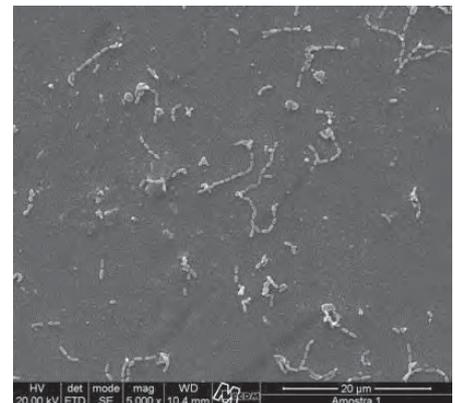
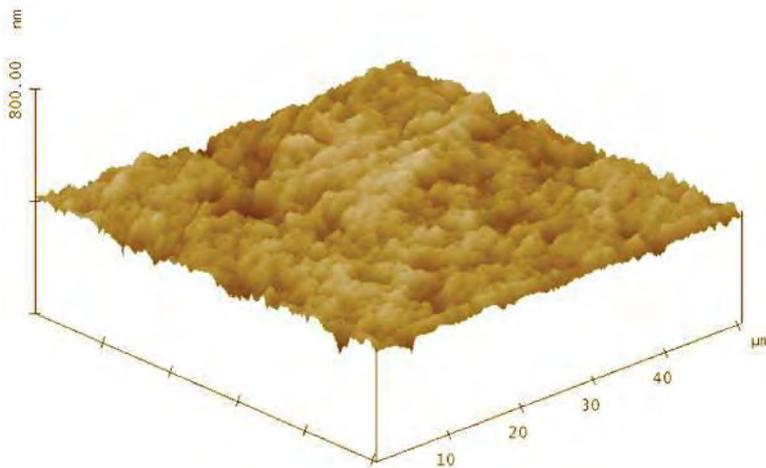


Laiza Maria Grassi Fais

Topografia superficial e aderência de *Streptococcus mutans* no titânio após imersão e escovação com dentifrícios fluoretado e não-fluoretado simulando 10 anos de uso





UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

LAIZA MARIA GRASSI FAIS

TOPOGRAFIA SUPERFICIAL E ADERÊNCIA DE *STREPTOCOCCUS*
MUTANS NO TITÂNIO APÓS IMERSÃO E ESCOVAÇÃO COM
DENTIFRÍCIOS FLUORETADO E NÃO-FLUORETADO
SIMULANDO 10 ANOS DE USO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara
2011

Fais, Laiza Maria Grassi

Topografia superficial e aderência de *streptococcus mutans* no titânio após imersão e escovação com dentifrícios fluoretado e não-fluoretado simulando 10 anos de uso / Laiza Maria Grassi Fais . – Araraquara: [s.n.], 2011.

154 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

1. Titânio 2. Fluoretos 3. Dentifrício 4. Imersão 5. Escovação dentária 6. Topografia 7. Aderência bacteriana 8. Streptococcus mutans I. Título

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e orientador: **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**

2º Examinador: **Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz**

3º Examinador: **Profa. Dra. Lígia Antunes Pereira Pinelli**

4º Examinador **Prof. Dr. Ricardo Faria Ribeiro**

5º Examinador: **Prof. Dr. Sicknan Soares da Rocha**

Araraquara, 22 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES

LAIZA MARIA GRASSI FAIS

| | |
|------------|--|
| NASCIMENTO | 19 de abril de 1982 – Araraquara SP. |
| FILIAÇÃO | Antonio Carlos Fais Neuza Maria Grassi Fais |
| 2000/2003 | Curso de Graduação, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP |
| 2005/2007 | Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP |
| 2007/2011 | Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP |

DEDICATÓRIA

A *Deus*, por ter me proporcionado a oportunidade de concretizar mais uma etapa.

“Dai-me a serenidade para aceitar as coisas que eu não posso mudar, coragem para mudar as coisas que eu possa, e sabedoria para que eu saiba a diferença: vivendo um dia a cada vez, aproveitando um momento de cada vez; aceitando as dificuldades como um caminho...”

Reinhold Niebuhr

Aos meus pais, *Antônio Carlos* e *Neuza*, que com dedicação infinita e amor incondicional, inspiram a confiança necessária para a realização de meus sonhos.

À minha irmã, *Naiara*, pelo apoio e amizade.

Ao meu noivo, *Rodrigo*, pelo amor,
companheirismo, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Gelson Luís Adabo*, pelas oportunidades concedidas à minha formação, pelo apoio e pela inspiração no amadurecimento de meus conhecimentos.

À *Profa. Dra. Lígia Antunes Pereira Pinelli*, minha primeira orientadora e AMIGA. Muito obrigada pelo aprendizado proporcionado, pelos estímulos e conselhos.

Aos amigos do curso de Doutorado, *Alejandro, Isabella, Juliê, Livia, Luciano, Luís Eduardo, Paula e Pierrí*.

À *Juliana Cabriní Carmello*. Muito obrigada pela oportunidade de crescermos juntas, pelo carinho e confiança em mim depositada.

Aos professores da Disciplina de Materiais Dentários, *Carlos Alberto, Luís Geraldo e Renata*.
Vocês são exemplo de profissionalismo.

Ao *Professor Dr. Dalton Geraldo Guaglianoni*, por todos os ensinamentos proporcionados e pelo apoio na realização da análise estatística desta tese.

A *Ronald Tararam e Marcelo de Assunção Pereira da Silva*, responsáveis pela execução das análises em microscópio de força atômica.

À *Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidório*, pelas sugestões e suporte fornecidos durante a execução dos testes microbiológicos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo Senhor Diretor *Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla*, e pela Senhora Vice-diretora *Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon*.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, representada pelo *Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani*.

Ao Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, representado pela *Profa. Dra. Regina Helena Barbosa Tavares da Silva*.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela valiosa participação em meu crescimento profissional.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese.

Ao *Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani*, responsável pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, local onde os testes microbiológicos foram realizados.

Aos funcionários da Biblioteca, especialmente à *Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas*, responsável pela revisão da normalização desta tese.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, pelos serviços prestados durante todo o curso.

Ao *CNPQ* e à *FAPESP*, pelo auxílio financeiro que propiciaram o bom andamento desta pesquisa.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meu sincero agradecimento.

