figura 10 – Placas de 24 poços com meio de cultura em plataforma agitadora	72
Figura 11 – Lâminas de titânio suspensas em fio ortodôntico. A) face experimental; B) face não tratada, coberta com esmalte de unhas para padronização	73
Figura 12 – Lâminas de titânio em meio de cultura. As lâminas ficaram suspensas a 1 mm do fundo dos poços	73
Figura 13 - Pilares protéticos posicionados em porta-amostras para deposição dos filmes de DLC. A) pilares HE; B) pilares HI	75
Figura 14 – Pilares após deposição de filmes de DLC (HE à esquerda e HI à direita)	75
Figura 15 - Inoculação de 1 µL de suspensão de <i>E. faecalis</i> no interior de um implante, seguro por uma morsa estéril	77
Figura 16 – Torque de 20 Ncm sendo aplicado ao parafuso do pilar protético por um torquímetro manual	78
Figura 17 – Implante imerso por 30 s em caldo BHI, imediatamente após inoculação, para verificação de possível contaminação externa imediata	78

Figura 18 – Amostras em meio de cultura. A) conjunto implante/pilar suspenso por fio de amarrilho em caldo BHI, com o caldo acima da interface; B) tubos de ensaio contendo os conjuntos suspensos em caldo, para incubação em estufa de CO ₂	79
Figura 19 – A) cone de papel inserido no interior do implante, após remoção do pilar, para absorção da solução inserida; B) cones de papel em eppendorf com solução fisiológica	81
Figura 20 – Perfis da superfície de silício com filme. A) DLC; B) DLC-Ag. À esquerda dos gráficos, o substrato sem filme; à direita, com filme	83
Figura 21 – Espectros Raman dos filmes de DLC e DLC-Ag. A linha azul faz referência à banda G e a linha verde, à banda D	84
Figura 22 – Imagens (acima) e gráficos dos testes de aderência dos filmes de DLC ao substrato. A) DLC; B) DLC-Ag. As setas, da esquerda para a direita, indicam os momentos da primeira trinca, primeira exposição do substrato e início da delaminação (o DLC não sofreu delaminação). COF: coeficiente de atrito; Fz: força aplicada; AE: emissão acústica	85
Figura 23 - Coeficientes de atrito	86
Figura 24 – Corte transversal de uma lâmina de Ti CP coberta com filme de DLC. A e B) fotomicrografias por MEV; C) mapeamento do carbono por EDS	87
Figura 25 – Espectros de microanálise por EDS: A) substrato de Ti CP sem filme; B) filme de DLC; C) filme de DLC-Ag	88

Figura 26 - Mapeamento de microanálise por EDS da superfície de um filme de DLC-Ag sobre substrato de Ti CP	89
Figura 27 – Imagens de goniometria com gotas de água deionizada. A) Ti CP; B) DLC; C) DLC-Ag	90
Figura 28 – Colônias com características diversas, indicando a presença de diferentes microrganismos provenientes do biofilme aderido às lâminas de titânio, pela metodologia de microcosmo	91
Figura 29 – Gráfico de caixa das distribuições do número de colônias microbianas provenientes do biofilme aderido às lâminas de titânio (\log_{10} UFC/mL)	92
Figura 30 – Caldo de cultura à esquerda apresentando turvação, indicativo de contaminação externa imediata do implante. Caldo à direita límpido	93
Figura 31 - Caldo de cultura à esquerda mostrando turvação, indicativo de infiltração bacteriana pela interface implante/pilar. Caldo à direita límpido, indicativo de que não ocorreu infiltração	94
Figura 32 – Curvas de sobrevivência estimadas pelo método de Kaplan-Meier para os implantes HE (à esquerda) e HI (à direita)	95
Figura 33 – A) colônias características de <i>E. faecalis</i> em ágar BHI; B) visualização em microscópio óptico (aumento de 100x), mostrando células Gram positivas e diplococos em cadeia	96
Figura 34 – Gráficos de médias para os fatores “implante” e “filme” (\log_{10} UFC/mL)	97

Figura 35 – Gráfico de caixa das distribuições do número de colônias bacterianas provenientes do interior dos implantes (\log_{10} UFC/mL)	98
Figura 36 – Implantes em corte longitudinal. A e C) HE; B e D) HI. Acima, aumento de 7,5x; abaixo, aumento de 500x (interface implante/pilar)	99
Figura 37 – Imagens de MEV de dois conjuntos implante/pilar que não apresentaram infiltração bacteriana pela interface. As imagens à direita são aproximações das áreas demarcadas nas imagens à esquerda. A) pilar HI; C) implante HI; E) pilar HE; G) implante HE. B e H) as superfícies internas mostram aderência de <i>E. faecalis</i> (setas); D e F) as superfícies externas mostram ausência de bactérias	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais estudos <i>in vitro</i> sobre penetração bacteriana na interface implante/pilar	42
Quadro 2 - Nome comercial, fabricante e composição do material utilizado	60
Quadro 3 – Delineamento dos grupos de pesquisa	74
Quadro 4 – Amostras excluídas do estudo	93
Tabela 1 – Rugosidade média (nm)	89
Tabela 2 – Estatística descritiva da contagem bacteriana proveniente biofilme aderido às lâminas de titânio ($\times 10^4$ UFC/mL)	91
Tabela 3 – Teste de comparações múltiplas de Tukey (\log_{10} UFC/mL)	92
Tabela 4 – Número e percentual de amostras com infiltração bacteriana em um período de 5 dias	94
Tabela 5 – Estatística descritiva da contagem bacteriana proveniente da suspensão do interior dos implantes ($\times 10^4$ UFC/mL)	96
Tabela 6 – Tabela de Anova 2 fatores para a contagem bacteriana proveniente do interior dos implantes (\log_{10} UFC/mL)	97
Tabela 7 – Teste de comparações múltiplas de Tukey (\log_{10} UFC/mL)	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	= Angstrom
a:C-H	= Carbono amorfo hidrogenado
ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
atm	= Atmosfera
BHI	= <i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão Cérebro – Coração)
CC	= Conexão cônica
cm	= Centímetro
CO ₂	= Dióxido de carbono
CVD	= <i>Chemical Vapour Deposition</i> (Deposição Química a Vapor)
DLC	= <i>Diamond Like Carbon</i> (Carbono tipo Diamante)
EDS	= Espectroscopia de Energia Dispersiva
eV	= Elétron-volt
g/cm ³	= Grama por centímetro cúbico
GPa	= Gigapascal
h	= Hora
HE	= Hexágono externo
HI	= Hexágono interno
HMDSO	= Hexametildisiloxano
IC	= Intervalo de confiança
INPE	= Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ITA	= Instituto Tecnológico de Aeronáutica
L	= Litro
LAS	= Laboratório Associado de Sensores e Materiais
MEV	= Microscópio Eletrônico de Varredura
min	= Minuto
mL	= Mililitro

mm	= Milímetro
μL	= Microlitro
μm	= Micrômetro
N	= Newton / Número total de amostras
n	= Número de amostras por grupo
NaCl	= Cloreto de sódio
Ncm	= Newton centímetro
°C	= Graus Celsius
PBS	= <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PECVD	= <i>Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition</i> (Deposição Química a Vapor Assistida por Plasma)
PVD	= <i>Physical Vapour Deposition</i> (Deposição Física a Vapor)
s	= Segundo
sccm	= <i>Standard cubic centimeters per minute</i> (centímetros cúbicos por minuto)
Ti CP	= Titânio comercialmente puro
UFC	= Unidade formadora de colônia
W	= Watts
Ω	= Ohm

Cardoso M. Influência da deposição de filmes de carbono tipo diamante na infiltração bacteriana pela interface entre implantes e pilares protéticos [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

O estudo avaliou a influência da deposição de filmes de DLC na infiltração bacteriana pela interface entre pilares protéticos e implantes de hexágono externo (HE) e interno (HI). Também avaliou a aderência microbiana a estes filmes, depositados sobre titânio. A deposição dos filmes foi realizada por PECVD (Deposição Química a Vapor Assistida por Plasma), e sua caracterização foi feita pelas análises de perfilometria mecânica, espectroscopia Raman, rugosidade, análise tribológica, espectroscopia de energia dispersiva e ângulo de contato. Para avaliação da aderência microbiana, lâminas de titânio (N=45; n=15) foram divididas em três grupos: (1) sem filme (controle); (2) com filme de DLC; e (3) com filme de DLC dopado com prata (DLC-Ag). Elas foram suspensas em poços contendo saliva-glicerol e caldo de cultura. Após 48 h de incubação, elas foram agitadas em ultrassom e a suspensão resultante foi diluída e semeada em placas para contagem de microrganismos. Para avaliação da infiltração bacteriana pela interface implante/pilar, conjuntos de implantes e pilares HE e HI (N=180; n=30) foram divididos de acordo com o tratamento da base do pilar: (1) nenhum tratamento (controle); (2) deposição de filme de DLC; e (3) deposição de filme de DLC-Ag. Sob condições assépticas, foi inoculado 1 µL de suspensão de *Enterococcus faecalis* no interior dos implantes, e os pilares foram parafusados com 20 Ncm. Os conjuntos foram testados para contaminação externa imediata, suspensos em tubos de ensaio contendo caldo de cultura estéril, e acompanhados por cinco dias. A turvação do caldo indicou infiltração bacteriana. Ao final do período, os pilares foram desparafusados e o conteúdo interno dos implantes foi coletado com cone de papel e semeado em placas de Petri. Estas foram levadas a estufa bacteriológica por 24 h para verificação da viabilidade bacteriana e contagem de UFCs. A rugosidade e os dados de log₁₀UFC/mL foram analisados por análise de variância. A infiltração bacteriana foi analisada pelos testes Qui-quadrado, exato de Fisher, Kaplan-Meier e Log-rank. O nível de significância considerado foi de 5%. A rugosidade média foi semelhante entre os grupos (P=0,426). O filme de DLC-Ag apresentou aderência microbiana significativamente menor do que o grupo controle (P=0,04), enquanto que o filme de DLC foi estatisticamente semelhante

aos outros grupos. O percentual de infiltração bacteriana foi de 16,09% para os implantes HE e de 80,71% para os implantes HI ($P < 0,0001$). A quantidade bacteriana também foi maior no interior destes implantes. O tipo de implante influenciou significativamente os resultados ($P = 0,000$), enquanto que os filmes não exerceram influência significativa ($P = 0,487$). Concluimos que: (1) Os implantes HI apresentaram maior frequência de infiltração bacteriana e maior contagem de bactérias; (2) Os filmes de DLC e DLC-Ag não reduziram significativamente a frequência de infiltração bacteriana e a contagem de bactérias no interior dos implantes; (3) O filme de DLC-Ag reduziu significativamente a aderência microbiana ao titânio.

Palavras-chave: Implantes dentários. Infiltração. Microbiologia. Gases em plasma. Propriedades de superfície.

Cardoso M. Influence of diamond like carbon films in bacterial leakage through implant-abutment interface [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

*This study evaluated the influence of DLC films on bacterial leakage through the interface between abutments and dental implants of external hexagon (HE) and internal hexagon (HI). It also evaluated microbial adhesion to these films deposited on titanium. The deposition of the films was performed by PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition), and its characterizations were done by mechanical profilometry, Raman spectroscopy, surface roughness, tribological analysis, energy dispersive spectroscopy and contact angle. To evaluate the microbial adhesion, titanium blades (N=45, n=15) were divided into three groups: (1) without film (control), (2) with DLC film, and (3) with DLC film doped with silver (Ag-DLC). They were suspended in wells containing saliva-glycerol broth. After 48 h incubation they were ultrasonicated and the resulting suspension was diluted and plated for CFU counting. For evaluation of bacterial leakage through implant/abutment interface, sets of implants and abutments (N=180, n=30) were divided according to the treatment of the base of the abutment: (1) no treatment (control); (2) deposition of DLC film, and (3) deposition of Ag-DLC film. Under aseptic conditions, 1 μ L of *Enterococcus faecalis* was inoculated inside the implants, and abutments were tightened to 20 Ncm. The sets were tested for immediate external contamination, suspended in test tubes containing sterile culture broth, and followed for five days. The turbidity of the broth indicated bacterial leakage. At the end of the period, the abutments were removed and the internal content of the implants was collected with paper cone and seeded in Petri dishes. These were incubated for 24 h for assessment of bacterial viability and CFU counting. The roughness and \log_{10} CFU/mL data were analyzed by analysis of variance. The bacterial leakage was analyzed by Chi-square test, Fisher exact test, Kaplan-Meier and Log-rank. The level of significance was 5%. The average roughness was similar among groups (P=0.426). The Ag-DLC film presented significantly lower microbial adhesion than the control group (P=0.04), while the DLC film was statistically similar to other groups. The percentage of bacterial leakage was 16.09% for HE implants and 80.71% for HI implants (P<0.0001). The bacterial number was higher inside these implants. The type of implant significantly influenced the results (P=0.000),*

while the films did not ($P=0.487$). We conclude that: (1) HI implants had a higher frequency of bacterial leakage and higher bacteria count, (2) the DLC and DLC-Ag films did not significantly reduce the frequency of bacterial leakage and bacteria count inside the implants, (3) the Ag-DLC film significantly reduced microbial adherence to titanium.

Keywords: Dental implants. Leakage. Microbiology. Plasma gases. Surface properties.

1 INTRODUÇÃO

A terapia com implantes osteointegrados é hoje uma realidade consagrada. O índice de sobrevida destes implantes se encontra acima de 94% nos primeiros anos (den Hartog et al., 2008; Jung et al., 2008; Aglietta et al., 2009; Lambert et al., 2009; Zurdo et al., 2009), decaindo para aproximadamente 87% após 15 anos (Lambert et al., 2009). Em comparação, para dentes comprometidos, porém tratados, a sobrevida em 10 anos é em torno de 92-93% (Holm-Pedersen et al., 2007).

A técnica convencional de confecção de uma prótese sobre implantes envolve o parafusamento de um pilar protético ao implante, criando assim uma microfenda na interface entre as duas estruturas. Esta microfenda, que mede em média de 2 a 6 μm (Tsuge et al., 2008), permite a penetração e a colonização bacteriana (Quirynen, van Steenberghe, 1993), podendo levar a eventos clínicos indesejáveis, como odor desagradável, inflamação tecidual permanente ao redor do implante (Broggini et al., 2003), perda óssea marginal (Covani et al., 2006) e recessão gengival (Chow, Wang, 2010), com consequente prejuízo estético. De fato, estudos clínicos mostram a presença de um infiltrado inflamatório ao redor dos implantes (van Winkelhoff et al., 2000; Callan et al., 2005). Como a perda óssea em forma de taça (saucerização), verificada nesta região após sua exposição ao meio bucal, não é encontrada em implantes de corpo único, pode-se atribuir sua ocorrência à presença da microfenda, possivelmente devido à colonização bacteriana aí presente (Covani et al., 2006).

A penetração bacteriana através da interface entre o implante e o pilar protético é influenciada, entre outros, pelo tipo de

conexão protética (Tesmer et al., 2009; Koutouzis et al., 2011) e pela rugosidade das superfícies (Subramani et al., 2009). Como as superfícies mais rugosas possuem maior energia de superfície e aderem mais microrganismos, a redução da rugosidade da superfície do pilar protético em contato com o implante possivelmente reduziria a penetração bacteriana e suas consequências clínicas.

Kim et al. (2005) demonstraram que a deposição de um filme de carbono tipo diamante (DLC, *Diamond Like Carbon*) sobre a plataforma de um implante de conexão externa aumentou a resistência ao desgaste e à soltura do parafuso protético, além de reduzir aparentemente a rugosidade de sua superfície.

O filme de DLC é composto por uma forma densa e metaestável do carbono amorfo ou carbono amorfo hidrogenado, que apresenta propriedades semelhantes às do diamante, como elevada dureza mecânica, baixo coeficiente de atrito, transparência óptica, elevada resistência ao desgaste e estabilidade química (Robertson, 2002; Kim et al., 2005). É amplamente utilizado como revestimento protetor em janelas ópticas, discos rígidos magnéticos, peças de motores de automóveis e aviões, próteses médicas, dispositivos microeletromecânicos, entre outros. Também é usado como lubrificante sólido pela indústria aeroespacial. Na Odontologia, é comercialmente utilizado sobre roscas de parafusos protéticos em sistemas de implantes dentários para reduzir seu afrouxamento, pois aumenta a pré-carga e reduz o coeficiente de atrito (Martin et al., 2001; Kim et al., 2005), e também como recobrimento de fios ortodônticos (Muguruma et al., 2011). O DLC também vem sendo estudado como tratamento de superfícies de implantes (De Maeztu et al., 2007). Outros filmes nanométricos vêm sendo pesquisados como recobrimento de cerâmicas a base de zircônia para melhorar sua adesão a cimentos resinosos (Piascik et al., 2009, 2011).

Associado às suas propriedades físicas, os filmes de DLC são biocompatíveis (Morrison et al., 2006) e podem ter suas características modificadas pela incorporação de nanopartículas (V, Ti, F, H, Ag). A incorporação de partículas de prata pode ser especialmente vantajosa devido a seu conhecido efeito bactericida (Grill, 2003; Zhou et al., 2008; Marciano et al., 2009c).

A interposição de um filme nanométrico que reduza o atrito entre o pilar protético e o implante, conferindo uma maior pré-carga ao sistema e, com isto, um melhor selamento da microfenda, e que apresente propriedades bactericidas, possivelmente reduziria a penetração e colonização bacteriana nesta interface. Trabalhos avaliando o efeito deste filme na infiltração bacteriana pela interface não foram encontrados na literatura. A redução desta infiltração poderia reduzir a perda óssea ao redor do implante e a recessão gengival, eventos comumente encontrados na clínica e que geram tantos transtornos a profissionais e pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estado atual da terapia com implantes osteointegrados

Quase cinco décadas após o tratamento dos primeiros pacientes com implantes osteointegrados, em 1965 (Adell et al., 1981), atualmente não mais se questiona a eficácia desta modalidade de tratamento na reabilitação de pacientes total ou parcialmente edêntulos. A terapia com implantes é hoje uma realidade consagrada, que apresenta elevadas taxas de sucesso (Wennerberg, Albrektsson, 2011). Inicialmente propostos para reabilitar pacientes edêntulos cuja reabsorção óssea severa dificultava o uso de uma prótese total mucossuportada (os chamados “inválidos orais”), os implantes são hoje utilizados para suportar próteses parciais fixas e removíveis, sobredentaduras e coroas unitárias. E, assim como suas indicações se expandiram, as preocupações também se modificaram e o nível de exigência aumentou, considerando-se de fundamental importância agora, além da funcionalidade, a recuperação e a manutenção da estética ao redor dos implantes.

Estudos recentes avaliaram a taxa de sobrevida dos implantes e respectivas próteses ao longo dos anos. Em uma revisão sistemática, den Hartog et al. (2008) encontraram uma taxa de sobrevida de 95,5% (IC 95%: 93,0 – 97,1%) após um ano para implantes unitários instalados em região anterior. Estes autores citaram que o sucesso destes implantes não deve ser determinado apenas pelas altas taxas de sobrevida, mas principalmente pela qualidade desta sobrevida, já que o tecido circunjacente ao implante deve estar em harmonia com o tecido ao redor dos dentes adjacentes e a coroa deve harmonizar com os dentes

vizinhos. Em outra revisão sistemática, Jung et al. (2008) relataram uma taxa de sobrevida de 96,8% (IC 95%: 95,9 – 97,6%) para implantes unitários após cinco anos, enquanto que a sobrevida das coroas sobre estes implantes foi calculada em 94,5% (IC 95%: 92,5 – 95,9%).

Também foram calculadas as taxas de sobrevida para implantes suportando outros tipos de próteses. Para implantes suportando próteses parciais fixas com *cantilever* foram relatadas taxas de 94,3% (IC 95%: 84,1 – 98%) após cinco anos e de 88,9% (IC 95%: 70,8 – 96,1%) após 10 anos (Aglietta et al., 2009). Segundo Zurdo et al. (2009), as próteses parciais fixas com *cantilever* apresentam uma sobrevida após cinco anos menor do que as próteses sem *cantilever* (91,9% e 95,8%, respectivamente). Para próteses totais fixas maxilares, Lambert et al. (2009) encontraram taxas de 98,2% após um ano e 92,1% após 10 anos; em relação aos implantes, as taxas foram de 94% após um ano e 87,7% após 15 anos. Os autores observaram que a sobrevida dos implantes normalmente decai ao longo do tempo, mas que o maior número de perdas ocorre nos períodos iniciais após a instalação dos implantes. Maló et al. (2011) descreveram taxas de 98,6% para as próteses e de 95,8% para os implantes. Esta diferença se deve ao fato de que em alguns casos de prótese total fixa, a perda de um implante não inviabiliza o uso da mesma prótese, que se mantém suportada pelos implantes restantes. Para implantes que suportam sobredentaduras, Ueda et al. (2011) relataram uma taxa de sobrevida de 85,9% após 24 anos.

Comparações entre a sobrevida de próteses sobre implantes e próteses sobre dentes também são encontradas na literatura. Em uma revisão sistemática, Iqbal e Kim (2007) relataram taxas de sobrevida estatisticamente semelhantes entre dentes endodonticamente tratados que receberam coroas unitárias e implantes unitários. Holm-Pedersen et al. (2007) afirmaram, em uma revisão tradicional da literatura, que a sobrevida de dentes tratados supera a dos implantes após 10 anos: enquanto a primeira estaria acima de 90%, a segunda estaria entre 80 e

90%. Entretanto, a presença de patologia periapical prévia ao tratamento reduziria sensivelmente a longevidade do dente. Para dentes que suportam sobredentaduras, Koller et al. (2011) relataram taxas de sobrevida entre 60,6% e 95,3% após um período de 4 a 10 anos; para implantes suportando o mesmo tipo de prótese, encontraram taxas entre 97% e 100% após um período de 3 a 10,4 anos. Priest (2011) afirmou que as próteses sobre implantes apresentam taxas de sucesso maiores do que as próteses sobre dentes de mesma extensão. Para este autor, as taxas de sucesso somente são comparáveis quando se trata de dentes sadios endodonticamente tratados que receberam coroas unitárias, mas os dentes não se comportam tão bem quanto os implantes quando utilizados como pilares para próteses fixas. Em relação ao custo, Kim e Solomon (2011) citaram que a opção de menor custo para um dente que necessita de retratamento endodôntico é sua extração e instalação de um implante associado a uma coroa unitária.

Apesar das altas taxas de sucesso das próteses sobre implantes, é frequente o relato de complicações a elas relacionadas. Estas podem ser divididas em complicações técnicas e complicações biológicas. Para Jung et al. (2008), a complicação técnica mais frequentemente encontrada após cinco anos foi a soltura do parafuso ou do pilar protético (12,7% [IC 95% 5,7 – 27%]), seguida de perda de retenção da coroa (5,5% [IC 95% 2,2 – 13,5%]) e fratura do material de recobrimento estético (4,5% [IC 95% 2,4 – 8,4%]). den Hartog et al. (2008) citaram como complicação técnica mais frequente a perda de pilares provisórios e a perda ou fratura de coroas provisórias. A complicação técnica mais frequente relatada por Aglietta et al. (2009) após cinco anos foi a fratura do material de recobrimento (10,3% [IC 95% 3,9 – 26,3%]); outras complicações foram: soltura do parafuso protético (8,2% [IC 95% 3,9 – 17%]), fratura do pilar ou do parafuso (2,1% [IC 95% 0,9 – 5,1%]) e fratura do implante (1,3% [IC 95% 0,2 – 8,3%]). Zurdo et al. (2009) relataram taxas de 13 a 26% para próteses parciais fixas com

cantilever, e de 0 a 12% para próteses sem *cantilever*. Maló et al. (2011) encontraram complicações técnicas em 6% dos pacientes estudados.

Em relação às complicações biológicas, Jung et al. (2008) descreveram como mais frequentes as lesões da mucosa peri-implantar (inflamação gengival e sangramento) e a peri-implantite (profundidade de bolsa maior ou igual a 5 mm com sangramento ou supuração à sondagem), com uma taxa de ocorrência conjunta após cinco anos de 9,7% (IC 95% 5,1 – 17,9%). Em seguida encontra-se a perda óssea maior do que 2 mm ao redor dos implantes (6,3% [IC 95% 3 – 13%]). den Hartog et al. (2008) citaram a formação de fístulas, a mucosite peri-implantar e a deiscência do tecido mole. Aglietta et al. (2009) estimaram taxas de 10,5% (IC 95% 3,9 – 26,4%) para complicações relacionadas aos implantes e de 17,9% (IC 95% 6,4 – 44,3%) às próteses com *cantilever* em cinco anos. Maló et al. (2011) também relataram a ocorrência destas complicações, e associaram o fumo como fator de risco. Em uma revisão sistemática sobre implantes imediatos realizada por Lang et al. (2012), os autores descreveram que, com exceção de um artigo no qual houve ganho no nível ósseo médio ao redor dos implantes, todos os outros mostraram perda óssea marginal após entrarem em função, demonstrando que esta ainda é uma questão preocupante na implantodontia.

2.2 A interface entre o implante e o pilar protético

A confecção de uma prótese sobre implantes envolve a conexão de um pilar protético ao implante, geralmente por meio de um parafuso. Algumas vezes, este pilar faz parte da prótese em si; outras vezes, é um componente intermediário entre a prótese e o implante. Na interface entre os dois componentes, implante e pilar protético,

invariavelmente se forma uma fenda, de dimensões microscópicas que variam entre os diferentes sistemas (Jansen et al., 1997).

Diversos estudos mediram a dimensão desta microfenda. Jansen et al. (1997) analisaram 13 diferentes tipos de implantes ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) e encontraram fendas de 5 μm em média. Com exceção de um sistema, todos os outros apresentaram valores menores do que 10 μm . Os sistemas de conexão cônica apresentaram os menores valores, entre 1 e 4 μm , e um sistema de interface plana (Friality 2) apresentou valores de 1 μm . Tsuge et al. (2008) mediram a microfenda em implantes de conexão interna e externa por meio de um microscópio de varredura a laser, e relataram valores de $2,3\pm 0,49$ μm para um implante de hexágono externo (HE) (Brånemark) até $5,6\pm 0,87$ μm para um implante com triplo canal interno (Replace Select).

Um estudo avaliou a microfenda em implantes de conexão cônica sob aplicação de carga estática horizontal, utilizando micrografias baseadas em síncrotron, um acelerador de partículas (Rack et al., 2010). O tamanho da fenda variou entre 1 e 4 μm na ausência de carga, aumentando progressivamente com a aplicação de carga. Sob uma carga de 100 N, a fenda chegou a medir 22 μm . Outro estudo avaliou cinco sistemas de implantes nacionais com conexão por hexágono externo, e os resultados mostraram microfendas variando de $0,51\pm 0,39$ μm (Neodent) até $2,68\pm 3,02$ μm (Conexão) (Dias et al., 2012). Os autores observaram que a desadaptação não era uniforme ao longo de toda a interface. Meleo et al. (2012) propuseram o uso da técnica de microtomografia com raios-X para observar tridimensionalmente o contato externo e interno entre o implante e seus componentes sem necessidade de destruir, cortar ou alterar a amostra. Os autores citaram que, apesar de as interfaces de conexões cônicas apresentarem melhor selamento e melhor estabilidade mecânica, ainda não existe um tipo de conexão ideal.

Por melhor que seja a adaptação entre o implante e o pilar protético, sempre haverá a presença de uma microfenda, e este espaço é suficiente para abrigar microrganismos nocivos aos tecidos circunjacentes ao implante, pois estes medem, em média, menos de 2 µm (Callan et al., 2005). De fato, microrganismos orais são capazes de se aderir à superfície do titânio, formando um biofilme, e a interface entre o implante e o pilar funciona como um nicho bacteriano (Subramani et al., 2009).

A formação do biofilme nos implantes dentários é semelhante ao que ocorre em dentes (Tanner et al., 1997). Bactérias da saliva se ligam às proteínas e glicoproteínas da película salivar que se adere à superfície do dente ou implante segundos após sua limpeza. A saliva contém mais de 10^8 células bacterianas por mililitro (Saxton, 1973). Os primeiros microrganismos a colonizar a superfície são os estreptococos (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*), de 0 a 4 h após a formação da película. Durante as 4 a 24 h seguintes, outras bactérias se aderem e elas se multiplicam e crescem, formando microcolônias. Sua nutrição é proveniente da matriz polimérica extracelular, de origem da saliva na placa supragengival e do fluido crevicular na placa subgengival. Em 1 a 14 dias, a placa inicialmente dominada por estreptococos se altera para uma placa dominada por espécies de *Actinomyces*. Em 2 a 4 semanas, as espécies bacterianas se tornam mais diversificadas, com altos níveis de espécies filamentosas anaeróbias gram-negativas, formando um biofilme maduro (Subramani et al., 2009).

Estudos *in vivo* analisaram a microbiota associada à região peri-implantar. Lee et al. (1999) examinaram 43 pacientes parcialmente edêntulos, utilizando a técnica de DNA *checkerboard* para análise da microbiota ao redor de implantes e dentes. Os microrganismos mais comumente encontrados nos implantes foram os estreptococos orais, *capnocytophagae*, *Veillonella parvula*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. As espécies periodontopatogênicas *P.*

gingivalis, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Campylobacter rectus* foram detectadas em alguns pacientes. Foi observado que a complexidade da microbiota aumentou com o tempo de carregamento em boca, e que a colonização por patógenos periodontais foi maior em pacientes com histórico de doença periodontal. A maior influência na microbiota peri-implantar foi a microbiota nos dentes remanescentes.

Callan et al. (2005) coletaram, com pontas de papel estéreis, amostras microbianas da região interna da interface implante/pilar de 43 implantes, e das roscas de 11 cicatrizadores, provenientes de 32 pacientes parcialmente edêntulos com excelente saúde periodontal, 25 dias após o segundo estágio cirúrgico e instalação dos cicatrizadores. Por meio de sonda de DNA, detectaram a presença de níveis moderados a altos de oito patógenos periodontais nas interfaces dos implantes. Todos os espécimes apresentaram pelo menos um dos seguintes microrganismos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*. As amostras provenientes das roscas dos cicatrizadores, no entanto, foram negativas para todos estes microrganismos (menos de 10^3 células). Estes resultados, segundo os autores, suportam a hipótese de que bactérias periodontopatogênicas podem se deslocar dos dentes para os implantes.

Por meio de análises histológicas em microscópio óptico, Covani et al. (2006) identificaram colonização bacteriana intensa na interface e no interior de 15 implantes removidos por falha na osteointegração.

O biofilme supra e subgingival foi avaliado por Shibli et al. (2008) em pacientes com e sem peri-implantite. Foram coletadas amostras de biofilmes de um implante por paciente, sendo 22 implantes saudáveis e 22 com sinais de peri-implantite. As amostras foram

analisadas para a presença de 36 microrganismos pela técnica de *checkerboard DNA–DNA hybridization*. O grupo controle (saudável) apresentou uma contagem bacteriana total menor do que o grupo com peri-implantite. Em termos qualitativos, o biofilme supragengival não diferiu substancialmente do subgengival, sugerindo que o biofilme supragengival possa atuar como um reservatório bacteriano na reinfecção do ambiente subgengival. Quantitativamente, de uma forma geral, o biofilme supragengival e os implantes com peri-implantite apresentaram maior número de bactérias totais do que o biofilme subgengival e os implantes saudáveis. As bactérias do complexo vermelho, que abriga as espécies mais patogênicas (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*), foram encontradas em maior proporção na peri-implantite, enquanto que a proporção de bactérias do complexo roxo, consideradas benéficas (*Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula*), foi maior nos implantes saudáveis.

Cosyn et al. (2011) compararam a microbiota do sulco peri-implantar, do parafuso do pilar e da bolinha de algodão utilizada no compartimento intracoronário de próteses totais fixas parafusadas, por meio da técnica de *checkerboard DNA–DNA hybridization*. Foram avaliados 58 implantes de oito pacientes que possuíam próteses havia em média 9,6 anos, sem sinais de peri-implantite. Quarenta espécies microbianas foram pesquisadas. A bolinha de algodão na região intracoronária se mostrou intensamente contaminada e bastante semelhante ao sulco peri-implantar em termos de frequência de detecção e contagem de microrganismos para praticamente todas as espécies pesquisadas. Entretanto, praticamente não havia ligação microbiana entre os dois compartimentos, sugerindo a existência de infiltração ao longo das margens das restaurações de resina composta utilizadas para obliterar os orifícios de acesso aos parafusos protéticos. Comparando-se o parafuso do pilar ao sulco peri-implantar, a maioria das espécies foi mais frequentemente encontrada e em maior número no sulco do que no

parafuso. Como não há contato direto do parafuso com o compartimento intra-coronal, a interface entre o implante e o pilar e entre o pilar e a prótese é o caminho mais provável para a transmissão microbiana do meio externo para o parafuso, e vice-versa. Embora nenhum implante apresentasse sinais clínicos de peri-implantite, foi notável a prevalência de numerosas espécies associadas à doença.

2.3 Eventos histológicos e clínicos relacionados à presença da microfenda entre o implante e o pilar protético

A presença de bactérias na interface entre o implante e o pilar protético foi relacionada à ocorrência de eventos histológicos e clínicos indesejáveis que atingem o tecido circunjacente ao implante. Os microrganismos periodontopatogênicos que colonizam esta região produzem endotoxinas, colagenases, hialuronidases e sulfato de condroitina, que geram uma resposta inflamatória, resultando em perda de tecido de suporte ao redor do implante (Subramani et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram o infiltrado inflamatório presente nos tecidos peri-implantares. Dois estudos com implantes de hexágono externo em cães descreveram a presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo lateral ao epitélio juncional, na região da interface entre o implante e o pilar. Este infiltrado inflamatório mostrou-se separado da crista óssea por uma zona de 0,8 mm de tecido conjuntivo normal. A perda óssea encontrada após seis meses foi de 2,4 mm; a altura da mucosa peri-implantar variou de 3,5 a 3,9 mm; a crista óssea localizava-se a 1,1–1,5 mm apicalmente à interface; e foi observada a formação de um epitélio juncional de 2,1-2,4 mm faceando a superfície do implante. Os sinais clínicos e histológicos de inflamação foram significativamente maiores na presença de placa, mas não houve

diferença entre procedimentos de um ou dois passos cirúrgicos (Ericsson et al., 1995, 1996).

O infiltrado inflamatório mostra-se bem menor em implantes de corpo único, que não possuem microfendas, em relação aos implantes de dois componentes. Brogгинi et al. (2003) compararam histologicamente, em cães, implantes de corpo único e implantes de duas peças submersos e não submersos. Nos dois últimos a plataforma foi localizada no nível ósseo no momento da instalação. Os autores verificaram um infiltrado celular considerável no tecido mole ao redor dos implantes de duas peças, que se concentrava 0,5 mm coronalmente à interface implante-pilar, e se dissipava gradualmente pelo tecido em direção ao osso e ao epitélio gengival. Estas células eram predominantemente neutrófilos. Em contrapartida, no tecido ao redor dos implantes de corpo único foram encontradas poucas células inflamatórias, predominantemente mononucleares, que se distribuíam esparsamente. A perda óssea ao redor dos implantes também foi significativamente maior nos implantes de duas peças do que nos de corpo único. Os autores sugerem que a presença da microfenda no nível ósseo leva à penetração e à colonização bacteriana persistentes, originando um estímulo quimiotático que promove o acúmulo constante de neutrófilos nesta região. A ativação de células inflamatórias estimularia a formação, o crescimento e a ativação de osteoclastos, resultando em perda de osso alveolar.

Degidi et al. (2006) avaliaram a presença de células e fatores inflamatórios em tecidos peri-implantares em humanos, comparando cicatrizadores de titânio e de zircônia. O infiltrado inflamatório apresentou-se bem maior com os cicatrizadores de titânio, sendo constituído principalmente de linfócitos, plasmócitos e histiócitos; ao redor destes cicatrizadores, o infiltrado atingia a submucosa, se estendendo algumas vezes à mucosa e produzindo microulcerações. Nos tecidos ao redor dos cicatrizadores de titânio também foi observado maior

número de microvasos sanguíneos, e uma maior expressão de fatores ligados ao processo inflamatório, como o fator de crescimento endotelial vascular, o antígeno Ki-67 (sinalizador de proliferação celular) e a enzima óxido nítrico sintetase (NOS1 e NOS3). Os autores correlacionam estes achados com a maior concentração bacteriana nos espécimes de titânio. A rugosidade média foi estatisticamente semelhante entre os dois materiais.

A existência de processo inflamatório constante nos tecidos peri-implantares, demonstrada em estudos histológicos, reflete-se clinicamente. Os primeiros sinais clínicos são observados no tecido mole, e são conhecidos como mucosite peri-implantar. Este termo descreve a presença de inflamação na mucosa ao redor de um implante sem sinais de perda do osso de suporte, e é caracterizado por sangramento à sondagem (Lindhe, Meyle, 2008). A mucosite peri-implantar é prevalente em 80% dos pacientes e em 50% dos implantes (Zitzmann, Berglundh, 2008). Sua patogenia é semelhante à da gengivite ao redor de dentes (Lang et al., 2011).

A não resolução da inflamação no nível do tecido mole pode ocasionar um quadro mais grave, com perda de osso de suporte, denominado peri-implantite. Sua progressão pode levar à perda do implante. Além de sangramento e, muitas vezes, supuração à sondagem, observa-se aumento da profundidade de sondagem (bolsas), clinicamente, e redução do osso ao redor do implante, radiograficamente (Lindhe, Meyle, 2008).

As doenças peri-implantares (mucosite peri-implantar e peri-implantite) são doenças infecciosas e relacionadas ao acúmulo de biofilme bacteriano nas superfícies dos implantes. Elas podem ser correlacionadas, respectivamente, à gengivite e à doença periodontal (Zitzmann, Berglundh, 2008). O consenso do sexto *Workshop* Europeu de Periodontia recomenda a avaliação periódica dos implantes por meio de

sondagem convencional leve (0,25 N) e radiografias periapicais (Lindhe, Meyle, 2008).

Os implantes padrão Brånemark (com conexão de hexágono externo) apresentam invariavelmente uma perda vertical de tecido ósseo circunjacente, em forma de taça, denominada *saucerização*, que ocorre até um ano após o implante ser colocado em função, e mede aproximadamente de 1,5 a 2 mm (Albrektsson et al., 1986; Bidez, Misch, 1992; Cochran et al., 2009). Oh et al. (2002) revisaram as possíveis causas desta perda óssea inicial, que incluem: trauma cirúrgico, sobrecarga oclusal, peri-implantite, presença da microfenda, restabelecimento das distâncias biológicas, influência da cinta transóssea do implante, entre outros. Segundo os autores, não há evidências suficientes para considerar o trauma cirúrgico e a peri-implantite causas da perda óssea inicial. A sobrecarga oclusal pode ser um fator associado, pois se houver uma tensão excessiva na crista óssea após a instalação da prótese, a perda óssea se inicia nesta região. Entretanto, a densidade óssea também parece afetar este fenômeno, pois implantes maxilares perdem mais osso do que os mandibulares. O restabelecimento das distâncias biológicas se inicia imediatamente após o segundo passo cirúrgico nos implantes submersos e após a instalação do implante nos não-submersos. A dimensão e a posição das distâncias biológicas podem ser determinadas pela localização da microfenda, se presente, e pelas características da região transóssea do implante, como a textura superficial, o desenho da conexão implante/pilar, e a localização da junção entre a superfície rugosa e a polida nos implantes de corpo único. O restabelecimento das distâncias biológicas não deve ser considerado um fator isolado, pois diferentes níveis de perda óssea são relatados para diferentes tipos de implantes. Assim, os autores concluem que, dentre todos os fatores possíveis, o restabelecimento das distâncias biológicas, a sobrecarga oclusal, a microfenda e as características da região transóssea são, em conjunto, as causas mais prováveis da perda óssea

cervical inicial. Eles afirmam que há pouca evidência científica sobre o mecanismo exato desta perda óssea.

Em um estudo em cães, Hermann et al. (1997) avaliaram a perda óssea em implantes submersos e não-submersos, utilizando dois implantes de corpo único e quatro implantes de duas peças. Dos últimos, um foi instalado não-submerso e três, submersos em diferentes níveis em relação à crista óssea. Os implantes de corpo único receberam abordagem não-submersa. Os pilares foram instalados após três meses e os animais, sacrificados após seis meses para análise histológica. Avaliações radiográficas mensais demonstraram que nos implantes de corpo único o nível da crista óssea seguiu sempre o limite entre a superfície rugosa e a polida do implante; para os implantes de duas peças, o nível ósseo mostrou-se dependente da localização da microfenda, a aproximadamente 2 mm abaixo desta. Este estudo foi pioneiro em demonstrar que a microfenda tem um efeito direto na perda óssea, independentemente da abordagem cirúrgica.

A perda óssea cervical inicial também é vista em implantes de conexão interna, embora em menor extensão, e depende da localização da plataforma do implante em relação à crista óssea no momento de sua instalação. Weng et al. (2011) compararam a perda óssea após três meses em implantes de hexágono externo e conexão cônica interna, instalados no nível ósseo ou 1,5 mm submersos, em cães. Os resultados mostraram uma maior perda óssea para os implantes de hexágono externo submersos ($1,56 \pm 0,53$ mm) e uma menor perda óssea para os implantes de conexão cônica não submersos ($0,48 \pm 0,66$ mm).

A perda óssea encontrada nos implantes de duas peças não é observada (ou é minimamente observada) nos implantes de corpo único (Hermann et al., 1997, 2000). Foi observado até mesmo ganho de tecido ósseo ao redor destes implantes após um ano, em comparação com o nível ósseo no momento da instalação do implante (Froum et al.,

2011). Por esta razão, a perda óssea tem sido associada à microfenda entre o implante e o pilar.

O conceito de “plataforma *switching*” reduziu a perda óssea encontrada nos implantes convencionais. Por este conceito, o diâmetro da base do pilar protético é menor do que o diâmetro da plataforma do implante, fazendo com que a microfenda seja transferida interiormente, ou seja, em direção ao centro do implante, afastando-se da crista óssea (Gardner, 2005; Lazzara, Porter, 2006).

Vários autores aceitam a hipótese da manutenção das distâncias biológicas para explicar a remodelação óssea ao redor dos implantes de dois componentes, em resposta ao fator agressor gerado pela presença microbiana na interface implante-pilar. Assim como acontece na dentição natural, ao redor de um implante há epitélio sulcular, epitélio juncional, tecido conjuntivo, periósteo e osso. Um colar de tecido mole, de espessura constante, é necessário para manter um selamento e proteger o conjunto de agressores externos mecânicos e biológicos. Quando um agente externo invade esta distância, o epitélio reage migrando apicalmente para isolar o agressor, resultando em perda óssea para restaurar as distâncias biológicas (Vacek et al., 1994; Hermann et al., 2001a; Vela-Nebot et al., 2006).

A estabilidade da conexão implante/pilar parece ser crítica durante o período inicial de cicatrização. King et al. (2002), em um estudo em cães, instalaram implantes de duas peças com diferentes dimensões de fendas (<10 μm , 50 μm e 100 μm), e em metade os pilares foram soldados aos implantes. Foi realizado acompanhamento radiográfico por três meses, e depois os animais foram sacrificados. Após o primeiro e o segundo mês, a perda óssea mensurada pelas radiografias foi significativamente menor nos implantes com pilares soldados em comparação aos não-soldados. Após o terceiro mês, esta diferença não foi significativa. O efeito da dimensão da microfenda não foi significativo para nenhum dos períodos avaliados. Os resultados sugerem que o grupo

soldado atinge o equilíbrio da remodelação óssea mais precocemente que o grupo não-soldado. Apesar de as radiografias não mostrarem diferenças entre os grupos após três meses, quando as amostras foram submetidas a exame histológico esta diferença se fez notar (Hermann et al., 2001b).

Embora a perda óssea inicial geralmente não cause a perda de funcionalidade do implante, ela pode gerar sequelas em relação à estética, pois pode provocar recessão gengival (Chow, Wang, 2010). Há uma menor previsibilidade na altura da papila interproximal entre um implante e um dente adjacente conforme se aumenta a distância entre a crista óssea e o contato proximal entre as coroas (Choquet et al., 2001). Em implantes, observou-se que quanto maior o nível ósseo, maior a altura do tecido mole em relação ao nível ósseo inicial (Broggini et al., 2003). A redução da altura da papila gengival pode causar os chamados “buracos negros”, gerando dificuldades fonéticas, impacção alimentar e estética desagradável, o que pode ser considerado uma falha do tratamento (Chow, Wang, 2010).

Mesmo quando os tecidos peri-implantares encontram-se clinicamente saudáveis e não há prejuízo estético, nota-se um odor bastante desagradável ao se remover o cicatrizador ou o pilar protético do implante, o que incomoda profundamente os pacientes. O mau odor oral é geralmente causado por bactérias, em sua maioria anaeróbios proteolíticos, presentes em dorso de língua, bolsas periodontais e peri-implantares (McNamara et al., 1972; Callan et al., 2005). Sterer et al. (2008) avaliaram a relação entre a localização da microfenda em implantes de dois componentes e o mau odor, mensurado de três formas: (1) subjetivamente, pela olfação do cicatrizador, classificando-o em uma escala de 0 (sem odor) a 5 (odor extremamente desagradável); (2) pela mensuração, por meio de um halímetro, dos compostos de sulfeto voláteis emanados do cicatrizador; e (3) pela contagem de bactérias anaeróbicas viáveis provenientes do interior do implante. Quanto maior a profundidade da microfenda, maior foi a produção de mau odor. Para profundidades de

3 ou 4 mm, o mau odor subjetivo, a volatilização de compostos de sulfeto, e o número de bactérias anaeróbicas foram significativamente maiores do que para profundidades de 1 ou 2 mm. Os autores aconselham que, sempre que possível, a interface implante/pilar seja localizada a no máximo 2 mm de profundidade da margem gengival.

Como visto, a presença bacteriana na interface implante/pilar protético é considerada responsável pela ocorrência de diversos eventos clínicos indesejáveis. Por melhor que seja a adaptação entre os dois componentes, a microfenda existente entre eles permite a passagem de bactérias do meio oral para o interior do implante e vice versa, fazendo desta cavidade um reservatório bacteriano.

2.4 Penetração bacteriana e de fluidos pela interface implante/pilar

Diversos estudos *in vitro* demonstraram a passagem de bactérias e fluidos pela interface entre o implante e o pilar protético, tanto pela técnica direta (passagem do meio externo para o interior do implante), quanto pela indireta (passagem do interior do implante para o meio externo). Os principais estudos estão sumarizados no Quadro 1 e serão brevemente descritos a seguir.