Sumário

| | |
|------------------------------|-----|
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 21 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 60 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO..... | 61 |
| 5 RESULTADO | 84 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 104 |
| 7 CONCLUSÃO | 118 |
| 8 REFERÊNCIAS | 119 |
| 9 APÊNDICE | 131 |

Fais LMG. Topografia superficial e aderência de *Streptococcus mutans* no titânio após imersão e escovação com dentifrícios fluoretado e não-fluoretado simulando 10 anos de uso [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Resumo

Este estudo teve por objetivo avaliar a topografia e a aderência de *Streptococcus mutans* na superfície do titânio após procedimentos que simularam 10 anos de uso de dentifrícios fluoretado e não-fluoretado. Corpos-de-prova na forma de discos (6 mm Ø X 4 mm) de Ti-6Al-4V (Grupo L, N = 36) e de titânio comercialmente puro (Ti cp, Grupo T, N = 36) foram polidos metalograficamente e subdivididos em seis subgrupos (n=6) de acordo com a imersão (I) ou escovação (E) em água destilada (A), água destilada + dentifrício não-fluoretado (D) ou água destilada + dentifrício fluoretado (1500 ppm, pH 6,3) (DF). Os discos dos subgrupos IA, ID e IDF permaneceram submersos em suas respectivas soluções durante 244 h (\cong 10 anos). A escovação dos discos dos subgrupos EA, ED e EDF foi realizada em uma máquina de escovação linear com escovas macias (244 h; 60 ciclos/min). A topografia superficial dos discos foi avaliada antes (pré-tratamento) e após (pós-tratamento) a imersão ou a escovação. Para tanto, os discos foram analisados em microscópio de força atômica (MFA), no qual foram obtidas imagens tri-dimensionais (3D) e valores de rugosidade média (Ra). Após os tratamentos, discos dos subgrupos IDF e EDF foram analisados em microscopia dispersiva de raios-X (EDX) para a identificação dos elementos químicos. No teste de aderência, os discos foram contaminados com cepa padrão de *Streptococcus mutans* (NTCC 1023) para determinação do número de unidades formadoras de colônia

(UFC/mL) das bactérias aderidas. Para averiguação do padrão de aderência dos micro-organismos, os discos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (MEV). As comparações entre os subgrupos foram realizadas por meio da análise de variância (*one way ANOVA*) e teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$). Os valores de Ra pré e pós-tratamento foram comparados pelo Teste T-Student ($\alpha=0,05$). Antes dos tratamentos, nenhuma diferença significativa foi encontrada tanto para os discos do grupo L ($p = 0,40$), quanto para os do grupo T ($p = 0,99$). A imersão não alterou a Ra dos discos ($p > 0,05$). Ambos os metais mostraram aumento da Ra após escovação com dentifrícios ($p < 0,01$). Alterações nas imagens 3D foram observadas nos subgrupos do grupo L submetidos à escovação com dentifrício (ED e EDF) e, em todos os subgrupos do grupo T submetidos à escovação (EA, ED e EDF). O EDX não detectou íons de sódio ou de flúor nas superfícies dos discos expostos ao dentifrício fluoretado. Com relação ao teste de aderência, as médias de UFC/mL apresentaram diferenças estatisticamente significantes em função dos tratamentos realizados (Grupo L – $p = 0,81$; Grupo T – $p = 0,52$). A MEV não mostrou diferença no padrão de aderência. Concluiu-se que após 10 anos, a topografia superficial da liga Ti-6Al-4V e do Ti cp foram alteradas quando a exposição ao flúor (1.500 ppm; pH = 6,3) esteve associada à escovação. Entretanto, tais alterações ocorreram em escala nanométrica, não sendo capazes de influenciar a aderência de *Streptococcus mutans*.

Palavras-chave: Titânio, fluoretos, dentifrício, imersão, escovação dentária, topografia, aderência bacteriana, *Streptococcus mutans*

Fais LMG. Surface topography and *Streptococcus mutans* adhesion to titanium after brushing with fluoride and fluoride-free toothpaste simulating 10 years of use [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

Abstract

Titanium exposure to fluorides could degrade the metal surface, contributing to an increased roughness and providing additional sites to micro-organisms adhesion. The aim of this study was to contrasting titanium surface topography after procedures that simulated 10 years of brushing using toothpastes with or without fluoride. Ti-6Al-4V (Group L – N=36) and commercially pure titanium (cp Ti – Group T; N=36) disks (6mm Ø X 4mm) were mirror-polished and treated according to 6 subgroups (n=6) as a function of immersion (I) or brushing (B) using distilled water (W), distilled water + fluoride-free toothpaste (T) and distilled water + fluoride toothpaste (1,500 ppm; pH = 6.3) (FT). Specimens submitted to immersion were submerged in the vehicles without brushing for 244 h (\cong 10 years). For brushed specimens, procedures were carried out in a linear brushing machine with a soft-bristled toothbrush (244 h; 60 cycles/min). Surface topography was evaluated at baseline (pre-treatment) and post-treatment, using atomic force microscope in order to obtain three-dimensional (3D) images and mean roughness (Ra). IFT and BFT samples were analyzed under scanning electron microscope with dispersive spectrometer (EDX). For the adhesion test, the disks were contaminated with standard strain of *S. mutans* (NTCC 1023) and the adhesion was analyzed by the colony-forming unit counts (CFU/mL) of the adhered viable cell and by scanning electron microscopy (SEM) images. The subgroups were compared with one-way ANOVA and Tukey post-test ($\alpha=.05$). Pre and post-treatment values of Ra were compared using the paired Student T test ($\alpha=.05$). At

baseline, there was no significant difference among the Ra values of L subgroups ($p = .40$), or among T subgroups ($p = .99$). No significant changes were seen after immersions ($p > .05$). Brushing increased the roughness of cp Ti and of Ti-6Al-4V ($p < .01$); cp Ti had topographic changes after BW, BT and BFT treatments while Ti-6Al-4V was significantly different only after BT and BTF. EDX has not detected fluoride or sodium ions on metal surfaces. No significant differences were seen on the CFU/mL among Ti-6Al-4V ($p = 0.81$), or among the subgroups of cp Ti subgroups ($p = 0.52$). All SEM surfaces had similar patterns of *Streptococcus mutans* adhesion. It was concluded that after 10 years, the cp Ti and Ti-6Al-4V surface topography were changed when the titanium exposure to fluoride (1,500 ppm, pH = 6.3) was associated with brushing. However, these changes occurred in the nanometer scale and did not influence the adherence of *Streptococcus mutans*.

Keywords: Titanium, fluorides, toothpaste, immersion, toothbrushing, topography, bacterial adhesion, *Streptococcus mutans*

1 Introdução

Em virtude do aumento do preço de ouro, desde a década de 70 diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de se obter ligas alternativas mais econômicas que apresentassem propriedades semelhantes às das ligas áureas¹. Simultaneamente a este acontecimento e com o advento da osseointegração, o titânio passou a despertar o interesse de pesquisadores para a confecção de implantes, surgindo como um metal de sucesso e destaque devido a duas propriedades em especial, a biocompatibilidade e resistência à corrosão^{39, 58, 74, 82}.

Nos dias atuais, o titânio comercialmente puro (Ti cp) e a liga titânio-alumínio-vanádio (Ti-6Al-4V) podem ser empregados para a fabricação de coroas, próteses fixas ou removíveis e infraestruturas de próteses sobre implantes^{6, 31, 48, 57, 76, 81, 87, 88, 90}. O uso destes materiais tem sido estimulado devido ao fato de apresentarem massa atômica inferior em relação a outros metais e alta relação resistência/massa, propriedades que possibilitariam a confecção de estruturas menos densas^{41, 42} sem comprometimento da resistência à tração e dureza^{36, 89}.