Quadro 1 – Principais estudos *in vitro* sobre penetração bacteriana na interface implante/pilar

Autor e ano	Técnica	Bactéria utilizada	Quantidade inoculada	Concentração bacteriana (células/mL)	Tempo de observação	Viabilidade dentro do implante*
Jansen et al., 1997	Indireta	<i>E. coli</i>	0.5 µL	Não descreve	1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias	Não testa
Piattelli et al., 2001	Direta	<i>P. aeruginosa</i>	Não se aplica	10 ⁸	72 h (troca meio a cada 24 h)	Não se aplica
Dibart et al., 2005	Direta e indireta	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>S. oralis</i> e <i>F. nucleatum</i>	0.1 µL	Não descreve	3 dias	1 implante inoculado aberto
Steinebrunner et al., 2005	Indireta	<i>E. coli</i>	5 µL	1.5 x 10 ⁹	1.200.000 ciclos/1 Hz	Não testa
Duarte et al., 2006	Direta	<i>E. faecalis</i>	Não se aplica	4 x 43 x 10 ⁹	7, 14, 21, 35, 49, 63 dias (troca meio a cada 7 dias)	Não se aplica
do Nascimento et al., 2008	Indireta	<i>F. nucleatum</i>	3 µL	10 ⁸	14 dias	Não testa
Barbosa et al., 2009	Indireta	<i>F. nucleatum</i>	3 µL	10 ⁸	14 dias	Coleta com <i>microbrush</i>
Tesmer et al., 2009	Direta	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i>	Não se aplica	Não descreve	5 dias	Não se aplica
do Nascimento et al., 2009a	Indireta	<i>S. sobrinus</i>	3 µL	10 ⁸	14 dias	Coleta com <i>microbrush</i>
do Nascimento et al., 2009b	Direta	<i>S. mutans</i>	Não se aplica	10 ⁸	14 dias	Não se aplica
Deconto et al., 2010	Indireta	<i>E. coli</i>	0.3 µL	10 ⁸	7 dias	Não testa
Aloise et al., 2010	Indireta	<i>S. sanguinis</i>	0.1 µL	2.41 x 10 ⁶ diluída a 10 ⁻⁴	14 dias	Não testa
Ricomini et al., 2010	Direta	<i>S. sanguinis</i>	Não se aplica	10 ⁵	72 h (troca meio a cada 12 h)	Não se aplica
Nayak et al., 2011	Direta	<i>Enterococci</i>	Não se aplica	Não descreve	120 h	Não se aplica
Koutouzis et al., 2011	Direta	<i>E. coli</i>	Não se aplica	Não descreve	46 h (troca meio a cada 18 h)	Não se aplica
do Nascimento et al., 2011a	Direta	Saliva (<i>A.a</i> e <i>C. gingivalis</i>)	Não se aplica	Não descreve	7 dias	Não se aplica
do Nascimento et al., 2011b	Direta	Saliva (<i>C. gingivalis</i> , <i>S. mutans</i> e <i>V. parvula</i>)	Não se aplica	Não descreve	7 dias	Não se aplica
Teixeira et al., 2011	Direta / Indireta	<i>S. aureus</i>	0.5 µL (CC) e 2 µL (HI)	10 ⁸	7 dias (indireta) 14 dias (direta)	Não testa
Dias et al., 2012	Indireta	<i>E. coli</i>	0.3 µL	10 ⁸	24 h, 48 h, 5, 7, 14 dias	Não testa
Assenza et al., 2012	Indireta	<i>P. aeruginosa</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.1 µL	10 ⁸	28 dias (troca meio a cada 7 dias)	Não testa

*Teste de viabilidade bacteriana no interior do implante ao final do experimento na técnica indireta.

Jansen et al. (1997) avaliaram a infiltração bacteriana em implantes com 13 tipos de combinações diferentes com o pilar protético. Dez implantes de cada tipo foram inoculados com 0,5 µL de uma suspensão de *Escherichia coli* e os respectivos pilares foram parafusados. Os conjuntos foram colocados em tubos de ensaio contendo

meio de cultura e observados por 14 dias, armazenados em estufa bacteriológica. Os orifícios de acesso aos parafusos foram obliterados com resina acrílica. A turvação do meio de cultura indicou a passagem bacteriana pela interface. Na maioria dos casos de turvação, esta ocorreu nos dois primeiros dias. O experimento foi repetido até que se obtivesse 15 amostras sem contaminação externa imediata. Todos os sistemas apresentaram infiltração, variando de 16 a 100%. O menor índice de infiltração ocorreu no sistema Frialit-2 com uma anilha de silicone no pilar. Como alternativa, os autores sugerem a cobertura das áreas de contato com metais dúcteis.

Piattelli et al. (2001) compararam a infiltração bacteriana e de fluidos entre pilares cimentados e parafusados. Seis conjuntos de cada foram imersos em azul de toluidina para avaliar o manchamento de um fragmento de papel colocado no interior do implante. Outros seis conjuntos receberam 20 µL de meio de cultura estéril em seu interior, e foram parcialmente imersos em uma solução com *Pseudomonas aeruginosa*. Os conjuntos cimentados foram modificados para criar uma entrada na porção oca do implante, obliterada posteriormente por um miniparafuso. Após 72 h de incubação, o líquido do interior do implante foi removido e semeado em placas de Petri contendo ágar cetrimida. Todos os implantes com pilares parafusados apresentaram infiltração, tanto por corante quanto por bactérias. Por outro lado, nenhum implante com pilar cimentado apresentou infiltração.

Dibart et al. (2005) testaram a infiltração bacteriana em implantes de conexão cônica, tanto pela técnica direta quanto pela indireta. Primeiramente, 10 amostras foram imersas em uma mistura de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus oralis* e *Fusobacterium nucleatum* em caldo de cultura. Após 24 h de incubação em condições anaeróbicas, as paredes internas do implante foram observadas em MEV à procura de bactérias. Em seguida, os mesmos conjuntos foram esterilizados e quatro pilares foram inoculados com

0,1 µL da mesma mistura bacteriana em ágar, sendo que três deles foram parafusados a implantes e um, não (controle positivo). Outro conjunto não foi inoculado (controle negativo). As cinco amostras foram imersas em caldo de cultura e incubadas por 72 h. A cada 24 h, 20 µL do caldo foi semeado para verificar o possível crescimento bacteriano, e o experimento foi repetido três vezes. Não houve contaminação das paredes internas em nenhum implante, pela técnica direta, assim como não houve turvação do caldo de nenhum implante, pela técnica indireta. Observou-se uma fenda menor que 0,5 µm, considerada menor do que as bactérias utilizadas, mesmo sendo estas de pequeno diâmetro (0,4 µm).

Steinebrunner et al. (2005) avaliaram cinco sistemas de implantes (n=8), inoculando seu interior com 5 µL de uma solução de *E. coli*. As amostras foram parcialmente submersas em caldo de cultura estéril e submetidas a ciclagem mecânica até 1.200.000 ciclos. Em intervalos progressivos, 0,5 mL do caldo era colhido e semeado. Todas as amostras apresentaram infiltração bacteriana. Os autores presumiram que a carga cíclica sobre os pilares pode induzir uma micromovimentação dos mesmos, aumentando a fenda e promovendo um efeito de “bombeamento” entre os meios interno e externo do implante.

Duarte et al. (2006) testaram o efeito selador de dois materiais aplicados sobre a plataforma do implante: um verniz de clorexidina e timol e um silicone. Foram avaliados cinco sistemas de implantes (n=5) para cada material, sendo quatro hexágonos externos e um interno, e mais dois implantes de cada sistema serviram como controle (sem material selador). Os implantes foram imersos em solução de *Enterococcus faecalis* e um implante de cada sistema foi aberto nos períodos de 7, 21, 35, 49 e 63 dias, para os grupos teste. Os implantes do grupo controle foram abertos em sete e 14 dias. A solução bacteriana foi trocada a cada sete dias. Para o grupo controle, amostras com infiltração foram observadas após sete dias, enquanto que para os grupos testados, só foram observadas após 35 dias. Entretanto, não houve diferença entre

os dois materiais testados, e nenhum foi capaz de impedir a infiltração bacteriana após 63 dias. O maior número de infiltrações ocorreu no hexágono interno, porém, não foi aplicado um teste estatístico para comparar os sistemas.

do Nascimento et al. (2008) compararam a infiltração bacteriana em pilares calcináveis e pré-fabricados, sobre implantes HE. Dez amostras de cada foram inoculadas com 3 μ L de suspensão de *Fusobacterium nucleatum* e submersos em caldo de cultura. Os orifícios de acesso ao parafuso foram obliterados com guta-percha e adesivo de cianoacrilato. Após 14 dias de incubação em condições anaeróbicas, apenas uma amostra de cada grupo apresentou turvação do meio externo, ambas no terceiro dia.

A metodologia descrita anteriormente (do Nascimento et al., 2008) foi comparada à técnica de *DNA checkerboard hybridization* (Barbosa et al., 2009). Após a incubação, os pilares foram desparafusados dos implantes e o conteúdo do interior dos implantes e das roscas dos parafusos foi coletado com um *microbrush*. Para o grupo 1, os *microbrushes* foram inseridos em tubos com solução tamponada estéril, que foi agitada, diluída em série e semeada em placas de Petri com meio de cultura para posterior contagem de colônias. Os tubos com os *microbrushes* do grupo 2 foram processados para a técnica de *DNA checkerboard hybridization*. Um experimento semelhante foi realizado com a coleta de amostras do interior dos implantes imediatamente após a inoculação. Como resultado, três amostras de cada grupo apresentaram turvação do meio externo. Os valores obtidos pela técnica de *DNA checkerboard hybridization* foram significativamente maiores do que os da técnica convencional. Nos dois métodos, detectaram-se menos microrganismos após 14 dias do que imediatamente após a inoculação, sugerindo redução da viabilidade bacteriana e danos ao seu material genético ao longo do tempo.

Outro estudo utilizou a técnica de *DNA checkerboard hybridization* para comparar pilares pré-fabricados e calcináveis (do Nascimento et al., 2009a). Os implantes foram inoculados com 3 µL de uma solução de *S. sobrinus*, os pilares foram parafusados e os conjuntos, imersos em caldo de cultura e incubados por 14 dias. O conteúdo do interior dos implantes foi então coletado com *microbrush* e as amostras, processadas de acordo com a metodologia descrita por Barbosa et al. (2009). Em um grupo controle, foi coletado o conteúdo interno dos implantes imediatamente após a inoculação. Apenas duas amostras (uma para cada grupo) apresentaram contaminação, após 48 e 72 h. Entretanto, o número de bactérias no interior do implante foi significativamente menor para os pilares pré-fabricados em comparação aos calcináveis e ao controle.

O efeito do reapertamento do parafuso do pilar na infiltração bacteriana foi investigado (do Nascimento et al., 2009b). Vinte pilares foram parafusados a vinte implantes HE, divididos em dois grupos: no primeiro, o parafuso foi apertado até o torque recomendado pelo fabricante; no segundo, o parafuso foi apertado, solto e reapertado com o mesmo torque. Os conjuntos foram imersos em solução contendo *S. mutans* e incubados por 14 dias. Ao final, os implantes foram abertos e o conteúdo de seu interior, coletado com *microbrush*. Pela técnica de *DNA checkerboard hybridization*, a quantidade bacteriana foi contabilizada. O número de microrganismos foi maior no grupo 2, sugerindo que a infiltração bacteriana aumenta quando o parafuso é solto e reapertado repetidas vezes.

Dois desenhos de conexão interna foram comparados em um estudo de Tesmer et al. (2009): uma conexão cônica e uma conexão trilobular. Em outro grupo de conexão cônica foi confeccionada uma canaleta vertical nos pilares, para assegurar a penetração bacteriana. As amostras (n=10) foram imersas em solução de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* e incubadas por cinco dias em anaerobiose. Os pilares

foram então removidos, o conteúdo de suas roscas foi coletado com hastes de algodão e semeado em placas com meio de cultura específico, para contagem de colônias. Os implantes com conexão cônica e pilares convencionais apresentaram menos penetração bacteriana.

Deconto et al. (2010) avaliaram a infiltração bacteriana em dois tipos de pilares de conexão cônica: sólidos e com parafuso passante. Dez conjuntos de cada foram inoculados com 0,3 µL de uma solução de *E. coli*, submersos em caldo de cultura e incubados por sete dias. Sobre os pilares foram cimentados cilindros metálicos para evitar a passagem de fluidos pelo orifício do parafuso. Dois conjuntos foram usados como controles positivo e negativo. Não houve diferença significativa entre os dois grupos. Nas amostras onde houve infiltração, a turbidez do caldo foi observada em 24 h.

Dois sistemas de conexão cônica foram avaliados por Aloise et al. (2010): Bicon e Ankylos. Dez implantes de cada foram inoculados com 0,1 µL de solução contendo *S. sanguinis*, imersos em caldo de cultura e acompanhados por 14 dias. Um tubo com caldo estéril foi considerado controle negativo, e outro, com caldo inoculado com a mesma quantidade da solução bacteriana, considerado controle positivo. Foram observadas duas turvações para cada grupo, ambas no segundo dia.

Um estudo de Ricomini Filho et al. (2010) investigou o torque de remoção e a infiltração bacteriana em implantes HE e de conexão cônica, submetidos a termociclagem e fadiga mecânica. Foram avaliados quatro sistemas, e metade dos implantes foram ciclados (n=5 ou 6), sendo posteriormente esterilizados e imersos em solução de *S. sanguinis*. Após incubação de três dias, os conjuntos foram desinfetados com álcool 70% e os pilares, removidos. O torque de remoção foi mensurado e o material do interior do implante foi coletado com cone de papel e este, incubado em caldo estéril. A turbidez do caldo indicou penetração bacteriana. Os valores de destorque foram maiores após a

ciclagem. Todas as conexões cônicas apresentaram infiltração bacteriana, independente da ciclagem. Os implantes HE não apresentaram infiltração bacteriana.

Koutouzis et al. (2011) também avaliaram o efeito da ciclagem mecânica sobre a infiltração bacteriana. Dois sistemas de implantes com conexão cônica interna (convencional e com quatro sulcos) foram ciclados em um simulador de desgaste submersos em solução de *E. coli* (n=14) por 46 h. Ao final, os pilares foram removidos, coletando-se material de suas roscas com hastes de algodão, para posterior semeadura e contagem de colônias. Os implantes com quatro sulcos apresentaram maior infiltração, maior contagem de colônias e menor torque de remoção.

Estudos recentes investigaram a penetração de bactérias provenientes da saliva humana em implantes HE (do Nascimento et al., 2011, 2012b). Os implantes foram imersos em saliva diluída e incubados por setes dias, após os quais seu conteúdo interno foi coletado com *microbrushes*. A presença de bactérias foi avaliada pela técnica convencional de cultura de células e pela técnica de *DNA checkerboard hybridization*. Foram observadas taxas de penetração bacteriana de 40% e 100%. As duas técnicas mostraram-se igualmente eficazes na detecção da frequência de infiltração bacteriana.

Teixeira et al. (2011) avaliaram a passagem de *S. sobrinus* pela interface de implantes HI e de conexão cônica (n=10), por meio das técnicas direta e indireta. Pela técnica indireta, inocularam 0,5 µL da suspensão bacteriana nos implantes CC e 2 µL nos implantes HI. O período de incubação foi de 14 dias na técnica direta e 7 dias na indireta. Não houve diferença significativa entre os implantes de diferentes conexões protéticas, independente da técnica utilizada. Apesar de os autores não compararem as técnicas estatisticamente, os percentuais de infiltração foram próximos: 100% para HI nas duas técnicas e 70% para CC na técnica direta e 77,7% na indireta.

Dias et al. (2012) pesquisaram a infiltração de *E. coli* em implantes HE de cinco sistemas de implantes nacionais (n=10). Os implantes foram inoculados com 0,3 µL da suspensão bacteriana e incubados por 14 dias. A infiltração bacteriana foi verificada somente em um sistema (Dentoflex), ocorrida após 24 h de incubação, em duas amostras. Os autores também mediram a microfenda, e não foi possível detectar relação entre seu tamanho e a infiltração bacteriana.

Assenza et al. (2012) compararam a infiltração bacteriana em implantes com diferentes conexões protéticas: trilobo interno, com pilar cimentado e conexão cônica. Utilizaram dois microrganismos, *P. aeruginosa* e *A. actinomycetemcomitans*, e inocularam 0,1 µL no interior dos implantes (n=10). O experimento foi acompanhado por 28 dias, sendo o meio trocado a cada sete dias. Dos 10 implantes de cada grupo, houve infiltração em seis implantes de trilobo, um de conexão cônica e nenhum de pilar cimentado.

Além dos trabalhos apresentados, outros também investigaram a passagem bacteriana através da interface implante/pilar *in vitro*, utilizando a técnica indireta (Amaral, 2003; Cravinhos, 2003; Oliveira, 2006; Faria, 2008). A ocorrência de infiltração bacteriana foi observada em graus variados entre diferentes sistemas de implantes, não sendo encontrada diferença significativa entre conexões HE e HI (Oliveira, 2006) ou entre HE, HI e CC (Faria, 2008). Também não foi encontrada correlação entre o tamanho da fenda e a infiltração bacteriana (Amaral, 2003; Oliveira, 2006).

A microinfiltração através da interface implante/pilar é dependente do torque aplicado ao parafuso. Gross et al. (1999) avaliaram a infiltração de corante em cinco diferentes sistemas de implantes, aplicando torques de 10 Ncm (torque manual habitual), 20 Ncm (torque manual máximo) e o recomendado pelos fabricantes (até 35 Ncm). Quanto maior o torque, menos infiltração foi observada, possivelmente resultado de uma interface mais justa. No torque recomendado, o sistema

de conexão cônica (ITI) apresentou mais infiltração do que os sistemas de interface plana.

Alguns autores sugeriram alternativas para reduzir a infiltração bacteriana em implantes. Besimo et al. (1999) sugeriram a aplicação de um verniz com clorexidina na plataforma do implante, na base do pilar e no parafuso. Segundo os autores, o verniz preveniu a infiltração *in vitro* de *S. aureus* pela interface; no entanto, não foi utilizado um grupo controle sem verniz para comparação. D'Ercole et al. (2009) avaliaram *in vivo* a efetividade de um gel de clorexidina a 1%. Amostras microbiológicas foram coletadas da superfície interna de implantes, três meses após o término do tratamento restaurador. No grupo teste, a cavidade interna dos implantes foi preenchida com o gel, enquanto nenhum tratamento foi dado ao grupo controle. Após três meses, novas amostras foram colhidas. A contagem bacteriana total mostrou-se menor no grupo teste em comparação com o grupo controle. Nayak et al. (2011, May 16 [Epub ahead of print]) observaram *in vitro* uma menor infiltração de *Enterococci* ao selarem a interface implante/pilar com um anel de polissiloxano (*O-ring*) ou com um gel antibacteriano (*Gapseal*). Entretanto, o efeito destes agentes como seladores da interface parece ser transitório. O desenvolvimento de um selamento definitivo, que não perdesse seu efeito antibacteriano ao longo do tempo seria interessante.

A aderência bacteriana aos implantes e seus componentes depende das características de suas superfícies, como a rugosidade e a energia livre de superfície. Superfícies rugosas de titânio apresentam maior aderência de bactérias do que superfícies lisas (Wu-Yuan et al., 1995), pois possuem uma área duas a três vezes maior, além de abrigarem bactérias contra forças de cisalhamento. Um estudo *in vivo* no qual discos de titânio foram expostos ao meio bucal por 24 h concluiu que superfícies com rugosidade média ($Ra \leq 0,088 \mu\text{m}$ e $Rz \leq 1,027 \mu\text{m}$) inibiram a formação de biofilme (Rimondini et al., 1997). Adicionalmente, um substrato com baixa energia de superfície acumula menos biofilme,

pois há uma diminuição na resistência adesiva entre bactérias e substrato (Quirynen et al., 1993). Assim, a redução da rugosidade da superfície do pilar protético em contato com o implante possivelmente reduziria a penetração bacteriana e suas consequências clínicas.

Modificações e coberturas da superfície do titânio têm sido propostas para conferir um efeito antibacteriano a estas superfícies, reduzindo a aderência microbiana e a ocorrência de infecções associadas aos implantes ortopédicos e dentários. Alguns exemplos são as modificações por nitreto de titânio (TiN) ou nitreto de zircônio (ZrN), o tratamento com radiação ultravioleta, as coberturas poliméricas antiadesivas, e as coberturas contendo prata, flúor, antibióticos, entre outros. As coberturas com antibióticos promovem uma liberação gradual destas substâncias, porém, seu efeito dura apenas alguns dias (Zhao et al., 2009).

Kim et al. (2005) afirmaram que a deposição de um filme de carbono tipo diamante (DLC, *Diamond Like Carbon*) sobre a plataforma de um implante de conexão externa aparentemente reduziu a rugosidade de sua superfície, além de aumentar a resistência ao desgaste e à soltura do parafuso protético. Estes autores depositaram um filme de DLC sobre a plataforma de 10 implantes, sobre uma camada de silício para promover a adesão do DLC ao titânio, obtendo uma espessura final de 1 μm . O filme foi depositado pela técnica de deposição de vapor químico assistida por plasma (PECVD). Outros 10 implantes não receberam filme, servindo como grupo controle. Os pilares foram parafusados aos implantes e os conjuntos, submetidos a ciclagem mecânica até a soltura do parafuso. O número de ciclos necessários para a soltura do parafuso foi significativamente maior no grupo com filme em comparação ao controle.

Os filmes de DLC parecem ser promissores na modificação da superfície dos implantes e seus componentes, reduzindo sua rugosidade e, conseqüentemente, diminuindo a aderência microbiana

a estas superfícies. Além disso, a eles podem ser incorporados elementos bactericidas, como a prata, conferindo um efeito antimicrobiano duradouro. Assim, o estudo de suas propriedades merece especial atenção.

2.5 Nanofilmes de carbono tipo diamante (DLC)

Em diversas áreas da ciência e da indústria, a deposição de um filme nanométrico sobre a superfície de um material pode contribuir para a melhoria de algumas propriedades deste material, como por exemplo, torná-lo mais resistente ao desgaste, diminuir o atrito quando em contato com outras superfícies, dificultar a aderência de microrganismos, etc. Um exemplo de filme com esta capacidade é o carbono tipo diamante (DLC, *Diamond Like Carbon*). Seu uso é bastante amplo como revestimentos protetores em janelas ópticas, discos rígidos magnéticos, peças de motores de automóveis e aviões, próteses médicas, dispositivos microeletromecânicos, entre outros (Robertson, 2002). Na Odontologia, é utilizado sobre roscas de parafusos protéticos em sistemas de implantes osteointegrados para reduzir a ocorrência clínica de afrouxamento dos parafusos, pois aumenta a pré-carga e reduz o coeficiente de atrito (Martin et al., 2001; Kim et al., 2005). A redução de forças friccionais também foi demonstrada em fios ortodônticos cobertos com DLC (Muguruma et al., 2011). Além destas aplicações, o DLC vem sendo estudado como uma alternativa para tratar a superfície de implantes (De Maeztu et al., 2007). Pesquisas recentes com filmes nanométricos como tratamento de superfície de cerâmicas a base de zircônia têm revelado melhora da adesão entre estas cerâmicas e cimentos resinosos (Piascik et al., 2009, 2011).

O diamante é um mineral formado exclusivamente por átomos de carbono. O átomo de carbono possui 6 elétrons, sendo 4 elétrons localizados na camada de valência, mais superficial, responsáveis pelas ligações interatômicas. No seu estado fundamental, os elétrons do átomo de carbono se encontram distribuídos nos orbitais s e p , porém, ao ser ligar a outro átomo, estes orbitais se modificam e formam orbitais híbridos, sp . Dependendo da ligação ocorrida, estes orbitais podem ser do tipo sp^3 , sp^2 ou sp^1 . O carbono pode formar uma ampla variedade de estruturas, tanto cristalinas quanto amorfas, justamente por poder existir nas três diferentes hibridizações. No diamante são encontradas hibridizações do tipo sp^3 . No grafite, hibridizações sp^2 . Nos filmes de carbono amorfo, há uma mistura das três hibridizações (Robertson, 2002).

O DLC é uma forma metaestável do carbono amorfo que contém uma quantidade significativa de hibridizações sp^3 . Possui propriedades similares às do diamante, como dureza mecânica e módulo elástico elevados, baixo coeficiente de atrito, transparência óptica, elevada resistência ao desgaste e estabilidade química. Eles são produzidos como filmes finos isotropicamente desordenados com limites de grãos não definidos. São muito mais fáceis de produzir do que o diamante, e apresentam vantagens para muitas aplicações (Robertson, 2002).

Associado às suas propriedades físicas, os filmes de DLC são biocompatíveis (Morrison et al., 2006), podem apresentar ação bactericida e fungicida, e podem ainda ter suas biocaracterísticas modificadas pela incorporação de nanopartículas (V, Ti, F, H, Ag) no interior de sua microestrutura. A incorporação de partículas de prata pode ser particularmente vantajosa devido a seu conhecido efeito bactericida (Grill, 2003; Zhou et al., 2008; Marciano et al., 2009c).

A microestrutura dos filmes de carbono amorfo hidrogenado pode ser explicada por um modelo conhecido como modelo

dos aglomerados (*clusters*), que permite explicar as relevantes propriedades destes filmes. Segundo este modelo, a estrutura dos filmes pode ser descrita como pequenos aglomerados de carbono sp^2 , anéis grafiticos e/ou aromáticos distorcidos, interconectados por carbonos sp^3 . Também se pode falar do arranjo estrutural como um composto bifásico, onde os aglomerados de carbono sp^2 estão imersos em uma matriz de carbonos sp^3 . Nos filmes de DLC existe uma grande variedade de tipos estruturais que podem se arranjar geometricamente de diversas formas: anéis, cadeias e tetraedros. Esta diversidade de estruturas dificulta sua completa caracterização (Robertson, 2002; Bonetti, 2008; Fissmer, 2010).

As propriedades dos filmes de DLC dependem da energia com que os íons de hidrocarbonetos bombardeiam a superfície do substrato. Os filmes de carbono amorfo podem ser hidrogenados (a-C:H), e o aumento de hidrogênio torna o filme menos duro, mais frágil, mais transparente e com características poliméricas. Eles podem ser transparentes (aumentando-se a energia de impacto), sendo que o aumento da espessura os torna mais opacos. As propriedades mais importantes, como alta dureza e densidade, são obtidas com níveis de energia intermediários. Os filmes com espessuras inferiores a 1000 Å são razoavelmente transparentes na região visível do espectro. Filmes de DLC com espessura de 2000 Å são marrons avermelhados, enquanto que filmes mais espessos tendem a ser completamente opacos (Bonetti, 2008).

Os filmes de DLC possuem um alto índice de refração, entre 1,8 e 2,3, que em geral diminui com o aumento da concentração de hidrogênio, e uma baixa dispersão. Eles têm densidade de massa entre 1,4 a 3,4 g/cm³, dependente da energia do íon incidente. Obtém-se a maior densidade nos filmes mais duros, com baixa concentração de hidrogênio. Em geral, os filmes de DLC podem atingir durezas de 9 a 40 GPa. Possuem baixo coeficiente de atrito (entre 0,01 e 0,28) e são

bastante resistentes ao desgaste, mesmo em condições extremas de uso e sem lubrificantes (Bonetti, 2008).

A condutividade elétrica observada nestes filmes é usualmente da ordem de 10^{-10} a $10^{-12} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$. A adição de nanopartículas (chamadas dopantes) causa aumento da condutividade. Os filmes de DLC são extremamente resistentes a ataques químicos por ácidos ou bases, e são estáveis em temperaturas de até 400°C (Robertson, 2002; Bonetti, 2008).

A maior desvantagem na deposição de filmes duros de DLC se relaciona à baixa adesão destes filmes a metais e cerâmicas, causada pela alta tensão residual (interna e externa) destes revestimentos e pela baixa reatividade do carbono com a superfície do substrato. A tensão residual interna é em geral consequência de defeitos e impurezas na estrutura. Ela usualmente aumenta com a espessura do filme no começo do crescimento, alcança um valor máximo a certa espessura e decresce até um valor constante à medida que a espessura do filme aumenta. A tensão residual externa será tanto maior quanto maior for a aderência e quanto maior for a diferença de coeficiente de dilatação térmica entre o substrato e o filme de DLC (Bonetti, 2008).

Diferentes procedimentos têm sido aplicados com o objetivo de reduzir a tensão residual dos filmes de DLC usando diferentes técnicas de deposição e de preparação do substrato. A superfície pode ser preparada pela adição de intercamadas, como por exemplo, pela deposição de um filme fino adicional entre o substrato e o filme de DLC, ou pela sua modificação via subimplantação iônica e/ou difusão de elementos químicos. Entre os procedimentos mais utilizados para obter interfaces que favoreçam a aderência dos filmes de DLC podemos citar: (1) deposição de camadas finas de diferentes metais; (2) dopagem ou implantação de vários elementos químicos; (3) formação de estruturas de multicamadas; (4) difusão térmica combinada com a tensão de aceleração de íons no começo da deposição; e (5) tratamentos térmicos da

superfície. Uma camada intermediária, por exemplo, de silício, entre os diferentes tipos de substrato e os filmes de DLC tem sido amplamente utilizada para aumentar a aderência destes revestimentos. As melhores adesões são obtidas em substratos que formam carbetos, como o Si, Fe e Ti (Sheeja et al., 2002; Bonetti, 2008).

2.6 Técnicas de deposição dos nanofilmes

Existem vários processos de deposição de filmes finos. Para o caso dos filmes de DLC, a característica comum a eles é o fato de os íons de carbono ou hidrocarbonetos possuírem um nível médio de energia de cerca de 100 eV. O impacto destes íons no filme em crescimento induz a hibridização sp^3 , que promove propriedades desejáveis aos mesmos. Os principais processos envolvem a deposição pela fase de vapor e podem ser divididos em duas grandes áreas: PVD (*Physical Vapour Deposition*) e CVD (*Chemical Vapour Deposition*). Na deposição por PVD, a geração e o transporte de vapores da fonte até o substrato são feitos por meios físicos. Os átomos de carbono são arrancados de uma fonte geradora sólida, chamada de alvo, em consequência de um bombardeamento iônico, e são transportados em uma direção preferencial, depositando-se sobre o substrato (Robertson, 2002).

O processo de deposição por CVD envolve uma reação química de compostos voláteis para produzir um composto químico não volátil que será depositado sobre o substrato. Diversas técnicas utilizam o processo por CVD, destacando-se entre elas a técnica assistida por plasma (PECVD – *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*), que foi utilizada neste trabalho. Neste processo, gases contendo os precursores químicos para a formação do filme desejado são inseridos

em uma câmara a uma pressão sub-atmosférica, mantida por bombas de vácuo. Uma fonte de energia aplicada ao sistema dissocia o gás, gerando um plasma e formando espécies altamente reativas (elétrons, íons, moléculas e radicais neutros) que se depositam na superfície da amostra. A fonte de energia utilizada pode ser de radiofrequência (RF), corrente contínua (DC – *Direct Current*), micro-ondas ou pulsada (Robertson, 2002; Bonetti, 2008).

O reator utilizado na técnica PECVD é formado por dois eletrodos. O menor deles, polarizado com tensão negativa, é o catodo, onde são colocados os substratos (porta-amostras). O outro eletrodo (anodo) é formado pelas paredes do reator e está sempre aterrado. No plasma, os elétrons possuem maior mobilidade em relação aos íons, originando o surgimento de uma região chamada bainha perto dos eletrodos, na qual há maior densidade de íons positivos. Na bainha, os íons positivos são acelerados, propiciando o bombardeamento necessário para a formação das hibridizações sp^3 (Robertson, 2002; Bonetti, 2008).

2.7 Incorporação de nanopartículas e efeito bactericida

Uma das grandes vantagens de se inserir nanopartículas em filmes finos é a de combinar as propriedades dos filmes com as propriedades das nanopartículas. Essa combinação gera novas características que estão além das características de cada componente individualmente. Um elemento que pode ser incorporado ao filme de DLC é a prata, conhecida por sua ação bactericida. Além dessa propriedade, os filmes com prata produzem menos partículas desgastadas, liberam menos gases originários de produtos de reação e apresentam redução das tensões internas. Assim, a produção de filmes com estas características pode ser interessante na Odontologia, reduzindo a

colonização bacteriana sobre materiais odontológicos, com suas consequências biológicas benéficas (Grill, 2003; Marciano et al., 2009c).

A prata apresenta amplo espectro antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas em concentrações muito baixas, e inibe a aderência microbiana aos biomateriais. Ela é pouco propensa ao desenvolvimento de resistência bacteriana e seu efeito antibacteriano é duradouro. Estudos *in vitro* demonstraram que as coberturas com prata possuem excelente biocompatibilidade sem genotoxicidade ou citotoxicidade, e estudos *in vivo* indicaram que estas coberturas não produzem efeitos colaterais locais ou sistêmicos (Zhao et al., 2009).

Uma série de estudos de Marciano et al. (2009a, 2009c, 2011) avaliou o efeito bactericida de filmes de DLC e DLC dopados com prata, depositados sobre amostras de aço inoxidável e silício. As amostras foram divididas em três grupos (sem filme, com filme de DLC e com filme de DLC e prata). Elas foram submersas em soluções bacterianas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* e *S. aureus*, e incubadas por 3 ou 24 h. Após este período, as soluções foram observadas em espectrofotômetro, mensurando-se a variação na absorvância óptica, que é correlacionada à concentração bacteriana. Houve redução da concentração bacteriana média para as amostras com filmes de DLC, sendo ainda mais marcante para os filmes dopados com prata. Os autores também observaram que a ação bactericida dos filmes ocorre por contato, e que ela se mantém estável ao longo do tempo, até 24 h. Após 3 h, o filme com prata apresentou ação bactericida duas vezes maior do que o filme de DLC puro, mas após 24 h a diferença entre os dois não foi significativa. O número de camadas contendo prata dentro do filme de DLC (de quatro a dez) não influenciou sua capacidade antimicrobiana.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a influência da deposição de filmes de DLC na infiltração bacteriana pela interface entre pilares protéticos e implantes osteointegrados. Os objetivos específicos são:

- a) Comparar a frequência de infiltração bacteriana pela interface implante/pilar protético entre implantes HE e HI;
- b) Comparar a frequência de infiltração bacteriana entre um filme de DLC e um filme de DLC dopado com nanopartículas de prata;
- c) Avaliar a aderência microbiana aos filmes de DLC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O material utilizado neste estudo está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Nome comercial, fabricante e composição do material utilizado

Material	Nome Comercial	Fabricante	Composição
Implante HE	Master Easy-Grip Porous	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP grau 4
Implante HI	Master Connect AR	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP grau 4
Pilar protético HE	Pilar preparo AR 5.0x4.0 Hex. Ext. 3.75/4.0	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP grau 2
Pilar protético HI	Pilar preparo AR 5.0x1.0 Hex. Int. 3.75/4.0	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP grau 2
Parafuso HE	Parafuso Ucla Hexagonal MS 3.75/4.0	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP (grau não informado)
Parafuso HE	Parafuso Ucla C/CAR	Conexão Sistemas de Prótese	Ti CP (grau não informado)

4.2 Métodos

4.2.1 Deposição dos filmes de DLC

Lâminas de Ti CP (14 x 14 mm) foram utilizadas como substratos iniciais para a deposição dos filmes de DLC, a fim de se determinar as condições ideais de deposição para a obtenção de filmes de boa qualidade e com boa aderência ao substrato. Estas lâminas foram também utilizadas para a caracterização dos filmes. Todos os procedimentos de deposição foram realizados no Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP, Brasil.

As lâminas foram lixadas manualmente de ambos os lados com lixa d'água de granulação 800 para padronização das superfícies. Previamente à deposição dos filmes, elas foram limpas em uma cuba ultrassônica por 15 min em álcool etílico a 92,3%. Um segundo processo de limpeza consistiu em uma descarga em plasma de argônio, realizada dentro do reator de deposição, durante 10 min. Este processo promove uma limpeza mais efetiva do substrato por meio do bombardeamento de íons de argônio, que é um gás inerte e não modifica sua superfície, mas remove óxidos e impurezas superficiais. É também muito importante para a aderência do filme ao substrato.

Os filmes de DLC foram depositados pela técnica de deposição química a vapor assistida por plasma (PECVD). Todo o processo a plasma foi realizado em uma câmara a vácuo cilíndrica de 18 L (Figura 1A), bombeada por uma bomba mecânica capaz de atingir uma pressão de base de $7,5 \times 10^{-4}$ Torr (medida por sensores de pressão do tipo *ion gauge* e *penning*). O plasma foi gerado por uma fonte de potência DC negativa pulsada com frequência de 20 kHz (Figura 1B), sendo o porta amostras (Figura 2) polarizado com a tensão negativa

(catodo) e o corpo do reator (anodo), aterrado. O fluxo de gases foi controlado por meio de fluxímetros. A potência de deposição foi mantida em torno de 200 W. A tensão do catodo e a corrente elétrica foram mantidas constantes durante todo o processo de deposição.



Figura 1 – A) reator para deposição dos filmes de DLC por PECVD; B) fonte de descarga contínua acoplada ao reator.

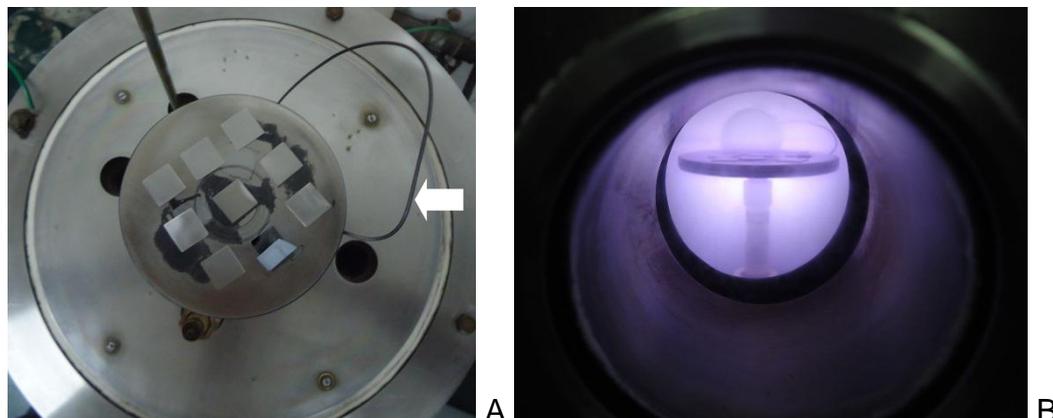


Figura 2 – A) porta-amostras no interior do reator (aberto) com oito amostras de titânio e uma de silício, antes do processo de deposição (a seta indica o termopar acoplado ao porta-amostras); B) vista do porta-amostras durante o processo de deposição, em plasma de argônio, através da janela do reator.

Previamente à deposição do filme de DLC, foi necessário depositar um filme de silício (Si) e manter a amostra aquecida a uma temperatura entre 350 e 700 °C para garantir a boa aderência do filme de

DLC à superfície de titânio (Schauer, Winter, 2008). A deposição do silício foi feita a partir de um plasma de hexametildisiloxano (HMDSO, $C_6H_{18}OSi_2$), um líquido volátil. A deposição do filme de DLC foi feita a partir de plasma de metano (CH_4), e a deposição do filme dopado com prata, a partir de vapor de hexano (C_6H_{14}) contendo nanopartículas de prata da ordem de 30 a 50 nm (proveniente de suspensão de prata em hexano a 0,5 g/L).

Para dar início ao processo de deposição, o sistema foi bombeado até obter uma pressão de $7,5 \times 10^{-4}$ Torr na câmara. O processo de deposição do filme de DLC consistiu de quatro etapas:

- a) Aquecimento das amostras até $430^\circ C$ em plasma de argônio, a uma pressão de $3,0 \times 10^{-1}$ Torr e fluxo de 20 sccm, por 30 min. A tensão foi mantida em -900 V durante todo o processo.
- b) Deposição de HMDSO, variando-se a pressão para $1,0 \times 10^{-2}$ Torr a partir da pressão de base do argônio, durante 30 min.
- c) Injeção de metano a 13 sccm, ainda na presença de HMDSO, por 10 min, para a obtenção de uma intercamada entre o filme de silício e o DLC. A pressão foi mantida a $1,6 \times 10^{-1}$ Torr.
- d) Deposição do filme de DLC propriamente dita, fechando-se o fluxo de HMDSO e mantendo um fluxo de metano em 13 sccm e de argônio em 5 sccm. Esta etapa teve duração de 90 min, a uma pressão de $1,1 \times 10^{-1}$ Torr.

Para a deposição do filme de DLC dopado com prata (DLC-Ag), as duas primeiras etapas foram repetidas, seguidas de:

- a) Injeção de $0,7 \times 10^{-2}$ Torr de hexano com nanopartículas de prata ainda na presença de HMDSO. Esta etapa teve duração de 5 min, e a pressão final foi de $8,0 \times 10^{-2}$ Torr.
- b) Deposição do filme de DLC-Ag propriamente dita, fechando-se o fluxo de HMDSO e se reduzindo o argônio a 5 sccm. A mesma pressão da etapa anterior foi mantida, e a duração desta etapa foi de 90 min.

Durante as deposições de DLC-Ag, a suspensão de hexano com prata foi agitada em ultrassom para que as partículas pudessem se dispersar homoganeamente.

4.2.2 Caracterização dos filmes de DLC

A caracterização foi realizada nos filmes de DLC e DLC-Ag depositados sobre lâminas de Ti CP, como descrito anteriormente.

4.2.2.1 Medida da espessura

Durante a deposição dos filmes de DLC, juntamente às amostras de titânio, foi colocado sobre o porta-amostras um substrato de silício para cada procedimento de deposição. Este substrato foi parcialmente coberto com um fragmento de silício para que o filme fosse depositado apenas em uma parte, formando um degrau entre as partes com filme e sem filme. Mediu-se a altura do degrau para determinar a espessura do filme e a taxa de deposição.

A medida da espessura dos filmes foi feita em um perfilômetro mecânico (Alpha-Step 500, Tencor, EUA), disponível no Laboratório Associado de Sensores e Materiais (LAS), do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (Figura 3). Nesta técnica, uma ponta de diamante desliza em linha reta sobre uma superfície, determinando sua topografia (Bonetti, 2008).

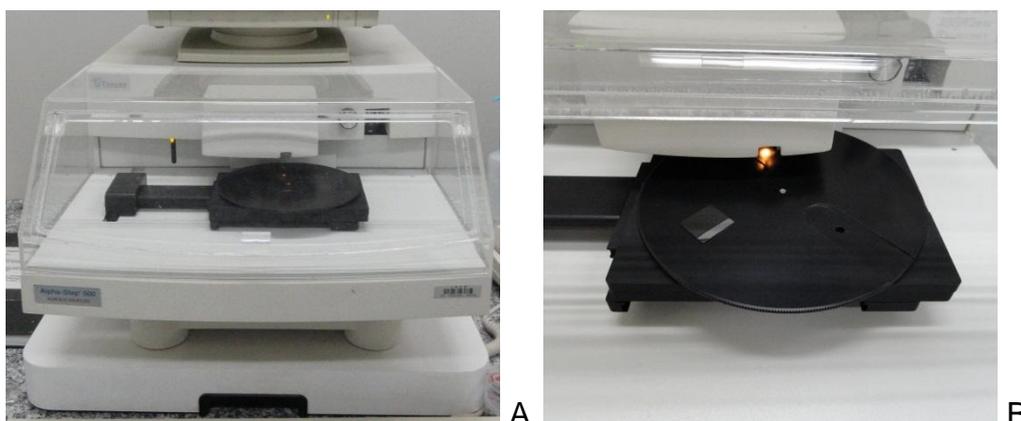


Figura 3 – A) perfilômetro utilizado para medir a espessura dos filmes de DLC; B) amostra de silício parcialmente coberta com filme em perfilômetro.

4.2.2.2 Espectroscopia de Espalhamento Raman

A qualidade dos filmes de DLC e DLC-Ag, depositados sobre substratos de titânio, foi avaliada por meio da espectroscopia de espalhamento Raman. Esta técnica fornece informações sobre a estrutura de materiais como o DLC e é bastante utilizada por ser relativamente simples e não destrutiva. As análises foram feitas em um espectrômetro Raman Renishaw 2000 (Gloucestershire, Reino Unido) com um laser de argônio de comprimento de onda de 514,5 nm, disponível no LAS/INPE (Figura 4). A calibração foi feita a partir de uma amostra de diamante.



Figura 4 – Sistema utilizado para a análise de espectroscopia de retroespalhamento Raman.

O espectro obtido para o diamante tem uma única banda característica, centrada em 1332 cm^{-1} , enquanto que o espectro do cristal de grafite tem uma banda centrada em 1580 cm^{-1} , denominadas “G”. O grafite desordenado apresenta uma segunda banda, centrada em 1350 cm^{-1} , denominada banda “D”, que está relacionada à desordem do material. Os espectros Raman típicos de materiais de carbono amorfo apresentam as duas bandas G e D, centradas em torno de 1560 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} , respectivamente. A Figura 5 mostra um espectro Raman típico de um filme de DLC.

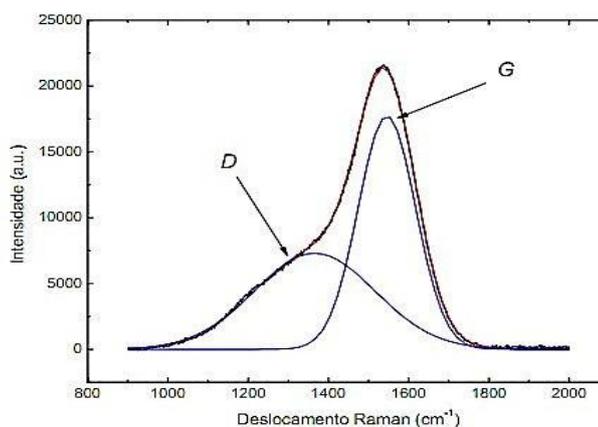


Figura 5 – Espectro Raman típico de um filme de carbono amorfo hidrogenado obtido por PECVD em plasma de metano (Bonetti, 2008).

Os espectros obtidos foram analisados com o auxílio do programa computacional *OriginPro 8*.

4.2.2.3 Análise tribológica

A tribologia é a ciência que estuda o efeito do movimento relativo entre dois corpos, estudando o atrito, o desgaste e a lubrificação. Neste trabalho foram avaliados os coeficientes de atrito do Ti CP e dos filmes de DLC e DLC-Ag, além da aderência dos filmes ao substrato. O equipamento utilizado foi o tribômetro modelo UMT-CETR (Bruker, Campbell, EUA) do Laboratório de Nanotecnologia e Plasma da Universidade do Vale do Paraíba (Univap) (Figura 6A).

O teste de aderência do filme consiste na aplicação, por uma ponta de diamante, de uma força crescente e deslizante sobre a amostra, suficiente para quebrar o filme e atingir o substrato (Figura 6B). O sistema possui ainda um detector acústico e um sistema de aquisição de dados que mostra graficamente o comportamento dos parâmetros analisados. A carga crítica é aquela em que o filme começa a se quebrar e/ou delaminar, o que é indicado pelo aumento repentino no coeficiente de atrito (pois o coeficiente de atrito do substrato é maior do que o do filme) e/ou pelo aumento da intensidade do sinal acústico. Neste trabalho os testes foram realizados com uma ponta de diamante Rockwel C, a força aplicada variou de 0,20 a 20 N, a 0,1 mm/s, percorrendo uma distância de 100 mm.

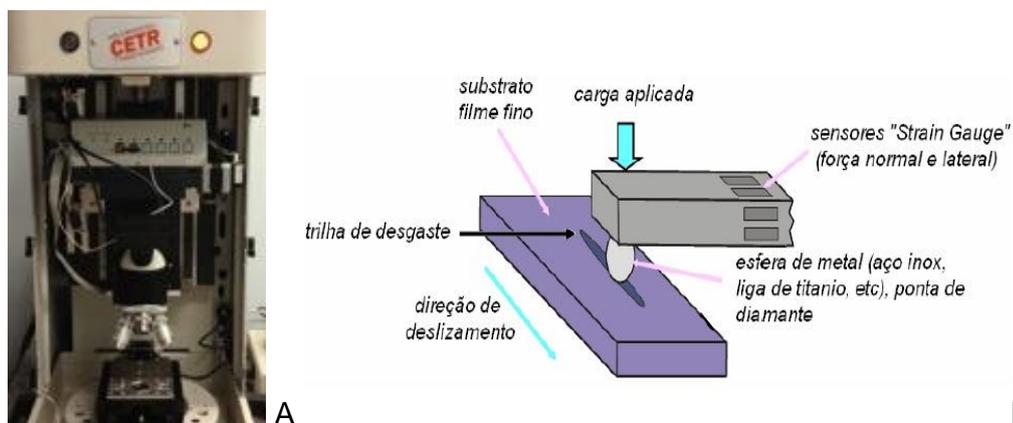


Figura 6 – A) tribômetro utilizado para os testes de coeficiente de atrito e aderência dos filmes; B) esquema representativo do funcionamento de um tribômetro típico (Bonetti, 2008).

Para as medidas do coeficiente de atrito, a amostra foi presa na base e se moveu linearmente em movimentos de ida e volta sob a ponta aplicadora. Foi utilizada uma ponta esférica de 4 mm de diâmetro de aço inox SS 440, com uma carga de 2 N, a 5 mm/s, por 500 ciclos, percorrendo uma distância de 5 mm.

Os testes foram realizados a uma temperatura de 24,6 °C e umidade relativa de 47%.