Entre as propriedades do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V, a biocompatibilidade e a boa resistência à corrosão resultam da formação de uma camada superficial à base de óxido de titânio, que é considerada densa e estável^{28, 67, 74}. Essa camada, também conhecida por camada de passivação,

apresenta em média 4 a 6 nanômetros⁷⁴ e é formada rapidamente devido à alta reatividade do titânio com o oxigênio⁸³.

Apesar da estabilidade da camada superficial e das boas propriedades mecânicas do titânio, o sucesso em longo prazo dos implantes e das estruturas protéticas confeccionadas em Ti cp ou Ti-6Al-4V dependerá da interação destes metais com a cavidade bucal¹⁷. Esse ambiente é considerado complexo e hostil por favorecer a biodegradação de metais devido a interações térmicas, iônicas, microbiológicas e enzimáticas^{17, 22, 69}. Assim sendo, a mera presença da camada de óxidos, que atua como uma barreira cinética contra a corrosão²¹, não manterá a superfície do titânio completamente protegida no ambiente bucal, visto que poderá ser removida por agentes químicos ou mecânicos^{67, 74}.

Enquanto o titânio apresenta alta resistência à corrosão quando testado em saliva artificial e soluções salinas fisiológicas^{2, 52, 83}, alguns pesquisadores sugerem que os íons fluoretos provenientes de dentifrícios, géis profiláticos e enxaguatórios possam causar efeitos deletérios nas superfícies do Ti cp, da liga Ti-6Al-4V e da liga Ni-Ti^{2, 33, 37, 39, 40, 44, 45, 50-52, 59, 73, 76, 83, 91}. Estes íons podem diminuir a resistência à polarização e aumentar a corrente anódica na camada de óxidos^{37, 59}, tornando a superfície mais propensa ao ataque corrosivo^{37, 39, 40, 43, 50-52} e à liberação de íons metálicos^{39, 43, 45}. Esses fatores poderão alterar a composição química^{32, 34, 37, 44, 45, 76}, a microestrutura², a topografia^{44, 76} e a rugosidade da superfície^{59, 76}, além de contribuir para falhas por fadiga quando aliados a esforços cíclicos^{40, 83, 90}.

Outra consequência relacionada às alterações na topografia de superfície é a possibilidade de favorecimento à aderência de micro-organismos¹⁷. A aderência e colonização bacteriana são consideradas importantes por desenvolverem um papel chave na patogênese das infecções associadas aos biomateriais²⁵; podem causar perda de implantes dentários¹⁰ devido ao desenvolvimento de peri-implantite e destruição óssea^{47, 56, 65, 70}. Nos tecidos duros intra-bucais, as espécies de *Streptococcus*, incluindo o *Streptococcus mutans*, são denominados colonizadores primários, os quais preparam o ambiente para demais colonizadores²⁶, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Fusobacterium*, que estão envolvidos nos processos patogênicos das periodontites e peri-implantites²⁹.

O aumento da rugosidade, a presença de sulcos, ranhuras, riscos, depressões e irregularidades na superfície podem facilitar a colonização microbiana por servirem como abrigo para os micro-organismos, protegendo-os contra forças de remoção vindas do fluxo salivar, mastigação, deglutição e procedimentos de higiene^{65, 79}. Além disso, em superfícies mais rugosas o biofilme apresenta um grau de maturação maior e um aumento significativo no número de micro-organismos presentes⁶². Após a avaliação da ação química (imersão) simulando 5 anos, 10, 15 e 20 anos de exposição do Ti cp a fluoretos (1500 ppm), Fernandes-Filho²³ (2008) relatou alterações na rugosidade de superfície do titânio a partir de 5 anos, havendo aumento do número de *S. mutans* aderidos à superfície a partir de 10 anos de exposição aos fluoretos.

Enquanto a indicação e o uso de enxaguatórios e géis fluoretados podem ser controlados pelo cirurgião-dentista, uma atenção especial deve ser dispensada aos efeitos dos fluoretos provenientes dos dentifrícios na superfície do titânio e de suas ligas. Apesar da maioria dos autores considerarem apenas os efeitos químicos dos íons fluoretos, delineando estudos que mantém este metal imerso em soluções fluoretadas^{2, 32, 33, 37, 39, 44, 45, 50-52, 64, 69, 76, 82, 83, 91}, os fios e bráquetes ortodônticos, as próteses confeccionadas a base de titânio ou até mesmo áreas de implante ou pilares expostas ao ambiente bucal são submetidos, diariamente, à escovação com dentifrício fluoretado. Poucos estudos avaliaram os efeitos deste procedimento na superfície do titânio^{30, 31, 43, 46, 54, 73}, sendo apenas o estudo de Siirila, Kononem⁷³ (1991) direcionado à relação entre a ação química dos fluoretos e a ação mecânica da escovação. Entretanto, tais autores associaram a presença de danos superficiais no titânio ao efeito abrasivo das cerdas de escovas dentais, e não, à ação dos íons fluoretos.

Desta forma, considerando a possibilidade de a topografia superficial do titânio ser alterada em função da ação química dos fluoretos provenientes dos dentifrícios fluoretados e da ação mecânica da escovação, julgou-se oportuno avaliar, os efeitos da imersão e escovação com dentifrício fluoretado sobre a topografia superficial do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V, bem como sua influência sobre a aderência de *Streptococcus mutans*.

A hipótese nula (H0) a ser testada neste trabalho é: a ação química dos componentes dos dentifrícios incluindo os íons fluoretos, a ação mecânica das cerdas das escovas, dos

abrasivos do dentifrício, e a associação entre as cerdas, os abrasivos e os íons fluoretos não alteram a topografia superficial e os valores de rugosidade média da liga Ti-6Al-4V e do Ti cp. A aderência de *S. mutans* não é alterada em função dos tratamentos experimentais.

2 Revisão da literatura

2.1 Titânio, soluções fluoretadas, testes de imersão e escovação

No Brasil, os parâmetros necessários para que um produto classificado como dentifrício fluoretado seja comercializado foram definidos no ano de 1989¹¹. A partir desta data, a Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos (DICOP) assumiu a fiscalização de tais produtos, exigindo que a concentração inicial de flúor seja de, no mínimo, 1.000 ppm e, no máximo, de 1.500 ppm. Adicionalmente, por saber que o flúor tende a reagir com os demais componentes do dentifrício, deteriorando em função do tempo, estipulou-se que uma concentração mínima de 600 ppm seja mantida até o final do seu prazo de validade.