4.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Algumas amostras foram observadas em MEV (Inspect S50, FEI, Eindhoven, Holanda) e sua análise química foi feita por EDS, acoplado ao microscópio (Figura 7). A energia utilizada foi de 15 kV. A técnica de EDS se utiliza do princípio de que todo elemento químico emite raios-x característicos ao ser atingido por um feixe de elétrons. A detecção destes raios-x permite identificar os elementos químicos

presentes em uma amostra, quantificá-los e determinar sua distribuição relativa.



Figura 7 – Microscópio eletrônico de varredura.

4.2.2.5 Rugosidade

A análise de rugosidade superficial foi realizada em rugosímetro (SJ-400, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão) (Figura 8). Este instrumento mede a rugosidade superficial por contato, por meio de uma ponta em balanço que desliza sobre a superfície em um único eixo sob velocidade constante, movimentando-se verticalmente e registrando o perfil da superfície. Foram analisadas 14 amostras de cada condição (Ti CP sem filme, com filme de DLC e com filme de DLC-Ag), sendo obtidas médias de duas medições por amostra, em direções perpendiculares entre si. O parâmetro avaliado foi a rugosidade média (R_a).



Figura 8 – Amostra em rugosímetro.

4.2.2.6 Ângulo de contato (goniometria)

A análise do ângulo de contato foi realizada em um goniômetro (modelo 500, Ramé-Hart Instrument Co., Netcong, EUA) do Departamento de Física do ITA (Figura 9). O ângulo de contato é uma medida indireta da energia livre de superfície de um sólido, sendo inversamente proporcional a esta. A análise foi realizada com cinco gotas de água deionizada, em temperatura ambiente. O volume da gota foi de aproximadamente 12 μL . Os valores de ângulo de contato foram determinados com o auxílio do programa computacional *DROPimage Advanced*.



Figura 9 – Goniômetro utilizado para medida do ângulo de contato.

4.2.3 Verificação da aderência microbiana aos filmes de DLC

Lâminas de Ti CP foram divididas em 3 grupos (N=45; n=15): Grupo Controle – nenhum tratamento; Grupo DLC – deposição de filme de DLC; e Grupo DLC-Ag – deposição de filme de DLC dopado com prata. A aderência microbiana foi analisada por meio de um modelo de biofilme de microcosmo, modificado de Cheng et al. (2011).

Um adulto saudável, sem cárie ou doença periodontal e que não fez uso de antibióticos nos três meses anteriores à coleta foi selecionado para doação de saliva. O doador não realizou higiene bucal durante 24 h e não ingeriu alimentos ou líquidos por 2 h antes da coleta da saliva. Foram coletados 10 mL de saliva estimulada por mastigação em frasco coletor estéril. Durante a coleta, a saliva foi mantida em gelo. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo).

A saliva coletada foi filtrada em compressa de gaze para remover resíduos sólidos e diluída em glicerol estéril na concentração final de 30%. A mistura saliva-glicerol foi armazenada a -6°C em alíquotas de 2 mL até o uso.

A face não tratada das lâminas de titânio foi recoberta com uma camada de esmalte para unhas para padronização do

experimento, e elas foram esterilizadas em autoclave (AHMC, Sercon Indústria e Comércio, Mogi das Cruzes, Brasil) a 121 °C a 1 atm por 15 min. Os biofilmes foram formados sobre as lâminas estéreis em placas de cultura de células de 24 poços. Os poços foram preenchidos com 1,5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, Laboratório Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, EUA) suplementado com 0,2% de sacarose. Foram adicionados 30 µL da mistura saliva-glicerol em cada poço, e as placas foram agitadas em plataforma agitadora (Modelo PSU-2T, BioSan, Riga, Letônia) por 5 min (Figura 10).



Figura 10 – Placas de 24 poços com meio de cultura em plataforma agitadora.

As lâminas de titânio foram suspensas nos poços por um fio ortodôntico, de modo que ficassem em posição vertical e que a proporção da lâmina exposta ao meio de cultura fosse padronizada (Figuras 11 e 12). As placas foram incubadas em microaerofilia, em estufa de CO₂ a 5% (MCO-17AC, Sanyo, San Diego, EUA), a 37 °C.

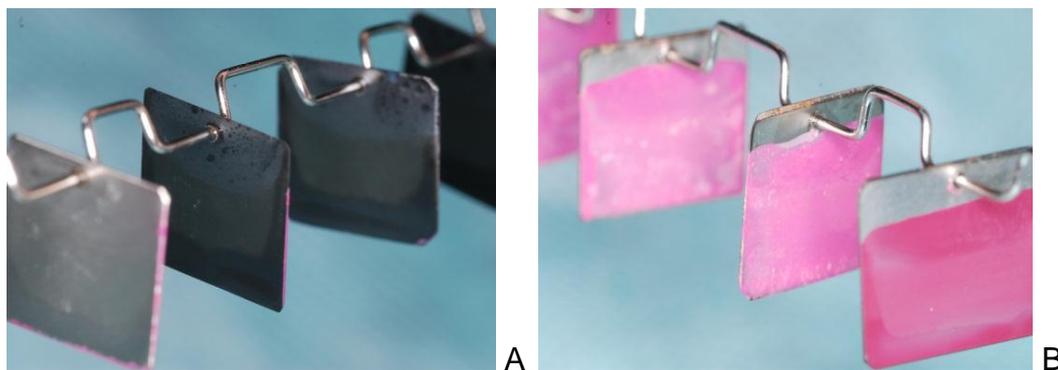


Figura 11 – Lâminas de titânio suspensas em fio ortodôntico. A) face experimental; B) face não tratada, coberta com esmalte de unhas para padronização.



Figura 12 – Lâminas de titânio em meio de cultura. As lâminas ficaram suspensas a 1 mm do fundo dos poços.

O meio de cultura foi trocado após 8 e 24 h do início da incubação. Após 48 h de incubação, as lâminas contendo biofilme foram lavadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), para remoção dos microrganismos não aderidos, e transferidas para novas placas de 24 poços contendo 1,5 ml de solução fisiológica estéril em cada poço. Estas placas foram agitadas em cuba ultrassônica por 5 min em potência alta, para desprendimento do biofilme aderido às lâminas.

A suspensão resultante foi diluída em série até 10^{-2} e 0,1 mL de cada diluição foi semeado em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion Agar*, Laboratório Difco, BD

Diagnostic Systems). As placas foram incubadas em microaerofilia por 48 h, para posterior contagem de microrganismos aeróbicos e facultativos.

4.2.4 Verificação da infiltração bacteriana pela interface implante/pilar

Neste estudo, 180 conjuntos formados por implantes de 4.0 x 13 mm, pilares protéticos de preparo retos e parafusos hexagonais de titânio (Conexão Sistemas de Prótese, São Paulo, Brasil) foram divididos em seis grupos (n=30), conforme o Quadro 3.

Quadro 3 – Delineamento dos grupos de pesquisa

Grupo	Tipo de Conexão	Tratamento do Pilar Protético
Ex	Hexágono Externo	Nenhum tratamento
ExC	Hexágono Externo	Deposição de Filme de DLC
ExAg	Hexágono Externo	Deposição de Filme de DLC-Ag
In	Hexágono Interno	Nenhum tratamento
InC	Hexágono Interno	Deposição de Filme de DLC
InAg	Hexágono Interno	Deposição de Filme de DLC-Ag

Para a deposição dos filmes de DLC sobre os pilares protéticos, foram confeccionados porta-amostras especiais, nos quais somente a base dos pilares ficava voltada para o plasma (Figura 13). Isto foi feito com o intuito de que o filme se depositasse apenas na face do pilar que entraria em contato com o implante, pois sua coloração é cinza-escuro, o que seria uma desvantagem estética em situação clínica (Figura 14). Para os pilares HI, foi necessário mantê-los em plasma de Ar durante

3 h previamente à deposição, para limpeza total da camada anodizada proveniente de fábrica.

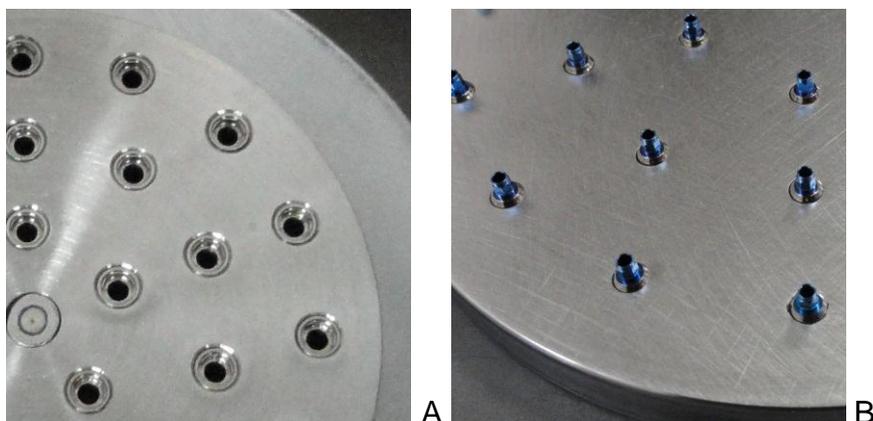


Figura 13 – Pilares protéticos posicionados em porta-amostras para deposição dos filmes de DLC. A) pilares HE; B) pilares HI.



Figura 14 – Pilares após deposição de filmes de DLC (HE à esquerda e HI à direita).

A técnica de deposição dos filmes nos pilares seguiu o mesmo processo descrito no item 4.2.1, com algumas pequenas modificações:

- a) Tanto para o filme de DLC quanto para o de DLC-Ag foi utilizado o hexano como gás precursor;

- b) Na deposição do filme de DLC-Ag, o tempo de deposição na quarta etapa foi reduzido de 90 min para 65 min.

Estas medidas visaram padronizar a espessura dos filmes obtidos, pois a diferença de espessura poderia influenciar na infiltração bacteriana pela interface implante-pilar.

A técnica utilizada neste estudo para a verificação da infiltração bacteriana foi a indireta (ou reversa), ou seja, a inoculação de bactérias no interior do implante e observação de sua passagem para o meio externo, assumindo-se que o fluxo bacteriano pode ocorrer nesta direção da mesma forma que na direção oposta (do meio externo para o interior do implante) (Traversy, Birek, 1992).

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico, no interior de uma câmara de fluxo laminar (BioSeg 12, Veco, Campinas, Brasil), forrada com campos cirúrgicos estéreis. Todo o instrumental, as soluções e os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a vapor (121 °C a 1 atm por 15 minutos) e toda a manipulação foi realizada com luvas estéreis. Os pilares protéticos e os parafusos também foram esterilizados em autoclave, enquanto que os implantes são fornecidos estéreis pelo fabricante.

O microrganismo utilizado foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), um anaeróbio facultativo bastante resistente e de fácil cultura, que pode estar presente na cavidade oral por contaminação oro-fecal. Ele é encontrado em raspados ósseos intra-orais (Choquet et al., 2001), colonizando implantes craniofaciais (Toljanic et al., 1995) e no periápice de dentes endodonticamente tratados (Zoletti et al., 2006). Também já foi isolado de pacientes com doença periodontal (Sun et al., 2009). O microrganismo foi semeado por esgotamento em placas contendo ágar BHI. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% por 24 h para possibilitar o crescimento bacteriano.

Cada implante foi fixado a uma morsa estéril. Com o auxílio de uma micropipeta, foi inoculado no interior do implante 1 μL de uma suspensão de *E. faecalis* (10^6 células/mL), padronizada em espectrofotômetro (Modelo B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 760 nm e absorvância óptica de $0,298 \pm 20$, como visto na Figura 15. O inóculo foi inicialmente preparado em solução fisiológica e, após atingir a concentração desejada, foi centrifugado (centrífuga Jouan BR4i, Thermo Electron Corp., Madison, EUA) e ressuspenso em caldo BHI. A quantidade inoculada foi determinada em estudo piloto previamente realizado, inoculando-se 1 μL e 2 μL , parafusando-se o pilar e se observando o possível extravasamento para o meio externo.



Figura 15 – Inoculação de 1 μL de suspensão de *E. faecalis* no interior de um implante, seguro por uma morsa estéril.

Após a inoculação, os pilares foram parafusados aos implantes com torque de 20 Ncm, de acordo com a recomendação do fabricante, por meio de um torquímetro manual (SIN Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) e mantidos por 5 s (Figura16).



Figura 16 – Torque de 20 Ncm sendo aplicado ao parafuso do pilar protético por um torquímetro manual.

Para verificar a possível contaminação externa imediata durante a execução da metodologia, cada conjunto implante/pilar foi imerso em caldo BHI em um tubo *ependorf*, cobrindo-se a interface, por 30 s (Figura 17). Os tubos *ependorfs* foram incubados a 37 °C em estufa de CO₂ a 5% por 48 h. As amostras que apresentaram turvação do meio, sinalizando crescimento bacteriano, foram descartadas do estudo.



Figura 17 – Implante imerso por 30 s em caldo BHI, imediatamente após inoculação, para verificação de possível contaminação externa imediata.

Em seguida, cada conjunto foi envolto com fio para amarrilho de Cr-Ni de 0,3 mm de espessura, sendo por ele suspenso e estabilizado em um tubo de ensaio de vidro. Este procedimento foi realizado para que somente a região da interface entre o pilar e o implante se mantivesse em contato com o meio de cultura, descartando-se a possibilidade de saída de bactérias pelo orifício de acesso ao parafuso (Figura 18). Um tubo contendo apenas caldo BHI estéril foi usado como controle negativo; outro tubo contendo caldo BHI com 1 μ L da suspensão bacteriana serviu como controle positivo. Os tubos foram então incubados a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%.

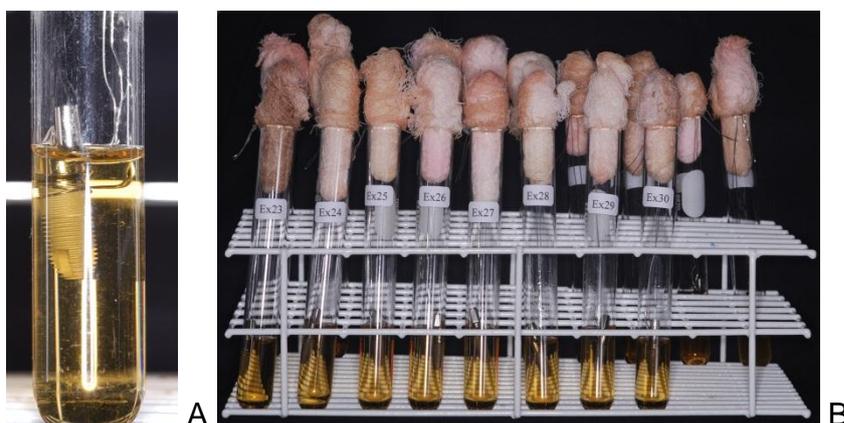


Figura 18 – Amostras em meio de cultura. A) conjunto implante/pilar suspenso por fio de amarrilho em caldo BHI, com o caldo acima da interface; B) tubos de ensaio contendo os conjuntos suspensos em caldo, para incubação em estufa de CO₂.

Foi realizado acompanhamento diário por cinco dias para verificação da possível passagem de bactérias do interior do implante para o caldo. O indicativo da ocorrência de infiltração pela interface foi a turvação do meio de cultura. O tempo de acompanhamento foi determinado em estudo piloto, no qual as amostras foram acompanhadas por 3, 5 e 7 dias. Cinco dias foi o tempo máximo em que todas as amostras apresentaram viabilidade bacteriana.

Nas amostras que apresentaram turvação do meio, foi realizada a coloração de Gram do caldo turvo para certificação da presença de *E. faecalis*. A coloração e a morfologia bacterianas foram observadas em microscópio óptico, e a ocorrência de contaminação externa determinaria a exclusão da amostra.

Após os cinco dias de incubação, os conjuntos foram abertos em ambiente estéril (interior da câmara de fluxo laminar), e o interior dos implantes foi preenchido com solução salina (NaCl 0,9%) estéril (10 µL para os implantes HE e 15 µL para os implantes HI - quantidades determinadas em estudo piloto). Um cone de papel endodôntico estéril número 80 (Tanari Ind. Ltda., Manaus, Brasil) foi inserido no interior de cada implante, onde permaneceu por 1 min para absorção do conteúdo. O cone foi removido e inserido em um tubo *ependorf* com 0,5 mL de solução salina estéril (Figura 19). Um segundo cone foi inserido no interior do implante, sendo realizada uma amostragem das paredes internas, e posteriormente também inserido no mesmo tubo *ependorf*. O tubo *ependorf* com os cones foi agitado em vórtex (Vixar, Plymouth, EUA) por 1 min, para que as bactérias presentes nos cones fossem homogeneizadas na solução, e esta foi diluída em série até 10^{-2} em solução salina estéril. Uma alíquota de 0,1 mL da solução inicial e de suas diluições foi semeada em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI. Após 24 h de incubação a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%, procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas. Em caso de não crescimento bacteriano, indicativo de ausência de viabilidade celular, a amostra foi excluída do estudo.

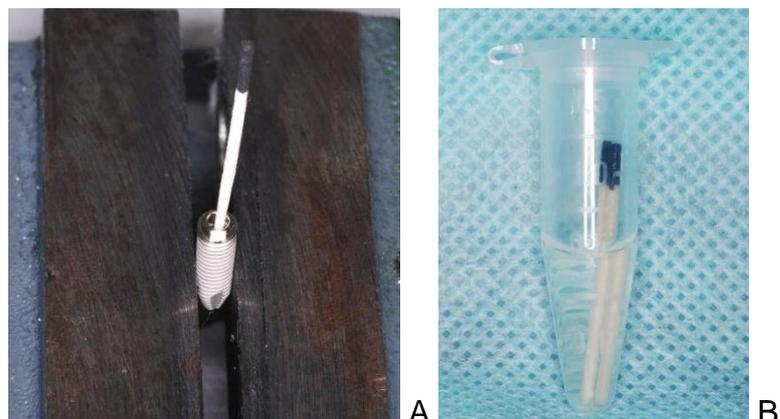


Figura 19 – A) cone de papel inserido no interior do implante, após remoção do pilar, para absorção da solução inserida; B) cones de papel em *ependorf* com solução fisiológica.

Ao final do experimento, um conjunto HE e um HI foram preparados para observação em MEV. Ambos os conjuntos não apresentaram infiltração bacteriana pela interface. As amostras foram lavadas com PBS e fixadas em glutaraldeído 2,5% por 2 h. Em seguida, foram imersas em álcool 70% e deixadas em geladeira por 8 h. Foram, então, desidratadas em uma sequência de álcoois (75, 85 e 95%), permanecendo 20 min em cada solução. Após secagem em temperatura ambiente, receberam cobertura de ouro e foram observadas ao MEV.

4.2.5 Análise estatística

Os dados de Ra foram comparados por análise de variância (Anova 1 fator).

Os dados de UFC/mL, por não apresentarem distribuição normal, foram transformados em logaritmos e submetidos a testes paramétricos.

Os resultados do experimento de aderência microbiana às lâminas de titânio foram analisados por Anova 1 fator e teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados de infiltração bacteriana na interface implante/pilar foram divididos em três análises: (1) a frequência de infiltrações foi analisada pelo teste exato de Fisher e pelo teste Qui-quadrado; (2) a ocorrência de infiltrações ao longo do tempo foi analisada pelo método de Kaplan-Meier, e as curvas de sobrevida foram comparadas por Log-rank; (3) a contagem de UFC/mL provenientes do interior dos implantes foi analisada por Anova 2 fatores e teste de comparações múltiplas de Tukey.

O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos filmes de DLC

5.1.1 Espessura

As espessuras médias dos filmes depositados sobre as lâminas de titânio, medidas por perfilômetro mecânico, foram de $1,58 \mu\text{m}$ para o filme de DLC e de $2,91 \mu\text{m}$ para o filme de DLC-Ag (Figura 20). Como o tempo de deposição foi o mesmo para os dois filmes, esta diferença de espessura provavelmente se explique pelo fato de cada molécula de metano, gás precursor para o filme de DLC, possuir apenas um átomo de carbono, enquanto que o hexano, precursor para o filme de DLC-Ag, possui seis átomos de carbono.

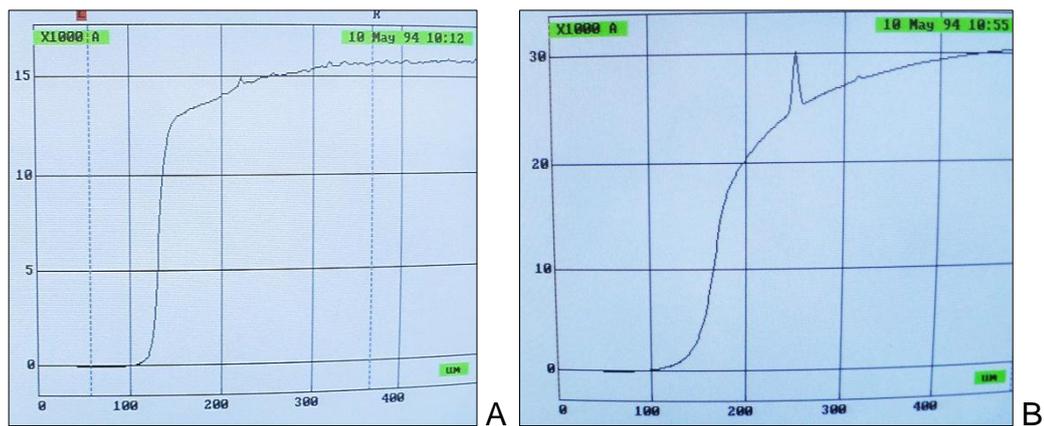


Figura 20 – Perfis da superfície de silício com filme. A) DLC; B) DLC-Ag. À esquerda dos gráficos, o substrato sem filme; à direita, com filme.

Após esta análise, alguns parâmetros de deposição foram modificados para a deposição dos filmes nos pilares protéticos (ver item 4.2.4), de forma que ambos os filmes sobre os pilares apresentaram espessura média de 1,3 μm .

5.1.2 Espectroscopia de Espalhamento Raman

As mudanças na posição, na largura e na intensidade das bandas G e D em um espectro Raman estão relacionadas a variações na microestrutura dos filmes, tais como a razão entre as hibridizações sp^3 e sp^2 do carbono, e o tamanho dos cristais presentes no filme (Bonetti, 2008). A Figura 21 mostra os espectros Raman dos filmes de DLC e DLC-Ag. Comparando-os com o espectro típico de um filme de DLC (Figura 5), nota-se que eles são bastante similares, mostrando que os filmes conseguidos são de boa qualidade. Comparando-se os dois filmes, observou-se que o filme de DLC-Ag apresentou um ligeiro deslocamento da banda G para valores menores, e maior altura de pico desta banda. Os valores de I_D/I_G foram 0,95 para o DLC e 0,94 para o DLC-Ag.

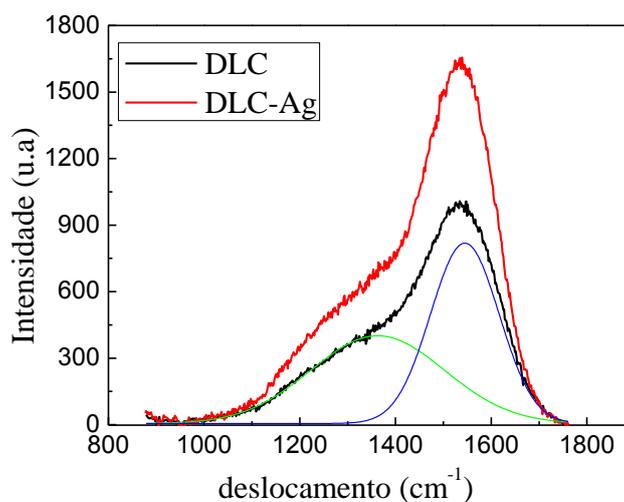


Figura 21 – Espectros Raman dos filmes de DLC e DLC-Ag. A linha azul faz referência à banda G e a linha verde, à banda D.