Siirila, Könönen⁷³, em 1991, avaliaram os efeitos dos fluoretos de dentifrícios, géis profiláticos e vernizes sobre o Ti cp. Após polimento eletroquímico, amostras na forma de discos foram submetidas a testes de imersão ou escovação utilizando-se água destilada, dentifrício-não fluoretado (Sensodyne), dentifrício com 1.250 ppm F⁻ (Elmex) ou gel fluoretado com 12.500 ppm F⁻ (Elmex gel). Nos testes de imersão, os corpos-de-prova foram mantidos estaticamente submersos nas referidas soluções. Os testes de escovação foram realizados de forma linear e manual. Os procedimentos

de imersão e escovação foram realizados durante seis dias. Análises das amostras em microscopia ótica e em MEV foram realizadas no primeiro, terceiro e no sexto dia do experimento. Independentemente do período de imersão, nenhum indício de corrosão foi observado quando a água destilada, o dentifrício fluoretado e o dentifrício não-fluoretado foram utilizados. A imersão em gel fluoretado propiciou o aparecimento de corrosão na forma de pites após o terceiro dia, os quais se intensificaram após o sexto dia. As superfícies escovadas apresentaram a formação de sulcos, que foram mais intensos quando apenas água destilada foi utilizada; nenhum indício de corrosão foi identificado nestas superfícies. Segundo os autores, durante a escovação, a abrasão mecânica propiciada pelas cerdas das escovas parece ser o principal fator deteriorante da superfície do Ti cp; entretanto, o uso de géis fluoretados em pacientes portadores de infraestruturas confeccionadas com este tipo de metal deveria ser realizado com cautela.

A susceptibilidade de corrosão sob tensão no Ti cp devido à aplicação de fluoretos tópicos foi avaliada por Kononen et al.⁴⁰ em 1995. Barras de Ti cp polidas eletroquimicamente foram tensionadas até o limite elástico, obtendo-se amostras na forma de U. Estas amostras foram imersas em gel fluoretado Elmex (12.500 ppm F⁻, pH = 5,5) durante 1, 5, 10 e 20 dias. Ao término do período de imersão, as amostras foram submetidas ao ensaio mecânico de tração. Adicionalmente, as amostras foram avaliadas em MEV. Logo após o primeiro dia de imersão, as amostras apresentaram corrosão evidente nas micrografias, com aumento da rugosidade e formação de pites. A partir do quinto dia, as

superfícies apresentaram formação de trincas características da corrosão sob tensão e ausência de deformação plástica. Desta forma, pelo fato do gel fluoretado causar o fenômeno de corrosão sob tensão nas superfícies avaliadas, os autores recomendaram que tal produto fosse contraindicado para pacientes portadores de infraestruturas confeccionadas com titânio.

Em 1996, Toumelin-Chemla et al.⁸³ analisaram os efeitos de um gel fluoretado sobre o Ti cp e sobre a liga Ti-6Al-4V. A corrosão das amostras foi mensurada de acordo com a resistência de polarização linear (R_p) em solução fisiológica de Ringer, em gel fluoretado (10.000ppm F^- ; pH = 5,5) e em solução de Ringer fluoretada (10.000 ppm F^- ; pH = 6,75). Quando imerso na solução fisiológica, o titânio apresentou-se resistente à corrosão, mantendo-se intacto e brilhante, tal como após o polimento metalográfico. Entretanto, quando imerso em meio ácido e fluoretado, não houve a passivação da superfície, sendo identificado um aumento de rugosidade do metal. Mediante os resultados obtidos, os autores enfatizaram a possibilidade de géis fluoretados acidulados serem prejudiciais à superfície do titânio, sugerindo que a prescrição destes agentes fosse cuidadosamente planejada.

As alterações de potencial elétrico durante a repassivação e a caracterização da camada de óxidos formada após a imersão do titânio em biolíquidos foram avaliadas por Hanawa et al.²⁸ em 1998. Amostras de Ti cp foram polidas metalograficamente e imersas em solução aquosa saturada de cloreto de potássio até obter-se a estabilidade do potencial (mensurado em eletrômetro). Neste

momento, adicionava-se água deionizada (pH = 6,9), solução aquosa de cloreto de sódio (pH = 5,2) ou soluções salinas de Hank (pH = 7,4 ou 5,0) sobre as amostras. Simultaneamente, as superfícies das amostras eram abrasionadas com lixas de carbeto de silício para que a camada de óxidos fosse removida. Os autores verificaram que a velocidade de repassivação era menor quando a solução de Hank era utilizada, havendo a deposição de íons fosfato na superfície. O pH da solução não interferiu na velocidade de repassivação. Desta forma, os resultados indicaram que em sistemas biológicos, a repassivação do titânio é mais lenta do que se previa, o que possibilita uma maior dissolução e liberação de íons ao meio.

Diante da possibilidade dos dentifrícios e géis fluoretados iniciarem um processo corrosivo na superfície do titânio, Reclaru, Meyer⁶⁴ (1998) testaram o efeito de soluções fluoretadas sobre as propriedades eletroquímicas de implantes confeccionados em Ti cp. Soluções fisiológicas ou saliva artificial com e sem a presença de 1.000 ppm F⁻ e com valores de pH entre 3,0 e 6,15 foram utilizadas. As propriedades eletroquímicas foram determinadas por meio da realização de ensaios de potencial de circuito aberto, curva potenciodinâmica e polarização. Após estes ensaios, as superfícies foram avaliadas em MEV, tendo sua composição química determinada por energia dispersiva de raios-X (EDX). Os resultados obtidos demonstraram que as soluções fluoretadas com pH entre 3,5 e 6,15 não causaram corrosão nas superfícies dos implantes. Entretanto, quando o pH foi inferior a 3,5, um processo corrosivo foi identificado mediante a presença de pites, de

fissuras superficiais e de deposição de fluoretos nestas superfícies.

A resistência à corrosão é uma das propriedades que influenciam a indicação de um metal para o uso Odontológico. Devido a esse fato, Strietzel et al.⁷⁸, em 1998, avaliaram a resistência à corrosão do titânio em função da exposição à diferentes meios e pHs. Amostras de Ti cp foram imersas em meios contendo cloretos, tiocianatos, fluoretos, lactatos, citratos, oxalatos e acetatos durante um mês. A cada semana, a amostras eram avaliadas por meio de espectroscopia de absorvância atômica para mensuração da liberação de íons. Os resultados obtidos indicaram uma liberação acelerada de íons metálicos em meios fluoretados, que foi potencializada quando o pH era inferior a 2,9. Desta forma, os autores sugerem que os fluoretos presentes em dentifrícios ou em agentes profiláticos poderiam reagir com a superfície do titânio, comprometendo a resistência à corrosão deste metal.

Em 1999, Nakagawa et al.⁵² estudaram, por meio de testes de polarização anódica, os efeitos da concentração de fluoretos e do pH sobre a resistência à corrosão do titânio. Amostras de Ti cp foram submetidas à imersão em soluções de fluoreto de sódio com concentrações variando entre 90,5 e 9.048 ppm F⁻ e valores de pH entre 3,0 e 7,0. Os resultados revelaram que o titânio foi corroído tanto em meios ácidos com pequena quantidade de fluoretos, como também em meios alcalinos e neutros com alta concentração de fluoretos. Segundo os autores, tais resultados revelaram que existem limites, nos quais a associação entre a concentração de fluoretos e os valores de pH alteram a

resistência à corrosão do titânio. Assim sendo, os autores afirmaram que o titânio pode ser facilmente corroído no ambiente bucal após o uso de géis, enxaguatórios ou dentifrícios contendo fluoretos ácidos.