5.1.3 Análise tribológica

Os filmes de DLC apresentaram aderência ao substrato de Ti CP (Figura 22). A primeira trinca ocorreu com uma carga de aproximadamente 4,7 N para os dois filmes, a primeira exposição do substrato ocorreu com uma carga de 5,8 N para o DLC e 6,1 N para o DLC-Ag, e a delaminação do filme começou a ocorrer com 9,7 N para o DLC-Ag e não ocorreu para o DLC. As imagens da trilha produzida pela ponta de diamante mostram trincas arredondadas (em forma de concha) no filme ao redor da trilha, que são indicativos de falhas coesivas no filme, significando uma boa aderência. Não foi possível detectar as trincas utilizando emissão acústica, possivelmente pela rugosidade da amostra, que faz com que se tenha muito ruído.

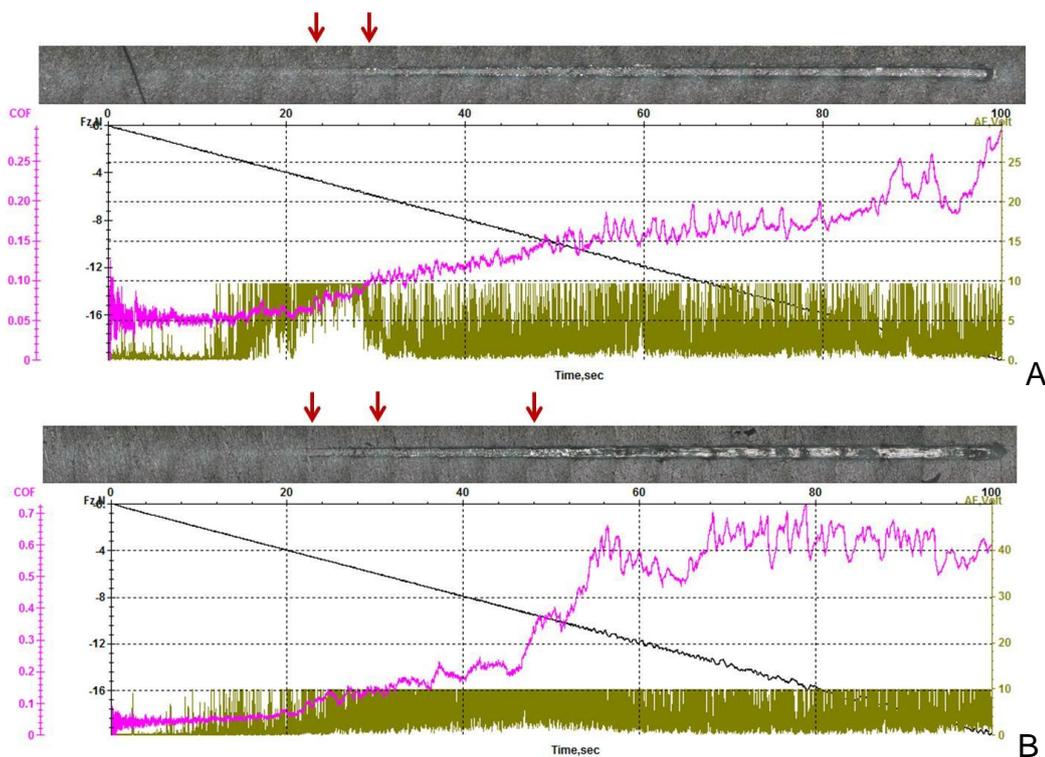


Figura 22 – Imagens (acima) e gráficos dos testes de aderência dos filmes de DLC ao substrato. A) DLC; B) DLC-Ag. As setas, da esquerda para a direita, indicam os momentos da primeira trinca, primeira exposição do substrato e início da delaminação (o DLC não sofreu delaminação). COF: coeficiente de atrito; Fz: força aplicada; AE: emissão acústica.

Os filmes reduziram o coeficiente de atrito das amostras. Os valores médios encontrados foram $0,46 \pm 0,14$ para o Ti CP, $0,15 \pm 0,02$ para o filme de DLC e $0,12 \pm 0,02$ para o filme de DLC-Ag (Figura 23).

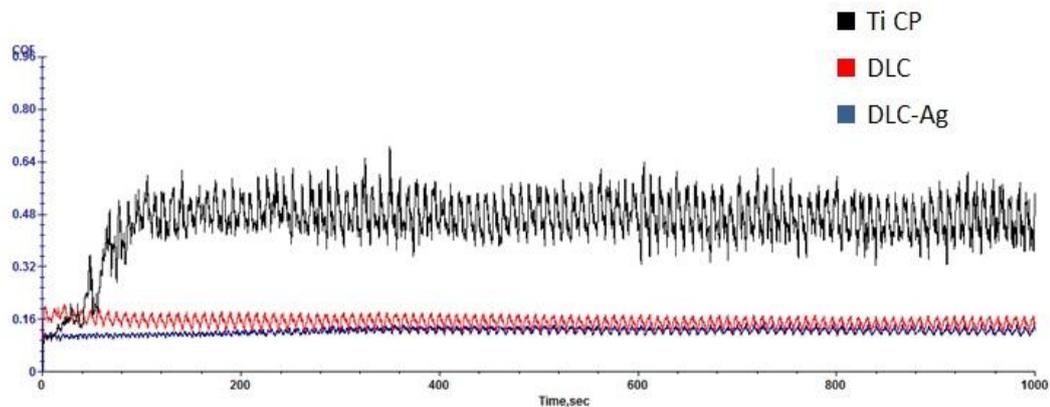


Figura 23 – Coeficientes de atrito.

5.1.4 MEV e EDS

A Figura 24 mostra fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de uma lâmina de Ti CP coberta com filme de DLC, cortada transversalmente. O filme aparece como uma camada mais clara na superfície, confirmado pela alta concentração de carbono mostrada pelo mapeamento por EDS.

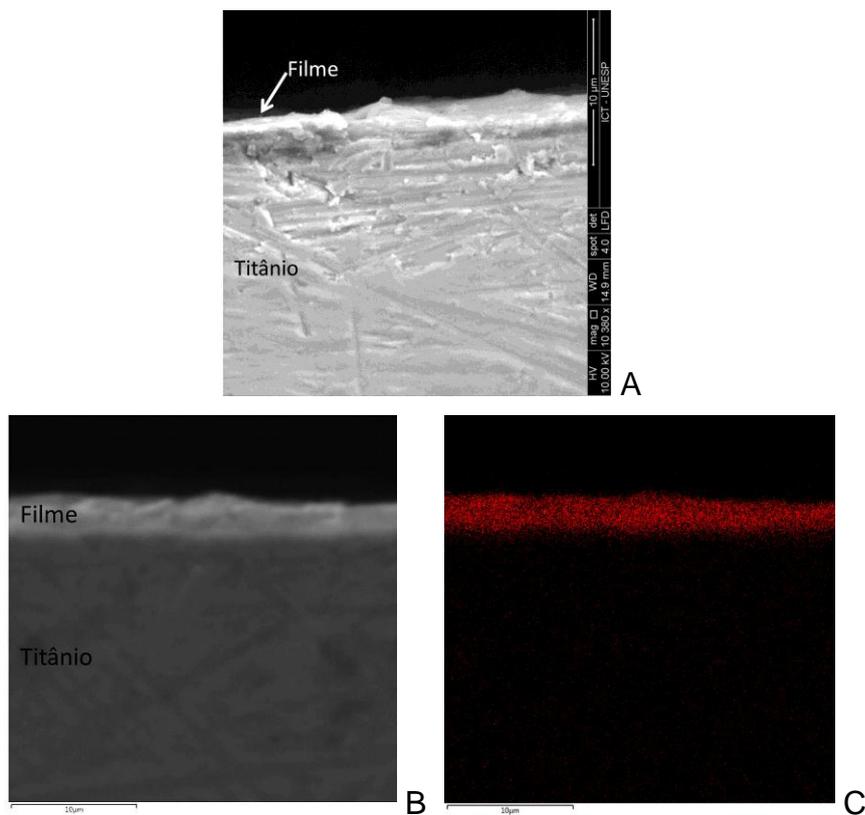


Figura 24 – Corte transversal de uma lâmina de Ti CP coberta com filme de DLC. A e B) fotomicrografias por MEV; C) mapeamento do carbono por EDS.

Os espectros gerados pela análise por EDS são apresentados na Figura 25. Pode-se observar que o espectro do filme de DLC também mostra a presença do elemento prata, possivelmente devido a resquícios deste elemento na câmara do reator. A análise quantitativa mostrou um percentual atômico de 95-96% de C, 1-3% de Si, 1-2% de Ti e 0,1-0,2% de Ag, para o filme de DLC-Ag, e de 85-91% de C, 4-6% de Si, 4-6% de Ti e 0,1-0,2% de Ag para o filme de DLC.

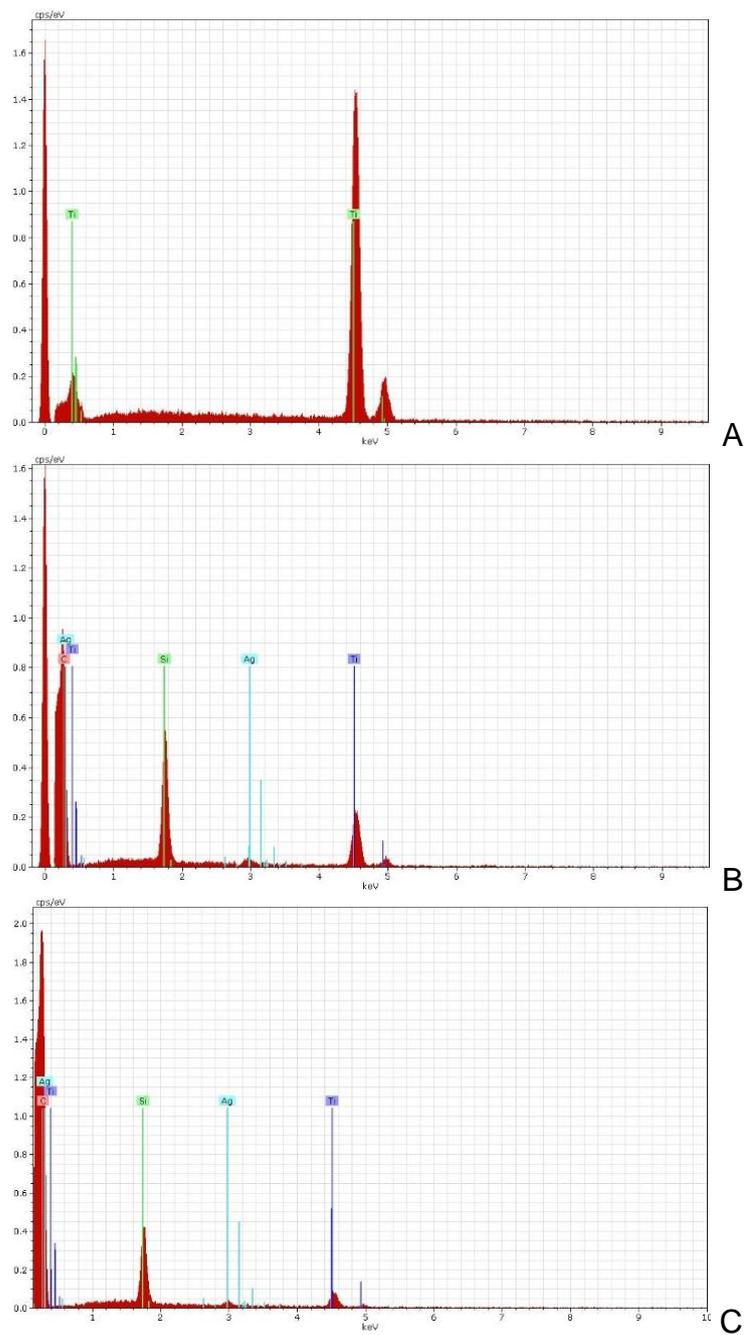


Figura 25 - Espectros de microanálise por EDS: A) substrato de Ti CP sem filme; B) filme de DLC; C) filme de DLC-Ag.

A Figura 26 mostra a distribuição dos elementos em uma amostra de DLC-Ag. Pode-se observar a distribuição homogênea da prata pela superfície.

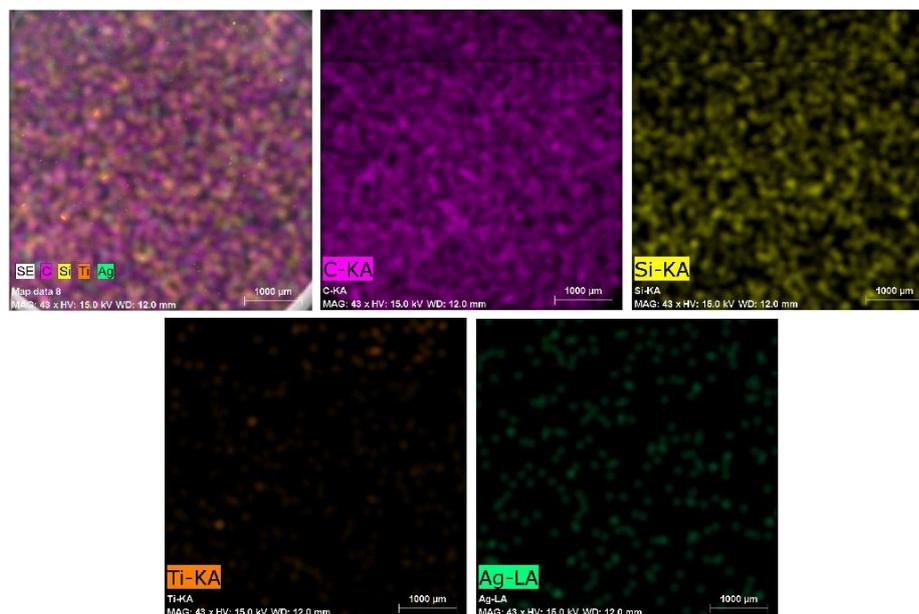


Figura 26- Mapeamento de microanálise por EDS da superfície de um filme de DLC-Ag sobre substrato de Ti CP.

5.1.5 Rugosidade

A rugosidade média (Ra) é mostrada na Tabela 1. Embora os filmes tenham reduzido em média a rugosidade, o teste de Anova 1 fator mostrou que esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,426$).

Tabela 1 – Rugosidade média (nm)

Grupo	Média	Desvio Padrão
Ti CP	245,0	19,8
DLC	241,4	33,5
DLC-Ag	229,3	41,8

5.1.6 Ângulo de contato

Os valores de ângulo de contato foram $65 \pm 3^\circ$ para o Ti CP, $74 \pm 2^\circ$ para o filme de DLC e $69 \pm 3^\circ$ para o filme de DLC-Ag. As imagens obtidas pelo goniômetro são apresentadas na Figura 27. Pode-se observar que os filmes aumentaram o ângulo de contato e, conseqüentemente, reduziram a energia livre de superfície do Ti CP, especialmente o filme de DLC.



Figura 27 – Imagens de goniometria com gotas de água deionizada. A) Ti CP; B) DLC; C) DLC-Ag.

5.2 Aderência microbiana aos filmes de DLC

O biofilme crescido sobre as lâminas de titânio despreendeu-se da superfície e ficou em suspensão na solução salina após agitação em cuba ultrassônica. As placas de Petri nas quais estas suspensões foram semeadas mostraram crescimento de colônias com características diversas, indicando a presença de diferentes microrganismos (Figura 28).



Figura 28 – Colônias com características diversas, indicando a presença de diferentes microrganismos provenientes do biofilme aderido às lâminas de titânio, pela metodologia de microcosmo.

A estatística descritiva do número de colônias (em 10^4 UFC/mL) provenientes do biofilme aderido às lâminas é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Estatística descritiva da contagem microbiana proveniente do biofilme aderido às lâminas de titânio ($\times 10^4$ UFC/mL)

Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Controle	40,00	19,92	16,60	82,40	36,10
DLC	33,33	14,03	17,40	56,10	27,02
DLC-Ag	25,36	19,25	8,10	60,20	20,15

A análise de variância (Anova 1 fator) dos dados após transformação logarítmica (\log_{10} UFC/mL) revelou diferença significativa entre os grupos ($P=0,04$). O teste de comparações múltiplas de Tukey mostrou que o grupo DLC-Ag apresentou aderência microbiana significativamente menor do que o grupo controle (Tabela 3 e Figura 29).

Tabela 3 – Teste de comparações múltiplas de Tukey (\log_{10} UFC/mL)

Grupo	Média (DP)	Grupos homogêneos
Controle	5,60 (0,25)	A
DLC	5,53 (0,22)	A B
DLC-Ag	5,36 (0,30)	B

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

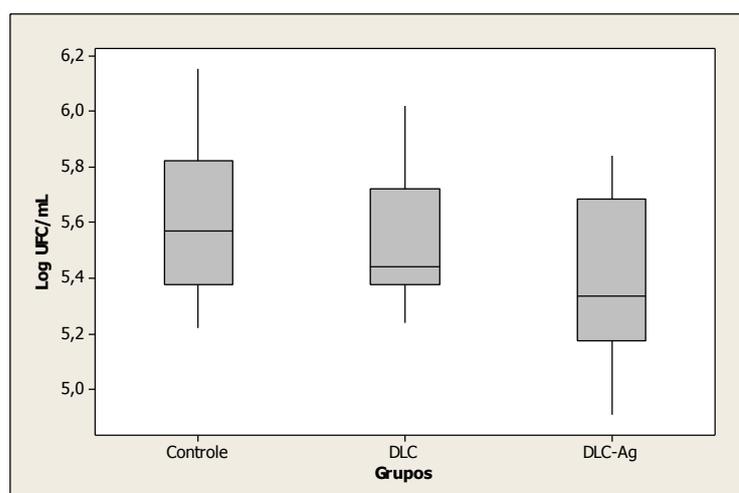


Figura 29 – Gráfico de caixa das distribuições do número de colônias microbianas provenientes do biofilme aderido às lâminas de titânio (\log_{10} UFC/mL).

5.3 Infiltração bacteriana pela interface implante/pilar

O Quadro 4 mostra as amostras excluídas do estudo. Oito amostras apresentaram contaminação externa imediatamente após a inoculação (Figura 30), a maioria em implantes HI. Duas amostras não apresentaram viabilidade bacteriana após cinco dias de incubação, sendo ambas em implantes HE.

Quadro 4 – Amostras excluídas do estudo

Grupo	Amostra excluída	Justificativa	n final
Ex	Ex3	Contaminação externa imediata	28
	Ex11	Inviabilidade bacteriana	
ExAg	ExAg16	Inviabilidade bacteriana	29
In	In2	Contaminação externa imediata	28
	In5	Contaminação externa imediata	
InC	InC20	Contaminação externa imediata	28
	InC27	Contaminação externa imediata	
InAg	InAg18	Contaminação externa imediata	27
	InAg20	Contaminação externa imediata	
	InAg30	Contaminação externa imediata	

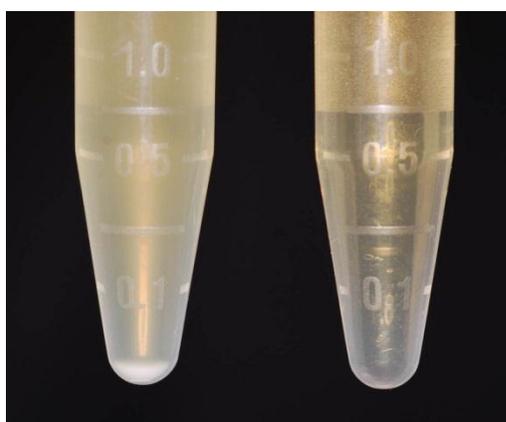


Figura 30 – Caldo de cultura à esquerda apresentando turvação, indicativo de contaminação externa imediata do implante. Caldo à direita límpido.

O número e a proporção de amostras em que houve infiltração bacteriana pela interface implante/pilar durante o período de incubação, determinada pela turvação do caldo de cultura, são apresentados na Tabela 4. A Figura 31 ilustra exemplos de amostras com e sem turvação do caldo.

Tabela 4 – Número e percentual de amostras com infiltração bacteriana em um período de 5 dias

Grupo	Número de infiltrações por dia de incubação					Total de infiltrações	Tamanho da amostra	Percentual de infiltrações
	1º	2º	3º	4º	5º			
	dia	dia	dia	dia	dia			
Ex	1	0	3	2	0	6	28	21,43%
ExC	0	0	5	0	1	6	30	20,00%
ExAg	0	0	1	1	0	2	29	6,90%
In	3	8	8	2	2	23	28	82,14%
InC	15	7	1	1	0	24	28	85,71%
InAg	6	10	1	1	2	20	27	74,07%
Total	25	25	19	7	5	81	170	47,68%

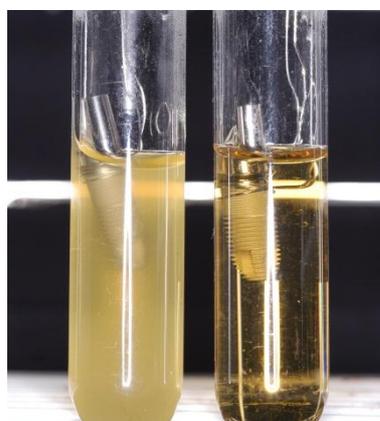


Figura 31 - Caldo de cultura à esquerda mostrando turvação, indicativo de infiltração bacteriana pela interface implante/pilar. Caldo à direita límpido, indicativo de que não ocorreu infiltração.

O percentual de infiltração bacteriana pela interface foi de 16,09% para os implantes HE e de 80,71% para os implantes HI. O teste exato de Fisher apontou diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de implantes ($P < 0,0001$).

Como a diferença entre os implantes HE e HI foi bastante significativa, a comparação das proporções de infiltração entre os diferentes tratamentos da base do pilar (sem filme, com filme de DLC e com filme de DLC-Ag) foi feita separadamente para cada tipo de implante, por meio do teste Qui-quadrado. Embora os filmes tenham reduzido o percentual absoluto de infiltração, as diferenças entre eles não foram estatisticamente significantes ($P=0,253$ para os implantes HE e $P=0,535$ para os implantes HI).

A Figura 32 mostra as curvas de sobrevivência geradas pelo método de Kaplan-Meier (probabilidade de ausência de infiltração até 5 dias). O evento considerado foi a turvação do caldo. O teste de Log-rank utilizado para comparar as curvas não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem filme, com filme de DLC e com filme de DLC-Ag ($P=0,255$ para HE e $P=0,084$ para HI).

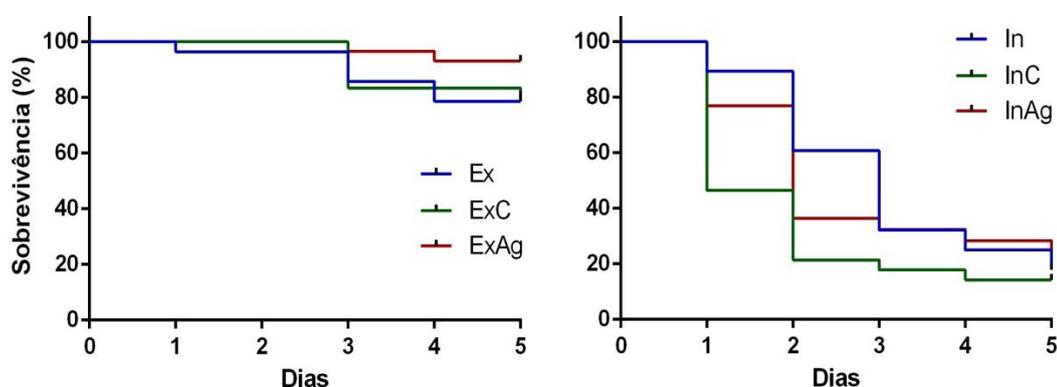


Figura 32 – Curvas de sobrevivência estimadas pelo método de Kaplan-Meier para os implantes HE (à esquerda) e HI (à direita).

A semeadura em placas de Petri da suspensão bacteriana proveniente do interior dos implantes após a remoção dos pilares protéticos resultou no crescimento de colônias típicas de *E. faecalis*, confirmado pela coloração de Gram e visualização em microscópio óptico (Cx41, Olympus Optical do Brasil, São Paulo, Brasil) (Figura 33).