Sabendo da ampla variedade de dentifrícios disponíveis comercialmente e da presença de diferentes concentrações de fluoretos nestes produtos, Biesbrock et al.⁷ (2001) conduziram um estudo clínico randomizado com o intuito de avaliar a eficácia da escovação utilizando dentifrícios fluoretados com concentrações entre 1.100 e 2.800 ppm F⁻ (na forma de NaF) e com abrasivos a base de sílica. Uma amostra composta por 5.439 moradores de áreas com abastecimento de água não fluoretada foi utilizada. Os participantes receberam informações sobre como conduzir a higiene bucal e foram avaliados por meio de exames clínico e radiográficos, trimestralmente, por um período de três anos. Durante o primeiro ano de avaliações, os resultados demonstraram haver uma relação entre a concentração de fluoretos e a redução no índice de cáries, sendo a concentração de 2.800 ppm a que proveu melhores resultados. Todavia, nos dois anos seguintes, a ação dos fluoretos pareceu estar mais relacionada com a frequência de uso do que com a concentração utilizada.

Diante das diferenças apresentadas no delineamento de testes de escovação, Dyer et al.²⁰ (2001) avaliaram a abrasão e a remoção de substrato propiciado pelo uso de escovas dentais em testes de escovação linear ou oscilatório/rotatório. Para medir a abrasão e a remoção de material propiciado por cada tipo de escova, lâminas de acrílico transparente (substrato) foram escovadas e

analisadas, antes e após a execução do teste, em perfilômetro e espectrofotômetro. A abrasão e a remoção de substrato foram proporcionais ao número de ciclos de escovação, havendo diferenças entre os tipos de cerdas e os tipos de escovação realizados. De modo geral, a escovação rotatória/oscilatória removeu menor quantidade de substrato. Quando o mesmo tipo de teste foi realizado, as escovas com maior área em contato com o substrato promoveram a maior abrasão.

Com o intuito de desenvolver ligas de titânio mais resistentes à corrosão, Nakagawa et al.⁵⁰ (2001) avaliaram a influência de diferentes concentrações de fluoretos e diferentes pHs na resistência à corrosão da liga experimental Ti-0,2Pd (titânio-paládio), comparando-a com o Ti cp e com as ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb. As amostras foram polidas metalograficamente e imersas em soluções de fluoreto de sódio com concentrações de F⁻ entre 226 e 9.048 ppm, e valores de pH entre 3,0 e 7,0. Os resultados referentes aos testes de polarização anódica e à mensuração do potencial de corrosão eletroquímica, utilizados para quantificar a resistência à corrosão, demonstraram que o Ti cp, a liga Ti-6Al-4V e a liga Ti-6Al-7Nb foram degradados pelos fluoretos, apresentando corrosão tanto em meios ácidos com pequena concentração de fluoretos, como em meios neutros ou alcalinos com altas concentrações de fluoretos. Por outro lado, nestas mesmas condições, a liga experimental apresentou melhor resistência à corrosão, a qual foi associada à presença de paládio. Desta forma os autores concluíram que o uso da liga Ti-0,2Pd poderia ser considerado uma alternativa vantajosa na área Odontológica.

Diante das constantes averiguações de que soluções fluoretadas podem atacar o titânio por meio de processos corrosivos, Huang³² (2002) avaliou o efeito dos fluoretos e da tensão elástica à tração na resistência à corrosão do Ti cp. Amostras na forma de halteres foram preparadas e imersas em solução de fluoreto de sódio (pH 6,0) com diversas concentrações de flúor (0 a 10.000 ppm). A resistência à corrosão foi determinada por meio de testes eletroquímicos que mensuraram a resistência à polarização (R_p) da superfície simultaneamente à realização do ensaio mecânico de resistência à tração. A morfologia superficial do Ti cp foi avaliada em MEV. A técnica de EDX foi utilizada para quantificar os elementos químicos presentes nas superfícies. Os valores de R_p foram inversamente proporcionais à concentração de fluoretos e à força de tração aplicada. As micrografias evidenciaram a presença de corrosão quando a concentração de fluoretos foi igual a 10.000 ppm, havendo a identificação de cristais de Na_2TiF_6 impregnados na superfície.

No ano de 2002, Nakagawa et al.⁵¹ avaliaram a resistência à corrosão de duas ligas experimentais - Ti-0,2Pd (titânio-paládio) e Ti-0,5Pt (titânio-platina) em meios fluoretados, comparando tais ligas com o Ti cp e com as ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb. As amostras foram polidas metalograficamente e imersas em saliva artificial com ou sem a adição de diferentes concentrações de fluoreto de sódio (entre 226 e 9.048 ppm F^-) e com pHs entre 3,0 e 7,0. A resistência à corrosão foi determinada mediante a realização de testes de polarização anódica, mensuração do potencial de corrosão eletroquímica e determinação do conteúdo de íons

titânio dissolvidos (espectroscopia). Os resultados obtidos demonstraram não haver corrosão na ausência de fluoretos. O Ti cp e as ligas Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb foram degradados pelos fluoretos, apresentando corrosão tanto em meios ácidos com pequena concentração de fluoretos, como em meios neutros ou alcalinos com altas concentrações de fluoretos. Por outro lado, os autores verificaram que a presença de paládio e platina nas ligas experimentais aceleraram a reação catódica, aumentando a passividade do metal, e conseqüentemente, melhorando a resistência à corrosão em meios fluoretados.

No ano de 2003, o Conselho para Assuntos Científicos da Associação Odontológica Americana³ descreveu um histórico sobre o uso do titânio e das ligas a base de titânio, definindo as recomendações para o seu uso na prática clínica. Segundo esta instituição, as propriedades físicas, químicas e mecânicas de tais materiais os tornam a escolha mais apropriada para a confecção de dispositivos implantodônticos. Entretanto, também podem ser indicados como materiais de infraestruturas de coroas e próteses, como alternativas viáveis à substituição de metais nobres, desde que os métodos de processamento e a habilidade dos técnicos laboratoriais sejam adequados.

Com o intuito de monitorar a concentração de fluoretos presentes na saliva após a escovação, Campus et al.¹⁴ (2003), realizaram um estudo clínico randomizado, no qual avaliaram cinco diferentes agentes fluoretados. Cento e quatro estudantes foram divididos em grupos experimentais de acordo a utilização de dentifrício com monofluorfosfato de sódio (NaMFP; 1.500 ppm F⁻, pH = 5,5), dentifrício com

fluoreto de amina (AmF; 1.500 ppm F⁻; pH = 5,5), além de associações destes dentifrícios com enxaguatório (AmF; 1.500 ppm F⁻; pH = 4,3) ou verniz fluoretados (NaMFP; 1.500 ppm F⁻; pH = 4,3). Todos os estudantes receberam informações sobre como conduzir a higiene bucal, sendo orientados a escovarem os dentes durante três minutos, três vezes ao dia. Nos grupos com associações de produtos, 20mL de enxaguatório deveriam ser utilizados durante 30 segundos e a aplicação do gel fluoretado incluía três aplicações diárias. Para monitorar a presença dos fluoretos, amostras de saliva foram coletadas imediatamente após a higienização da boca (*baseline*), 30, 60, 90 e 120 min após o *baseline* durante 20 dias. A mensuração da quantidade de fluoretos foi realizada com eletrodo íon-específico acoplado a um potenciômetro. A concentração de F⁻ na saliva após a utilização de produtos com AmF manteve-se constantemente em níveis inferiores a 20 ppm. O uso de produtos com NaMFP propiciaram maior concentração de F⁻ na saliva, a qual apresentou níveis próximos a 200 ppm F⁻ nos primeiros 90 segundos, e queda até a estabilização, em torno de 29 ppm, nos 30 minutos seguintes.

Davies et al.¹⁸ (2003) revisaram os conceitos e evidências acerca dos benefícios propiciados pelo uso dos dentifrícios fluoretados. Segundo estes autores, três fatores são de fundamental importância para que os efeitos de prevenção ao desenvolvimento de cárie sejam obtidos: a concentração de fluoretos, a frequência e o comportamento pós-escovação. De acordo com os dados avaliados, dentifrícios com baixa concentração de flúor (< 600 ppm) promovem efeitos inferiores na prevenção de cárie em relação

aos dentifrícios padrões (1.000 a 1.500 ppm F⁻), sendo mais indicados para crianças com menos de 7 anos e que exibem baixo risco ao desenvolvimento de cárie. Independentemente da concentração de flúor apresentada pelo dentifrício, os autores recomendam que pelo menos duas escovações diárias sejam realizadas, e que não seja utilizada uma grande quantidade de água para o enxágue da cavidade bucal.

Twetman et al.⁸⁵ (2003) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de reportar os achados mais importantes referentes aos efeitos profiláticos dos dentifrícios fluoretados. Foram avaliados estudos que incluíam diferentes faixas etárias e, dentifrícios com diferentes concentrações de fluoretos. Apesar dos estudos disponíveis fornecerem evidências incompletas quanto à ação dos fluoretos na dentição decídua, os autores destacaram haver alta evidência na prevenção de cáries em dentes permanentes quando dentifrícios com concentrações iguais ou superiores a 1.500 ppm F⁻ são utilizados diariamente.

Watanabe, Watanabe⁹¹ (2003) investigaram a rugosidade média, as características de superfície e as alterações de cor de fios ortodônticos a base de titânio após a utilização de diferentes agentes profiláticos fluoretados. Quatro tipos de fios a base de titânio (Ni-Ti, Cu-Ni-Ti, Ti-Mo e Ti-Nb) com 0,48 X 0,64 X 10 mm foram preparados e mantidos imersos durante 5 minutos, 1 hora ou 24 horas em um dos cinco agentes profiláticos avaliados: Nupro APF (2,5% de fluoreto de sódio, pH = 3,9), Florentine III (2,59% de fluoreto de sódio, pH = 3,5), Neupro neutro (2% de fluoreto de sódio, pH = 6,7), Florentine II (0,4% de fluoreto de estanho, pH = 2,8) ou Perio-Med (0,63% de fluoreto de estanho, pH = 3,3).

Após os períodos de imersão, a rugosidade média dos fios foi mensurada em rugosímetro, as superfícies foram avaliadas em MEV e as alterações de cor foram quantificadas por dois dentistas e três auxiliares odontológicos mediante a atribuição de escores (0 a 12). Alterações nas superfícies dos fios imersos foram observadas nas micrografias quando os períodos de 1 hora e 24 horas foram comparados. Apenas os fios de Ti-Mo imersos em Nupro APF se tornaram mais rugosos, havendo alterações marcantes na coloração após o período de 24 horas de imersão. Por observarem que a liga Ti-Mo, que apresenta mais de 80% de titânio, foi a mais alterada, os autores sugeriram que a aplicação de agentes profiláticos fluoretados ácidos sobre o titânio fosse evitada.

A resistência à corrosão do titânio também foi avaliada por Al-Mayouf et al.², em 2004. Os autores analisaram as superfícies do Ti cp e das ligas Ti-6Al-4V e Ti-Cu-Ag após a imersão em saliva artificial (pH = 7,2) e saliva artificial com a adição de diferentes quantidades de fluoreto de sódio (0,01; 0,05 e 0,5M) e diferentes pHs (7,2 e 3,0). As amostras foram analisadas por meio de ensaios eletroquímicos (potencial de circuito aberto, polarização anódica e impedância eletroquímica) e MEV. Altas taxas de corrosão foram observadas tanto em soluções neutras com alta concentração de fluoretos, como em soluções ácidas com baixa concentração de fluoretos. O aumento da concentração de F⁻ propiciou aumento da espessura e/ou formação de poros na camada de óxidos, reduzindo a proteção contra a corrosão. A presença de Cu e Ag na liga Ti-Cu-Ag aumentou a proteção contra a corrosão em meio ácido. Para os autores, os resultados demonstraram que os fluoretos afetam a

resistência à corrosão do titânio e de suas ligas, sendo a magnitude das alterações dependente tanto da concentração de fluoretos como do valor de pH.

Dois anos depois, Hossain et al.³⁰ delinearam um estudo com o objetivo de investigar as interações existentes entre a superfície do titânio e os abrasivos presentes em dentifrícios. Para tanto, amostras de Ti cp foram polidas metalograficamente até a obtenção de uma superfície espelhada, e submetidas à escovação. Foram utilizados dois dentifrícios não-fluoretados, um composto por abrasivos a base de carbonato de cálcio, e o outro, por abrasivos a base de sílica. As amostras foram escovadas em uma máquina de escovação linear durante 48 horas. Após a escovação, a topografia da superfície do titânio foi avaliada por meio da mensuração da rugosidade média em microscópio de varredura por sonda. A composição elementar das superfícies escovadas foi quantificada por meio de microanalisadores de sonda eletrônica. Independentemente do tipo de abrasivo presente no dentifrício, todas as amostras escovadas apresentaram aumento da rugosidade, entretanto, o uso de carbonato de cálcio propiciou maiores alterações. As superfícies apresentaram alterações químicas devido às reações com os abrasivos, havendo a deposição de cálcio, fósforo e sílica. Os autores sugerem que dentifrícios com baixo grau de abrasividade sejam recomendados aos pacientes portadores de infraestruturas confeccionadas com titânio.

O efeito dos fluoretos sobre a liga Ti-Mo, utilizada em fios ortodônticos, foi estudado por Kaneko et al.³⁸ (2003). Amostras com 150 mm X 0,45 mm de diâmetro

foram submetidas ao ensaio mecânico de tração sob imersão em duas soluções de fluoreto de sódio: (1) 900 ppm F⁻, pH 5,0, ou (2) 9.000 ppm F⁻, pH 6,5. Após a ruptura, as superfícies das amostras foram avaliadas em MEV e em difratômetro de raios-X. Todas as superfícies apresentaram descoloração independentemente da concentração de fluoretos utilizada. O tempo para a ocorrência da ruptura foi menor quando a solução com 9.000 ppm F⁻ foi utilizada, havendo a formação de pites e formação do composto de Na₅Ti₃F₁₄ nas superfícies imersas nesta solução. Desta forma, os autores concluíram que a imersão em soluções fluoretadas pode gerar a degradação das propriedades mecânicas da liga Ti-Mo, contraindicando a utilização de géis fluoretados sobre os fios ortodônticos confeccionados com este material.