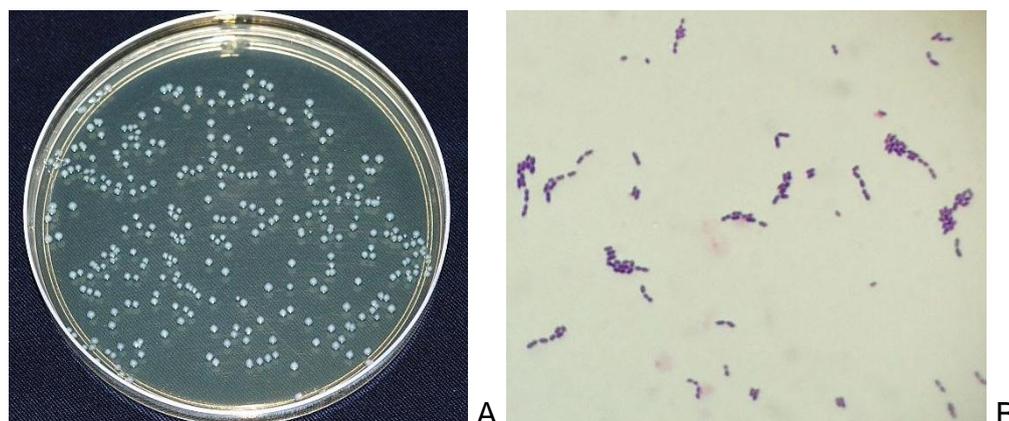


Figura 33 – A) colônias características de *E. faecalis* em ágar BHI; B) visualização em microscópio óptico (aumento de 100x), mostrando células Gram positivas e diplococos em cadeia.

A estatística descritiva do número de colônias (em 10^4 UFC/mL) provenientes do interior dos implantes é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Estatística descritiva da contagem bacteriana proveniente da suspensão do interior dos implantes ($\times 10^4$ UFC/mL)

Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Ex	4,79	4,41	0,53	18,10	3,38
ExC	9,89	15,46	1,36	85,80	5,30
ExAg	8,10	6,56	0,64	30,70	7,85
In	21,44	21,52	3,00	82,80	13,28
InC	20,15	27,01	1,34	117,50	12,08
InAg	17,18	25,21	1,01	113,60	7,70

A análise de variância (Anova 2 fatores) dos dados após transformação logarítmica (\log_{10} UFC/mL) mostrou que o tipo de implante influenciou significativamente os resultados ($P=0,000$), enquanto que a presença do filme não exerceu influência significativa ($P=0,487$), como visto na Tabela 6. Os gráficos de médias são mostrados na Figura 34.

Tabela 6 – Tabela de Anova 2 fatores para a contagem bacteriana proveniente do interior dos implantes (\log_{10} UFC/mL)

Fator	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	P
Implante	1	5,578	29,55	0,000
Filme	2	0,136	0,72	0,487
Interação	2	0,770	4,06	0,019
Erro	164	0,189		
Total	169			

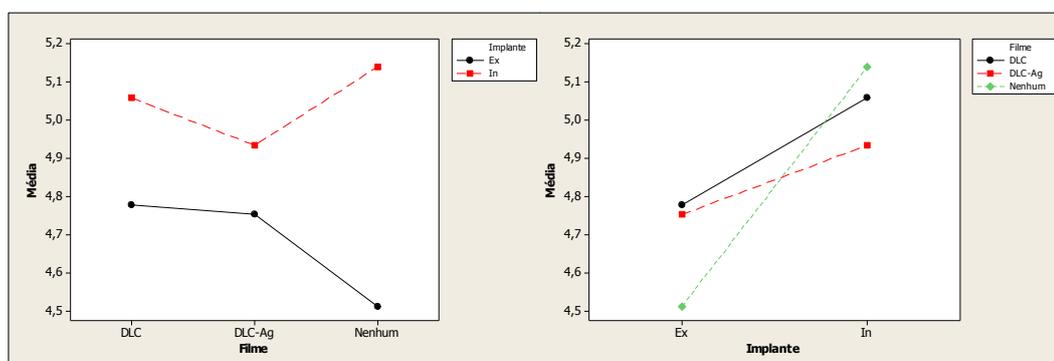


Figura 34 – Gráficos de médias para os fatores “implante” e “filme” (\log_{10} UFC/mL).

O teste de Tukey mostrou que o grupo In apresentou o maior número de UFC/mL, mas foi estatisticamente semelhante aos grupos InC e InAg. O grupo Ex apresentou o menor número de UFC/mL, mas foi estatisticamente semelhante aos grupos ExC e ExAg (Tabela 7 e Figura 35).

Tabela 7 – Teste de comparações múltiplas de Tukey (\log_{10} UFC/mL)

Grupo	Média (DP)	Grupos homogêneos
In	5,14 (0,42)	A
InC	5,06 (0,46)	A B
InAg	4,93 (0,51)	A B
ExC	4,78 (0,40)	B C
ExAg	4,75 (0,41)	B C
Ex	4,51(0,40)	C

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

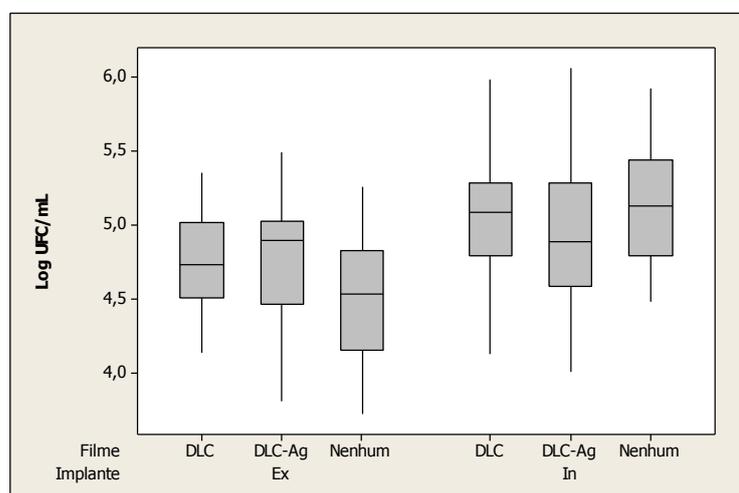


Figura 35 – Gráfico de caixa das distribuições do número de colônias bacterianas provenientes do interior dos implantes (\log_{10} UFC/mL).

Para tentar entender a discrepância de resultados entre os implantes HE e HI, quatro conjuntos de cada foram incluídos em resina acrílica (JET, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil) e cortados longitudinalmente em máquina de corte de precisão (Isomet, Erios, São Paulo, Brasil). Os conjuntos foram observados em estereomicroscópio (Discovery V20, Zeiss, Jena, Alemanha) e suas interfaces foram medidas em microscópio óptico (AT112-50F, Mitutoyo Corporation) sob aumento de 500x. As medidas (média \pm desvio padrão)

das fendas na interface implante/pilar foram de $0,99\pm 0,12\ \mu\text{m}$ para HE e de $2,04\pm 0,26\ \mu\text{m}$ para HI (Figura 36).

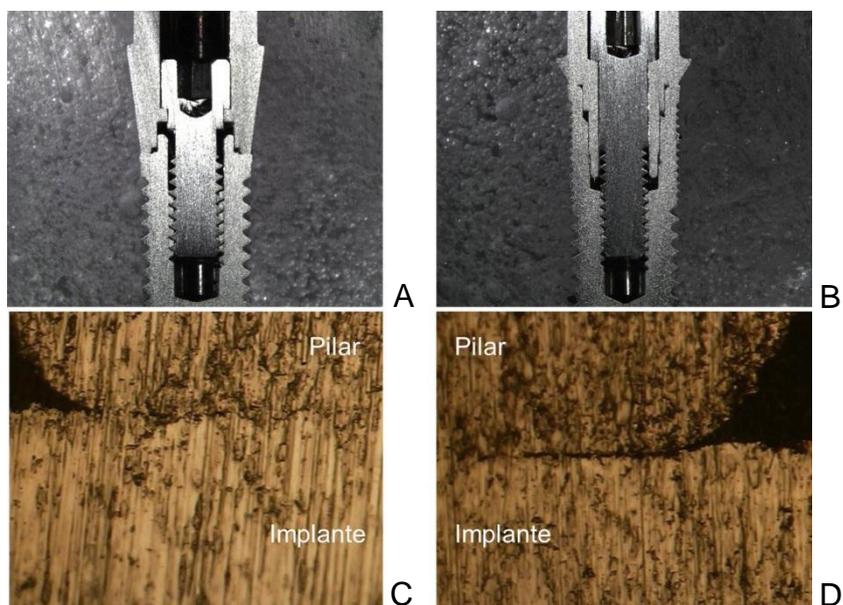


Figura 36 – Implantes em corte longitudinal. A e C) HE; B e D) HI. Acima, aumento de 7,5x; abaixo, aumento de 500x (interface implante/pilar).

As imagens de MEV confirmaram a capacidade do *E. faecalis* de se aderir ao titânio, formando biofilme (Figura 37).

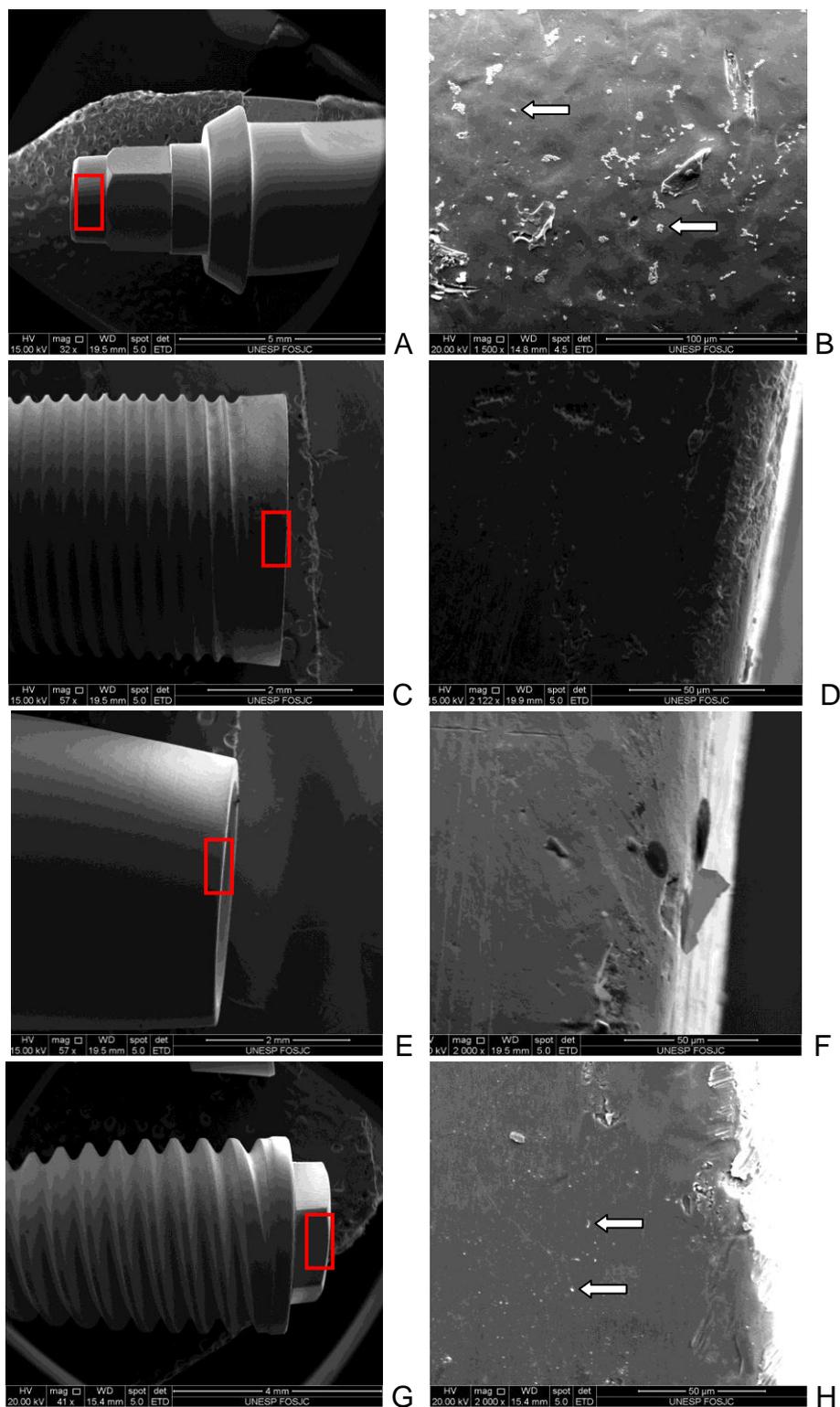


Figura 37 – Imagens de MEV de dois conjuntos implante/pilar que não apresentaram infiltração bacteriana pela interface. As imagens à direita são aproximações das áreas demarcadas nas imagens à esquerda. A) pilar HI; C) implante HI; E) pilar HE; G) implante HE. B e H) as superfícies internas mostram aderência de *E. faecalis* (setas); D e F) as superfícies externas mostram ausência de bactérias.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o filme de DLC-Ag reduziu a aderência microbiana ao Ti CP. Este resultado corrobora os achados de outros estudos que mostraram o efeito bactericida da prata ao ser incorporada a filmes de DLC (Marciano et al., 2009a, 2009c, 2011; Schwarz et al., 2011; Soininen et al., 2011; Baba et al., 2013). A redução da aderência microbiana às superfícies de implantes e seus componentes, expostas ao meio bucal, é bastante vantajosa, pois dificulta a formação de biofilme sobre estas superfícies e previne suas consequências clínicas, como as inflamações do tecido peri-implantar e a peri-implantite (Subramani et al., 2009).

Apesar de alguns estudos mostrarem um efeito bactericida dos filmes de DLC (Marciano et al., 2009a, 2009c, 2011), neste trabalho este efeito não foi comprovado, já que as superfícies cobertas com DLC apresentaram aderência microbiana estatisticamente semelhante ao Ti CP. Entretanto, estes estudos não avaliaram a aderência microbiana, e sim a absorvância óptica de suspensões bacterianas nas quais as amostras foram imersas, sendo, portanto, inadequada a comparação dos resultados. Além disso, estes estudos não utilizaram nenhum teste estatístico para analisar os dados, limitando-se a apenas comparar percentuais médios. De acordo com o presente trabalho estão os achados de Soininen et al. (2011), que não encontraram diferenças significantes na aderência de *S. aureus* e *S. epidermidis* ao titânio ou ao DLC.

O mecanismo de aderência microbiana é bastante complexo e envolve vários fatores, como por exemplo, a rugosidade da superfície. Esperava-se que o filme de DLC reduzisse a rugosidade do

titânio, como mostrado por Kim et al. (2005), porém, isto não ocorreu. Este fato pode ser explicado pela reduzida espessura dos filmes, combinado com a rugosidade relativamente alta do substrato. Por serem filmes bastante finos, provavelmente eles acompanharam o relevo dos picos e vales do substrato. A adição de prata pode elevar a rugosidade dos filmes de DLC, pois a prata pode formar aglomerados dentro da matriz de carbono (Baba et al., 2013). Neste estudo a prata não aumentou a rugosidade do filme, podendo ter contribuído para isto a baixa espessura do filme, a baixa concentração de prata e sua distribuição homogênea na superfície, como mostrada pelo EDS. Outro fator a ser considerado é o instrumento de medição utilizado neste estudo. Instrumentos como o perfilômetro óptico, que utilizam um feixe de luz ao invés de uma ponta em contato, possuem maior precisão de medição e poderiam mostrar diferenças quantitativas entre as amostras com e sem filme. O parâmetro avaliado (R_a) mostra apenas o perfil em duas dimensões, e para uma análise mais completa seria interessante também avaliar parâmetros espaciais. Entretanto, como nosso objetivo foi comparar as condições com e sem filme, consideramos que a análise de R_a foi suficiente.

Além da rugosidade, a aderência microbiana envolve fatores como a energia livre de superfície, a ação de forças de cisalhamento de fluidos do ambiente e, no caso dos filmes de DLC, a proporção das ligações sp^2 e sp^3 (Soininen et al., 2011). Os filmes reduziram a energia livre de superfície do Ti CP, o que é favorável do ponto de vista da aderência microbiana. Este efeito foi mais acentuado no filme de DLC. Os outros fatores, que não foram avaliados neste estudo, talvez possam ajudar a explicar a ausência de efeito antimicrobiano do filme de DLC.

É importante salientar que os testes de aderência microbiana realizados neste estudo utilizaram a metodologia de microcosmo, que simula de forma mais realística o ambiente microbiano

bucal. Nesta metodologia, estão presentes fatores como a saliva humana, com seus nutrientes e fatores imunes, e a interação entre as diversas espécies microbianas encontradas *in vivo*. Os testes que utilizam apenas uma espécie bacteriana podem sofrer influência de características específicas desta espécie, como resistência, capacidade de multiplicação e de formação de biofilme.

A redução da aderência microbiana promovida pelo filme de DLC-Ag parece ter ocorrido em função da ação das nanopartículas de prata na superfície. O mecanismo bactericida da prata ainda não está completamente elucidado, mas se acredita que a prata se ligue às enzimas da cadeia respiratória bacteriana e ao seu DNA, impedindo sua replicação e levando à morte da célula. As nanopartículas de prata apresentam um eficiente efeito antimicrobiano por possuírem uma vasta área superficial em relação ao volume. Elas se ligam à parede celular e à membrana plasmática da célula bacteriana e penetram em seu interior, liberando íons de prata. A prata em seu estado metálico é inerte, mas em contato com os fluidos biológicos ela se ioniza e se torna reativa (Rai et al., 2009).

Apesar de reduzir a aderência microbiana sobre o Ti CP, o filme de DLC-Ag não foi capaz de reduzir significativamente a frequência de infiltração bacteriana em implantes. Este resultado talvez se explique pelo fato de que a prata precisa estar em contato efetivo com a célula bacteriana para exercer ação bactericida, e a presença de uma fenda entre o implante e o pilar protético pode ter permitido a passagem de bactérias sem que elas entrassem necessariamente em contato com o filme de DLC-Ag. O número de UFC no interior dos implantes também não foi reduzido pela presença dos filmes. Como as bactérias colonizam uma superfície por meio da formação e progressão do biofilme, a deposição de filmes de DLC-Ag em ambas as superfícies envolvidas na interface (base do pilar e plataforma do implante) poderia ter levado a menores taxas de infiltração bacteriana.

Alguns estudos sugerem que possa haver difusão dos íons de prata provenientes do filme de DLC pela suspensão bacteriana na qual a amostra está imersa (Marciano et al., 2009c). Acreditamos que este efeito pode não ter sido verificado no presente estudo por causa da baixa concentração de prata encontrada no filme de DLC-Ag. Apesar de Baba et al. (2013) não terem observado uma correlação entre a concentração de prata no filme e seu efeito bactericida, estes autores utilizaram filmes com no mínimo 3,8% de prata em percentual atômico. Diferentemente, os filmes de DLC-Ag produzidos neste estudo apresentaram 0,1-0,2% de prata em percentual atômico. No entanto, esta medida é apenas aproximada, pois a análise por EDS apresenta algumas limitações, como a não detecção de elementos químicos de baixo número atômico, como o hidrogênio, o qual sabemos estar presente em quantidade significativa nos filmes produzidos neste trabalho. Isto também pode explicar a concentração semelhante de prata nos filmes de DLC. Ainda que a análise por EDS não tenha nos permitido avaliar com precisão a concentração de prata nos filmes, ela nos mostrou que a distribuição da prata foi homogênea, como mostra a Figura 25. A baixa concentração de prata nos filmes pode estar relacionada ao mecanismo de deposição no reator PECVD. Pôde-se observar a precipitação das partículas de prata na suspensão de hexano após alguns minutos em repouso. Isto sugere que estas partículas formam aglomerados relativamente pesados na suspensão, que dificultam o carregamento da prata para dentro do reator. O uso de ultrassom para manter a suspensão agitada durante toda a deposição certamente minimizou o problema, mas pode não tê-lo resolvido por completo. Portanto, se faz necessário pesquisar meios mais eficientes de incluir nanopartículas de prata nos filmes de DLC pela técnica utilizada.

Outra explicação para a incapacidade de os filmes de DLC e DLC-Ag reduzirem a infiltração bacteriana nos implantes pode estar relacionada ao microrganismo utilizado neste estudo. Os estudos

que demonstraram o efeito antimicrobiano do filme de DLC-Ag utilizaram microrganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella*, *S. aureus* (Marciano et al., 2009b; Baba et al., 2013) e *S. sanguinis* (Schwarz et al., 2011). O *E. faecalis*, utilizado neste estudo, é um microrganismo de dimensões bastante reduzidas, o que favorece sua passagem pela interface implante/pilar. É resistente a vários antibióticos e agentes antimicrobianos, é capaz de sobreviver em ambientes nutricionais limitados e em condições desfavoráveis por longos períodos. Sua habilidade em formar biofilme o protege contra agentes antimicrobianos e células de defesa do hospedeiro. Atribui-se à sua alta resistência o fato de ser o microrganismo mais frequentemente encontrado em infecções endodônticas recorrentes (Paradella et al., 2007; Sun et al., 2009).

No presente estudo os implantes HI apresentaram mais infiltração bacteriana pela interface implante/pilar e maior contagem de UFC em seu interior do que os implantes HE. Estes resultados estão de acordo com os achados de Duarte et al. (2006). O espaço interno existente após o parafusamento do pilar protético ao implante é menor nos implantes HI do que nos implantes HE. Além disto, as paredes do hexágono nos implantes HE podem ser um obstáculo a mais a ser transposto pelo biofilme bacteriano a caminho da interface. Isto pode ter tornado mais fácil o alcance da interface pelas bactérias nos implantes HI. Outra explicação pode advir do tamanho das fendas existentes nos dois tipos de implantes. Teria sido interessante medir estas fendas antes do desparafusamento do pilar, mas isto implicaria na quebra da cadeia asséptica e impossibilitaria a contagem bacteriana no interior dos implantes. Apesar de alguns estudos não encontrarem correlação entre o tamanho da fenda e a infiltração bacteriana (Amaral, 2003; Oliveira, 2006), os espaços observados por eles foram, em média, bem maiores do que as bactérias utilizadas. Acreditamos que esta correlação possa existir se a adaptação entre os componentes for ótima, ou seja, se o espaço entre eles for semelhante ao tamanho das bactérias utilizadas.

A infiltração bacteriana foi verificada em todos os tipos de conexão protética (Jansen et al., 1997). Alguns estudos apontaram menor infiltração nos implantes de conexão cônica (Tesmer et al., 2009; do Nascimento et al., 2012a), enquanto outros não observaram diferenças entre os diferentes tipos de conexões (Faria, 2008). A frequência de infiltrações varia muito entre todos os estudos *in vitro*, sendo encontradas frequências de 0% a 100%. Esta grande diversidade entre os estudos é consequência provável das grandes diferenças nas metodologias empregadas. Inúmeros fatores podem influenciar a infiltração bacteriana, como a técnica utilizada (direta ou indireta), o tamanho do microrganismo empregado, sua capacidade de formar biofilme, seu ciclo de vida, o desenho do implante e do pilar protético, o torque, o tempo de acompanhamento, o emprego de carga, o tamanho da amostra, o uso repetido de amostras, a quantidade de bactérias inoculadas, entre outros. As muitas variáveis metodológicas encontradas nos estudos dificultam a comparação entre eles.

Este estudo apresenta algumas limitações. A infiltração bacteriana foi testada em condições estáticas. No entanto, a aplicação de cargas cíclicas aos pilares simularia de forma mais real as condições do meio bucal, e poderia aumentar a frequência de infiltrações, já que aumenta a fenda e promove um “bombeamento” entre os meios interno e externo (Steinebrunner et al., 2005; do Nascimento et al., 2012a). O uso de apenas um microrganismo para testar a infiltração bacteriana, como já discutido anteriormente, também é uma limitação do estudo.

Alguns procedimentos metodológicos podem ser apontados como uma vantagem do presente estudo em relação a outros estudos *in vitro*. O tamanho amostral é maior neste estudo do que na maioria, que geralmente emprega 10 amostras. O teste de viabilidade bacteriana após o tempo de acompanhamento não foi realizado em muitos estudos que empregam a técnica indireta, e isso pode ter subestimado a frequência de infiltrações. A padronização do inóculo em

espectrofotômetro também confere maior precisão ao fazer com que todos os espécimes sejam inoculados com a mesma quantidade bacteriana.