Mabilleau et al.⁴⁴ (2006) investigaram a resistência à corrosão do Ti cp após diferentes períodos de imersão em saliva artificial Fusayama-Meyer fluoretada. Amostras na forma de discos foram preparadas metalograficamente e mantidas imersas durante 9 dias. Como meios de imersão foi utilizada saliva artificial Fusayama-Meyer com adição de 5.000 ou 25.000 ppm F⁻ e com pHs iguais a 5,3 ou 4,5. A resistência a corrosão foi quantificada, indiretamente, por meio de análises em (1) microscopia de força atômica (MFA, modo contato, leituras em superfícies com 20 X 20 μm²), na qual os valores de rugosidade média foram obtidas; (2) microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual foram realizadas investigações qualitativas da superfície; e (3) energia dispersiva de raios-X (EDX), responsável pela quantificação de elementos presentes na superfície. Os valores de rugosidade média foram avaliados

antes do início da imersão e cada três dias, até completar os nove dias do experimento. As análises em MEV e EDX foram realizadas após o término do período de imersão. Todas as condições experimentais, com exceção da imersão em saliva artificial com pH 5,3, propiciaram aumento progressivo da rugosidade em função do tempo. O aumento progressivo da rugosidade foi acompanhado por ataques uniformes na forma de pites corrosivos. As superfícies imersas em 25.000 ppm F⁻ foram as que apresentaram as maiores magnitudes de alterações, havendo a deposição de compostos piramidais de Na₂TiF. Em função dos resultados obtidos, os autores recomendaram que pacientes portadores de infraestruturas confeccionadas em titânio evitassem o uso de soluções fluoretadas.

Matono et al.⁴⁵, em 2006, estudaram a resistência à corrosão do Ti cp e das ligas Ti-6Al-7Nb, Ti-6Al-4V e Ti-0,5Pt em função do uso de soluções fluoretadas aciduladas. As amostras foram avaliadas mediante testes de imersão em soluções de NaF com concentrações variando entre 226 e 9.050 ppm F⁻ e pHs entre 3,5 e 3,6. A resistência à corrosão foi determinada mediante avaliações do potencial corrosivo, da dissolução de íons e da composição química da superfície. Estes parâmetros foram mensurados, respectivamente, por meio da curva de polarização anódica, da espectrometria de absorvância e da difratometria de raios-X. A corrosão do Ti cp e das ligas Ti-6Al-7Nb e Ti-6Al-4V ocorreu em todas as concentrações de F⁻ avaliadas, havendo a dissolução de Ti e a formação de pites corrosivos. Quando a concentração de 9.050 ppmF⁻ foi utilizada, estes mesmos metais apresentaram a deposição de Na₃AlF₆ e Na₃TiF₆ em

suas superfícies, demonstrando corrosão severa. Em contraste a estes resultados, a liga experimental Ti-0,5Pt não apresentou dissolução de íons titânio em meios com menos de 905 ppm F⁻. Além disso, não ocorreu deposição de produtos de corrosão na superfície desta liga mesmo quando a maior concentração de fluoretos foi aplicada, o que segundo os autores poderia demonstrar um melhor comportamento clínico deste tipo de liga.

Hossain et al.³¹ (2007) caracterizaram a topografia superficial e a composição do titânio após a escovação com dentifrícios não-fluoretados de diferentes pHs, visando elucidar as interações físico-químicas existentes entre o metal e o abrasivo presente no dentifrício. Corpos-de-prova de Ti cp foram polidos metalograficamente e submetidos à escovação com dentifrícios não-fluoretados compostos por abrasivos a base de carbonato de cálcio ou a base de sílica. Tais dentifrícios foram misturados à água destilada ou à água destilada acrescida de tampões ácidos (pHs iguais a 4,8 ou 6,8). Os corpos-de-prova foram escovados em uma máquina de escovação linear durante 48 horas. Após a escovação, a topografia da superfície do titânio foi avaliada por meio da mensuração da rugosidade média utilizando-se a microscopia de varredura por sonda. A composição elementar das superfícies escovadas foi quantificada por meio de microanalisadores de sonda eletrônica. Todas as amostras escovadas apresentaram aumento da rugosidade e deposição de íons cálcio, fósforo e/ou sílica. A utilização de carbonato de cálcio propiciou maiores riscos à superfície. Independentemente do tipo de abrasivo utilizado, as superfícies escovadas com soluções

ácidas apresentaram rugosidade intermediárias entre as do grupo controle (sem escovação, menor rugosidade) e as do grupo escovado com solução pH 6,8 (maior rugosidade). De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a utilização de dentifrício não-fluoretado ácido poderia minimizar a formação de placa por promover uma espécie de polimento químico na superfície do titânio, demonstrando a influência do pH da solução quando efeitos abrasivos na superfície do titânio são avaliados.

Huang³³ (2007) avaliou a topografia superficial de arcos ortodônticos de níquel-titânio (NiTi) após imersão em ambiente fluoretado. Arcos de quatro marcas comerciais foram imersos em oito diferentes soluções - (1) enxaguatório sem flúor (pH = 5,6); (2) enxaguatório fluoretado (491 ppm F⁻, pH = 5,6); saliva artificial Fusayama + dentifrícios fluoretado com (3) 527 ppm F⁻, pH = 6,2, (4) 1.685 ppm F⁻, pH = 6,3, (5) 2.491 ppm F⁻, pH = 7,3 ou (6) 998 ppm F⁻, pH = 6,0 e saliva artificial Fusayama + géis profiláticos fluoretados com (7) 1.483 ppm F⁻, pH = 3,4, ou (8) 17.010 ppm F⁻, pH = 3,4. A topografia de superfície foi avaliada em MFA (leituras em superfícies com 30 X 30 μm²) antes e após 28 dias de imersão. Independente da marca comercial, aumentos significativos nos padrões de rugosidade avaliados (rugosidade média e rugosidade média quadrática) foram observados após a imersão em gel com alta concentração de fluoretos (17.000 ppm). Entretanto, baixas concentrações de fluoretos (menor que 2500 ppm) não alteraram a rugosidade. Os autores concluíram que a utilização de géis profiláticos fluoretado com pH ácido podem comprometer o desempenho dos arcos NiTi.