A técnica direta para a verificação da infiltração bacteriana (do meio externo para o interior do implante) representa melhor o que de fato ocorre em boca. Entretanto, para estudos *in vitro*, ela apresenta algumas desvantagens. Primeiramente, ela não permite uma avaliação ao longo do tempo, pois a observação de bactérias no interior do implante só pode ser feita após o desparafusamento do pilar, ao final de um período determinado. Além disso, pode haver contaminação do interior do implante no momento do desparafusamento do pilar, levando a resultados falso-positivos. Para evitar isso, geralmente se faz uma limpeza da superfície externa com agente desinfetante antes da abertura, porém, o agente desinfetante pode penetrar pela interface e provocar a morte das bactérias ali presentes, promovendo resultados falso-negativos (Aloise et al., 2010).

O presente estudo pesquisou uma forma de reduzir a infiltração bacteriana pela interface implante/pilar, porém, sua eficácia não atingiu nossas expectativas. Entretanto, acreditamos no potencial dos filmes de DLC em atingir este objetivo, se forem feitas modificações em sua estrutura, como por exemplo, a incorporação de prata em maiores concentrações. Como o filme de DLC-Ag reduziu a aderência microbiana ao titânio, acreditamos que sua deposição em toda a superfície interna do implante, além da base do pilar protético, possa reduzir as bactérias que ali se alojam formando um reservatório bacteriano, que pode ser um fator importante na progressão da peri-implantite e o motivo pelo qual tratamentos não cirúrgicos não são eficazes (Cosyn et al., 2011). Provavelmente também seria uma solução para o mau odor ao se remover um cicatrizador ou componente protético, que tanto incomoda profissionais e pacientes. Obviamente, a continuidade dos estudos com filmes de DLC-Ag deve envolver outras questões, como a potencial

toxicidade produzida pela possível difusão da prata pelo meio bucal e pelos tecidos circunjacentes ao implante.

Até o presente momento, não se conseguiu impedir a ocorrência de infiltrações bacterianas nos implantes de duas peças. Os implantes de corpo único, por não possuírem uma interface, apresentam menos inflamação tecidual e menos perda óssea ao seu redor (Hermann et al., 1997; Brogginini et al., 2003). Entretanto, são desvantajosos do ponto de vista da reconstrução protética, pois exigem posicionamento perfeito no momento cirúrgico (o que é difícil de conseguir) e suas opções protéticas são muito limitadas. Dados clínicos sobre este tipo de implantes são bastante escassos na literatura (Duarte et al., 2006).

A perda óssea ao redor dos implantes de duas peças está relacionada à presença da microfenda entre o implante e o pilar protético. Todavia, este mecanismo ainda não foi totalmente elucidado. A presença da microfenda está associada à ocorrência concomitante de dois fenômenos que podem ser responsáveis pela perda óssea: a infiltração bacteriana e a micromovimentação do pilar protético. A dissociação destes fenômenos em pesquisa é muito difícil, mas seria fundamental para se determinar o papel de cada um na perda óssea. Estudos com pilares soldados promoveram a dissociação dos dois fenômenos, permitindo que houvesse infiltração bacteriana sem micromovimentação dos pilares (Hermann et al., 2001b; King et al., 2002). Estes estudos mostraram uma redução da perda óssea, mas não sua eliminação. Não existem estudos, no entanto, onde haja micromovimentação do pilar sem infiltração bacteriana. Estes estudos se fazem necessários para uma maior compreensão do mecanismo de perda óssea ao redor dos implantes.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo *in vitro*, concluímos que:

- a) Os implantes HI apresentaram maior frequência de infiltração bacteriana pela interface e maior contagem de bactérias em seu interior do que os implantes HE, independentemente da presença dos filmes no pilar;
- b) Os filmes de DLC e DLC-Ag não reduziram significativamente a frequência de infiltração bacteriana e a contagem de bactérias no interior dos implantes;
- c) O filme de DLC-Ag reduziu significativamente a aderência microbiana à superfície de titânio.

8 REFERÊNCIAS*

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg.* 1981;10(6):387-416.

Aglietta M, Siciliano VI, Zwahlen M, Bragger U, Pjetursson BE, Lang NP, et al. A systematic review of the survival and complication rates of implant supported fixed dental prostheses with cantilever extensions after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(5):441-51.

Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986;1(1):11-25.

Aloise JP, Curcio R, Laporta MZ, Rossi L, da Silva AM, Rapoport A. Microbial leakage through the implant-abutment interface of Morse taper implants in vitro. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(3):328-35.

Amaral JIQ. Análise "in vitro" da infiltração bacteriana e das desadaptações na interface implante/conector protético em cinco sistemas de implantes endósseos [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp; 2003.

Assenza B, Tripodi D, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A, Iezzi G, et al. Bacterial leakage in implants with different implant-abutment connections: an in vitro study. *J Periodontol.* 2012;83(4):491-7.

Baba K, Hatada R, Flege S, Ensinger W, Shibata Y, Nakashima J, et al. Preparation and antibacterial properties of Ag-containing diamond-like carbon films prepared by a combination of magnetron sputtering and plasma source ion implantation. *Vacuum.* 2013;89:179-84.

Barbosa RE, do Nascimento C, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Jr RF. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *J Prosthodont.* 2009;18(5):376-81.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [acesso ago. 2008]
Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Besimo CE, Guindy JS, Lewetag D, Meyer J. Prevention of bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained crowns on implants in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(5):654-60.

Bidez MW, Misch CE. Issues in bone mechanics related to oral implants. *Implant Dent*. 1992;1(4):289-94.

Bonetti LF. Otimização das propriedades mecânicas e tribológicas de filmes de DLC crescidos sobre substratos metálicos objetivando aplicações espaciais e industriais [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA; 2008.

Broggini N, McManus LM, Hermann JS, Medina RU, Oates TW, Schenk RK, et al. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J Dent Res*. 2003;82(3):232-7.

Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J Periodontol*. 2005;76(1):115-20.

Cheng L, Exterkate RA, Zhou X, Li J, ten Cate JM. Effect of *Galla chinensis* on growth and metabolism of microcosm biofilms. *Caries Res*. 2011;45(2):87-92.

Choquet V, Hermans M, Adriaenssens P, Daelemans P, Tarnow DP, Malevez C. Clinical and radiographic evaluation of the papilla level adjacent to single-tooth dental implants. A retrospective study in the maxillary anterior region. *J Periodontol*. 2001;72(10):1364-71.

Chow YC, Wang HL. Factors and techniques influencing peri-implant papillae. *Implant Dent*. 2010;19(3):208-19.

Cochran DL, Nummikoski PV, Schoolfield JD, Jones AA, Oates TW. A prospective multicenter 5-year radiographic evaluation of crestal bone levels over time in 596 dental implants placed in 192 patients. *J Periodontol*. 2009;80(5):725-33.

Cosyn J, Van Aelst L, Collaert B, Persson GR, De Bruyn H. The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011;13(4):286-95.

Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent*. 2006;15(3):298-304.

Cravinhos JCP. Análise "in vitro" da contaminação bacteriana na interface implante/conector protético em três sistemas de implantes endósseos

[dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp; 2003.

D'Ercole S, Tete S, Catamo G, Sammartino G, Femminella B, Tripodi D, et al. Microbiological and biochemical effectiveness of an antiseptic gel on the bacterial contamination of the inner space of dental implants: a 3-month human longitudinal study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009;22(4):1019-26.

De Maeztu MA, Braceras I, Alava JI, Sanchez-Garces MA, Gay-Escoda C. Histomorphometric study of ion implantation and diamond-like carbon as dental implant surface treatments in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(2):273-9.

Deconto MA, Salvoni AD, Wassall T. In vitro microbiological bacterial seal analysis of the implant/abutment connection in morse taper implants: a comparative study between 2 abutments. *Implant Dent*. 2010;19(2):158-66.

Degidi M, Artese L, Scarano A, Perrotti V, Gehrke P, Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol*. 2006;77(1):73-80.

den Hartog L, Slater JJ, Vissink A, Meijer HJ, Raghoobar GM. Treatment outcome of immediate, early and conventional single-tooth implants in the aesthetic zone: a systematic review to survival, bone level, soft-tissue, aesthetics and patient satisfaction. *J Clin Periodontol*. 2008;35(12):1073-86.

Dias EC, Bisognin ED, Harari ND, Machado SJ, da Silva CP, Soares GD, et al. Evaluation of implant-abutment microgap and bacterial leakage in five external-hex implant systems: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(2):346-51.

Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(5):732-7.

do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque Jr RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(2):177-80.

do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque Jr RF. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to evaluate the internal contamination of dental implants and comparison of bacterial leakage with cast or pre-machined abutments. *Clin Oral Implants Res*. 2009a;20(6):571-7.

do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Goncalves RB, Ribeiro RF, Faria AC, et al. Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012a;27(3):551-60.

do Nascimento C, Miani PK, Pedrazzi V, Muller K, de Albuquerque Jr RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses. *Clin Oral Implants Res*. 2012b;23(10):1168-72.

do Nascimento C, Miani PK, Watanabe E, Pedrazzi V, de Albuquerque Jr RF. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of an external-hex implant after saliva incubation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26(4):782-7.

do Nascimento C, Pedrazzi V, Miani PK, Moreira LD, de Albuquerque Jr RF. Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface. *Clin Oral Implants Res*. 2009b;20(12):1394-7.

Duarte AR, Rossetti PH, Rossetti LM, Torres SA, Bonachela WC. In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces. *J Periodontol*. 2006;77(11):1828-32.

Ericsson I, Nilner K, Klinge B, Glantz PO. Radiographical and histological characteristics of submerged and nonsubmerged titanium implants. An experimental study in the Labrador dog. *Clin Oral Implants Res*. 1996;7(1):20-6.

Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol*. 1995;22(3):255-61.

Faria R. Avaliação da microinfiltração bacteriana nas interfaces entre pilares e implantes [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2008.

Fissmer SF. Estudos de deposição de nanopartículas de prata em filmes de DLC, para aplicação espacial e industrial [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA; 2010.

Froum SJ, Cho SC, Elian N, Romanos G, Jalbout Z, Natour M, et al. Survival rate of one-piece dental implants placed with a flapless or flap protocol - a randomized, controlled study: 12-month results. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2011;31(6):591-601.

Gardner DM. Platform switching as a means to achieving implant esthetics. *N Y State Dent J*. 2005;71(3):34-7.

Grill A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials—an overview. *Diam Relat Mater*. 2003;12(2):166-70.

Gross M, Abramovich I, Weiss EI. Microleakage at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(1):94-100.

Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Cochran DL. Crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 2000;71(9):1412-24.

Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Schoolfield JD, Cochran DL. Biologic Width around one- and two-piece titanium implants. *Clin Oral Implants Res*. 2001a;12(6):559-71.

Hermann JS, Cochran DL, Nummikoski PV, Buser D. Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 1997;68(11):1117-30.

Hermann JS, Schoolfield JD, Schenk RK, Buser D, Cochran DL. Influence of the size of the microgap on crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol*. 2001b;72(10):1372-83.

Holm-Pedersen P, Lang NP, Muller F. What are the longevities of teeth and oral implants? *Clin Oral Implants Res*. 2007;18 Suppl 3:15-9.

Iqbal MK, Kim S. For teeth requiring endodontic treatment, what are the differences in outcomes of restored endodontically treated teeth compared to implant-supported restorations? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:96-116.

Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(4):527-40.

Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(2):119-30.

Kim SG, Solomon C. Cost-effectiveness of endodontic molar retreatment compared with fixed partial dentures and single-tooth implant alternatives. *J Endod*. 2011;37(3):321-5.

Kim SK, Lee JB, Koak JY, Heo SJ, Lee KR, Cho LR, et al. An abutment screw loosening study of a Diamond Like Carbon-coated CP titanium implant. *J Oral Rehabil.* 2005;32(5):346-50.

King GN, Hermann JS, Schoolfield JD, Buser D, Cochran DL. Influence of the size of the microgap on crestal bone levels in non-submerged dental implants: a radiographic study in the canine mandible. *J Periodontol.* 2002;73(10):1111-7.

Koller B, Att W, Strub JR. Survival rates of teeth, implants, and double crown-retained removable dental prostheses: a systematic literature review. *Int J Prosthodont.* 2011;24(2):109-17.

Koutouzis T, Wallet S, Calderon N, Lundgren T. Bacterial colonization of the implant-abutment interface utilizing an in-vitro dynamic loading model. *J Periodontol.* 2011;82(4):613-8.

Lambert FE, Weber HP, Susarla SM, Belser UC, Gallucci GO. Descriptive analysis of implant and prosthodontic survival rates with fixed implant-supported rehabilitations in the edentulous maxilla. *J Periodontol.* 2009;80(8):1220-30.

Lang NP, Bosshardt DD, Lulic M. Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:182-7.

Lang NP, Pun L, Lau KY, Li KY, Wong MC. A systematic review on survival and success rates of implants placed immediately into fresh extraction sockets after at least 1 year. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23 Suppl 5:39-66.

Lazzara RJ, Porter SS. Platform switching: a new concept in implant dentistry for controlling postrestorative crestal bone levels. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006;26(1):9-17.

Lee KH, Maiden MF, Tanner AC, Weber HP. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol.* 1999;70(2):131-8.

Lindhe J, Meyle J. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):282-5.

Maló P, Nobre M, Lopes A. The rehabilitation of completely edentulous maxillae with different degrees of resorption with four or more immediately loaded implants: a 5-year retrospective study and a new classification. *Eur J Oral Implantol.* 2011;4(3):227-43.

Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Diamond-like carbon films produced from high deposition rates exhibit antibacterial activity. *Synth Met.* 2009a;159(21-22):2167-9.

Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films. *Appl Surf Sci*. 2009b;(255):8377-82.

Marciano FR, Bonetti LF, Mangolin JF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Investigation into the antibacterial property and bacterial adhesion of diamond-like carbon films. *Vacuum*. 2011;85(6):662-6.

Marciano FR, Bonetti LF, Santos LV, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC and Ag-DLC films produced by PECVD technique. *Diam Relat Mater*. 2009c;18(5-8):1010-4.

Martin WC, Woody RD, Miller BH, Miller AW. Implant abutment screw rotations and preloads for four different screw materials and surfaces. *J Prosthet Dent*. 2001;86(1):24-32.

McNamara TF, Alexander JF, Lee M. The role of microorganisms in the production of oral malodor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972;34(1):41-8.

Meleo D, Baggi L, Di Girolamo M, Di Carlo F, Pecci R, Bedini R. Fixture-abutment connection surface and micro-gap measurements by 3D micro-tomographic technique analysis. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(1):53-8.

Morrison ML, Buchana RA, Liaw PK, Berry CJ, Brigmon RL, Riester I, et al. Electrochemical and antimicrobial properties of diamondlike carbon-metal composite films. *Diam Relat Mater*. 2006;15(1):138-46.

Muguruma T, Iijima M, Brantley WA, Mizoguchi I. Effects of a diamond-like carbon coating on the frictional properties of orthodontic wires. *Angle Orthod*. 2011;81(1):141-8.

Nayak AG, Fernandes A, Kulkarni R, Ajantha GS, Lekha K, Nadiger R. Efficacy of antibacterial sealing gel and o-ring to prevent micro leakage at the implant abutment interface - an in vitro study. *J Oral Implantol*. 2011. May 16 [Epub ahead of print].

Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: myth or science? *J Periodontol*. 2002;73(3):322-33.

Oliveira GR. Análise "in vitro" da infiltração bacteriana e das adaptações na interface implante/conector protético de sistemas de implantes endósseos [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp; 2006.

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36(2):163-8.

Piasek JR, Swift EJ, Thompson JY, Grego S, Stoner BR. Surface modification for enhanced silanation of zirconia ceramics. *Dent Mater.* 2009;25(9):1116-21.

Piasek JR, Wolter SD, Stoner BR. Development of a novel surface modification for improved bonding to zirconia. *Dent Mater.* 2011;27(5):e99-105.

Piattelli A, Scarano A, Paolantonio M, Assenza B, Leghissa GC, Di Bonaventura G, et al. Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections. *J Periodontol.* 2001;72(9):1146-50.

Priest G. Revisiting tooth preservation in prosthodontic therapy. *J Prosthodont.* 2011;20(2):144-52.

Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res.* 1993;72(9):1304-9.

Quirynen M, van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res.* 1993;4(3):158-61.

Rack A, Rack T, Stiller M, Riesemeier H, Zabler S, Nelson K. In vitro synchrotron-based radiography of micro-gap formation at the implant-abutment interface of two-piece dental implants. *J Synchrotron Radiat.* 2010;17(2):289-94.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009;(27):76-83.

Ricomini Filho AP, Fernandes FS, Straioto FG, da Silva WJ, Del Bel Cury AA. Preload loss and bacterial penetration on different implant-abutment connection systems. *Braz Dent J.* 2010;21(2):123-9.

Rimondini L, Fare S, Brambilla E, Felloni A, Consonni C, Brossa F, et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol.* 1997;68(6):556-62.

Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R Rep.* 2002;37(4-6):129-281.

Saxton CA. Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. *Caries Res.* 1973;7(2):102-19.

Schauer J, Winter J. Plasma deposition of elastic wear resistant Si-C coatings on nickel-titanium for biomedical applications. *J Appl Phys.* 2008;103(11):113302.

- Schwarz FP, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Stritzker B. Antibacterial properties of silver containing diamond like carbon coatings produced by ion induced polymer densification. *Surf Coat Technol.* 2011;205(20):4850-4.
- Sheeja D, Tay BK, Leong KW, Lee CH. Effect of film thickness on the stress and adhesion of diamond-like carbon coatings. *Diam Relat Mater.* 2002;11(9):1643-7.
- Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):975-82.
- Soininen A, Levon J, Katsikogianni M, Myllymaa K, Lappalainen R, Kontinen YT, et al. In vitro adhesion of staphylococci to diamond-like carbon polymer hybrids under dynamic flow conditions. *J Mater Sci Mater Med.* 2011;22(3):629-36.
- Steinebrunner L, Wolfart S, Bossmann K, Kern M. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(6):875-81.
- Sterer N, Tamary I, Katz M, Weiss E. Association between transmucosal depth of osseointegrated implants and malodor production. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008;23(2):277-80.
- Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(4):616-26.
- Sun J, Song X, Kristiansen BE, Kjaereng A, Willems RJ, Eriksen HM, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(7):2218-25.
- Tanner A, Maiden MF, Lee K, Shulman LB, Weber HP. Dental implant infections. *Clin Infect Dis.* 1997;25 Suppl 2:S213-7.
- Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(1):56-62.
- Tesmer M, Wallet S, Koutouzis T, Lundgren T. Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study. *J Periodontol.* 2009;80(12):1991-7.
- Toljanic JA, Morello JA, Moran WJ, Panje WR, May EF. Microflora associated with percutaneous craniofacial implants used for the retention of facial prostheses: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10(5):578-82.

Traversy MC, Birek P. Fluid and microbial leakage of implant-abutment assembly in vitro [abstract 1909]. *J Dent Res.* 1992;71:754.

Tsuge T, Hagiwara Y, Matsumura H. Marginal fit and microgaps of implant-abutment interface with internal anti-rotation configuration. *Dent Mater J.* 2008;27(1):29-34.

Ueda T, Kremer U, Katsoulis J, Mericske-Stern R. Long-term results of mandibular implants supporting an overdenture: implant survival, failures, and crestal bone level changes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(2):365-72.

Vacek JS, Gher ME, Assad DA, Richardson AC, Giambarresi LI. The dimensions of the human dentogingival junction. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994;14(2):154-65.

van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(6):511-20.

Vela-Nebot X, Rodriguez-Ciurana X, Rodado-Alonso C, Segala-Torres M. Benefits of an implant platform modification technique to reduce crestal bone resorption. *Implant Dent.* 2006;15(3):313-20.

Weng D, Nagata MJ, Leite CM, de Melo LG, Bosco AF. Influence of microgap location and configuration on radiographic bone loss in nonsubmerged implants: an experimental study in dogs. *Int J Prosthodont.* 2011;24(5):445-52.

Wennerberg A, Albrektsson T. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. *J Oral Rehabil.* 2011;38(4):286-94.

Wu-Yuan CD, Eganhouse KJ, Keller JC, Walters KS. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: a scanning electron microscopy study. *J Oral Implantol.* 1995;21(3):207-13.

Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(1):470-80.

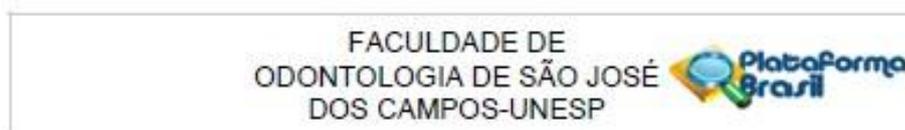
Zhou H, Xu L, Ogino A, Nagatsu M. Investigation into the antibacterial property of carbon films. *Diam Relat Mater.* 2008;17(7-10):1416-9.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):286-91.

Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. J Endod. 2006;32(8):722-6.

Zurdo J, Romao C, Wennstrom JL. Survival and complication rates of implant-supported fixed partial dentures with cantilevers: a systematic review. Clin Oral Implants Res. 2009;20 Suppl 4:59-66.

ANEXO – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA DEPOSIÇÃO DE FILMES DE CARBONO TIPO DIAMANTE NA INFILTRAÇÃO BACTERIANA PELA INTERFACE ENTRE IMPLANTES E PILARES PROTÉTICOS

Pesquisador: Lafayette Nogueira Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11301112.0.0000.0077

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 208.395

Data da Relatoria: 19/02/2013

Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo é avaliar a influência da deposição de filmes de DLC na infiltração e proliferação bacterianas na interface entre pilares protéticos e implantes osteointegrados, em conexões de hexágono externo e interno. Serão utilizados 180 conjuntos de implantes e pilares protéticos, divididos de acordo com o tratamento do pilar: (1) nenhum tratamento (controle); (2) deposição de filme de DLC na base; e (3) deposição

de filme de DLC dopado com prata. A deposição do filme se dará pelo processo conhecido como PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition). Sob condições estéreis, será inoculada colônia de *Streptococcus sanguinis* no interior dos implantes, e os pilares serão parafusados aos implantes com o torque recomendado pelo fabricante. Serão descartadas as amostras que apresentarem contaminação externa imediata. As amostras serão colocadas em tubos de ensaio contendo caldo TSB estéril, e acompanhadas por sete dias. Os caldos que se apresentarem turvos serão semeados em placa de Petri com TSA e incubados em estufa bacteriológica por 48 horas para observação de crescimento bacteriano. Coloração Gram será realizada tanto no caldo quanto em colônias resultantes da semeadura, para comprovação da presença de *S. sanguinis*. Ao final do período, nas amostras que não apresentarem turvação do meio, os pilares serão desparafusados e o conteúdo interno dos implantes será coletado com cone de papel e solução salina e semeado em placas de Petri contendo TSA, e levadas a estufa bacteriológica por 48 horas para verificar a

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12-3947-9078 Fax: (12-3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ
DOS CAMPOS-UNESP



viabilidade das bactérias. As amostras que eventualmente não contiverem *S. sanguinis* viáveis em seu interior serão descartadas do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a influência da deposição de filmes de DLC na infiltração e proliferação bacterianas na interface entre pilares protéticos e implantes osteointegrados. Os objetivos específicos são: I) Comparar o grau de penetração bacteriana na interface implante / pilar protético entre conexões externas e internas; II) Avaliar a infiltração bacteriana nesta interface quando um filme fino de DLC é depositado na superfície interna de pilares protéticos, na face voltada para o implante;

III) Comparar o grau de penetração bacteriana entre um filme de DLC e um filme de DLC dopado com nanopartículas de prata;

IV) Caracterizar a superfície de titânio por meio das análises de rugosidade, ângulo de contato e química, comparando as superfícies com e sem filme de DLC.

avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios são para a comunidade científica com os resultados da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa importante para a comunidade acadêmica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa utilizará apenas um indivíduo para coleta de saliva. O doador de saliva será membro da equipe de pesquisa (Mayra Cardoso) e está ciente dos requisitos necessários a doação.

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado de acordo com o parecer emitido aprova o projeto

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 28 de Fevereiro de 2013

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12-3947-9078 Fax: (12-3947-9010 E-mail: cep@foeju.unesp.br