Lindholm-Sethson, Ardlin⁴³ (2008) investigaram o efeito da escovação e da imersão do titânio em função da concentração de fluoretos e do pH das soluções utilizadas. Amostras de titânio na forma de discos foram polidas metalograficamente e submetidas à imersão ou escovação utilizando-se solução fisiológica de cloreto de sódio com ou sem a adição de fluoreto de sódio (0,3; 0,6 ou 1,0% em peso) e com valores de pHs iguais a 4,0; 4,5; 5,0 e 7,0. No teste de escovação, foram utilizadas escovas elétricas oscilatórias durante 2 minutos. Os efeitos químicos da imersão foram avaliados por meio de técnicas eletroquímicas (potencial de circuito aberto, impedância eletroquímica espectroscópica e curvas de polarização anódica). As soluções utilizadas durante a escovação foram analisadas em espectrometria de absorvância atômica para mensuração da liberação de íons titânio. Independentemente do valor do pH da solução, não houve liberação de íons na ausência de fluoretos. A liberação destes íons ocorreu somente quando a solução apresentou 0,6% ou 1,0% de fluoreto de sódio e valores de pH inferiores a 5,0. As análises eletroquímicas demonstraram que presença de fluoretos foi desfavorável à manutenção da estabilidade da camada de óxidos do titânio, havendo corrosão da superfície quando os valores do pH foram inferiores a 5,0. Diante destes resultados, os autores afirmam que a combinação entre baixo pH e alta concentração de fluoretos pode ser deletéria à superfície do titânio.

Molina et al.⁴⁶, em 2008, avaliaram o efeito da escovação com dentifrícios fluoretados de diferentes graus de abrasividade sobre a resistência à corrosão do Ti cp das ligas NiCr e CoCr. Os testes de escovação foram realizados

em saliva artificial pura ou em soluções contendo saliva artificial com a adição de dentifrícios fluoretados. Foram utilizados dentifrícios com graus de abrasividade média iguais a 50, 52, 80 e 114. Todas as soluções apresentaram pH entre 7,0 e 7,4. As amostras foram escovadas durante 420 minutos, utilizando-se escovas elétricas de ação oscilatória (40.000 pulsações/minuto). Antes e após a escovação, as amostras foram avaliadas em potenciostato de alta sensibilidade para mensuração da corrosão. Após a escovação, as soluções utilizadas foram avaliadas em espectroscopia de absorvância para determinação da liberação de íons. Adicionalmente, a microestrutura das amostras foi analisada por meio de microscopia óptica e a dureza determinada em microdurômetro. A liga Ni-Cr apresentou as maiores densidades de corrente, além da presença de pites corrosivo nas superfícies e alta liberação de íons Ni e Cr (respectivamente ≈ 80 e ≈ 140 ppb). O titânio mostrou a melhor resistência à corrosão, tanto antes como após a escovação. Todos os metais avaliados apresentaram diminuição da resistência à corrosão e aumento de microdureza à medida que o grau de abrasividade da pasta aumentava.

Dando continuidade ao estudo anterior, Nogueira et al.⁵⁴ (2008) avaliaram o efeito da imersão e da escovação sobre as superfícies de Ti cp e das ligas NiCr e CoCr utilizando dentifrícios fluoretados com diferentes graus de abrasividade. Os testes de imersão e escovação foram realizados em saliva artificial pura ou em soluções contendo saliva artificial com a adição de quatro dentifrícios fluoretados com graus de abrasividade média (determinados pela

especificação ISO 11609) iguais a 50, 52, 80 e 114. Todas as soluções utilizadas apresentaram pH entre 7,0 e 7,4. As amostras permaneceram imersas durante 420 minutos, mesmo período utilizado para o teste de escovação, nos quais escovas elétricas de ação oscilatória (40.000 pulsações/minuto) foram empregadas. Antes e após a execução dos testes, as amostras tiveram sua massa aferida. Nestes mesmos períodos, as superfícies foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura, em rugosímetro e em microdurômetro. Nenhum dos metais avaliados apresentou alterações após a imersão. A escovação ocasionou a abrasão das superfícies com intensidades proporcionais aos graus de abrasividade dos dentifrícios. Independentemente do tipo de dentifrício, as amostras de titânio e de Co-Cr apresentaram, respectivamente, a maior e a menor perda de massa. Não foram detectadas alterações nos valores de rugosidade das amostras. Dessa forma, os autores inferem que a utilização de dentifrícios abrasivos durante a escovação oscilatória não apresenta alterações com consequências clínicas significantes.

Popa et al.⁵⁹ (2008) compararam os efeitos da imersão prolongada (20.000 horas) e da imersão durante curto período de tempo (500 horas) nas superfícies do Ti cp e da liga Ti-5Al-4V. O método da polarização potenciodinâmica foi utilizado para determinação da resistência à corrosão; a MFA foi utilizada como ferramenta para mensuração da rugosidade média e a liberação de íons foi quantificada por meio de espectroscopia de absorvância. As amostras foram testadas mediante a imersão em saliva artificial Carter-Brugirard (pHs 7,8; 5,75; 2,13) ou Tani&Zucchi (pH = 5,0),

ambas com ou sem a adição de fluoreto de sódio nas concentrações de 0,02 e 0,01 M. Independentemente do período de imersão, todos os metais avaliados apresentaram uma camada de óxidos estável sem a formação de corrosão quando imersos na saliva Carter-Brugirard. Entretanto, na saliva Tani&Zucchi, considerada mais agressiva por apresentar maior quantidade de íons cloreto, foram observados pites e aumento progressivo da rugosidade superficial a medida que o tempo e que a concentração de fluoretos aumentavam.

Neste mesmo ano, Stájer et al.⁷⁶ investigaram os efeitos de enxaguatórios e géis profiláticos com diferentes concentrações de fluoretos na topografia superficial do Ti cp. Corpos-de-prova na forma de discos foram polidos metalograficamente e imersos em (1) enxaguatório com 250 ppm F⁻, pH = 4,4; em (2) solução aquosa de fluoreto de sódio com 3,800 ppm F⁻, pH = 4,5 ou em (3) gel profilático com 12.500 ppm F⁻, pH = 4,8. Após o período de imersão, os corpos-de-prova foram avaliados em MFA (modo contato, leituras em superfícies 10 X 10 µm²) para obtenção dos valores de rugosidade média, e em espectroscopia de raios-X (XPS) para quantificação dos elementos presentes na superfície. Adicionalmente, os autores utilizaram o teste colorimétrico MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazólico) para avaliação da aderência e da proliferação de células epiteliais sobre as superfícies tratadas. A solução aquosa de fluoreto de sódio e o gel profilático corroeram a superfície do titânio, alterando sua composição com a deposição de Na₂TiF₆. Todas as amostras apresentaram aumento de rugosidade. Apenas a aplicação do

gel fluoretado aumentou a aderência das células epiteliais. Diante de tais resultados, os autores sugeriram que os agentes profiláticos fluoretado com alta concentração de fluoretos e baixos pHs fossem utilizados com cautela em pacientes portadores de implantes ou outras estruturas confeccionadas em titânio.

Por considerar a reabilitação com implantes osseointegráveis um dos tratamentos de maior destaque na Odontologia, Chaturvedi¹⁵ (2009) discutiu os aspectos relacionados às falhas do titânio e das ligas a base de titânio. Segundo o autor, apesar dos avanços metalúrgicos e tecnológicos inovadores associados a um progresso notável na concepção e desenvolvimento de materiais cirúrgicos e Odontológicos, falhas associadas aos implantes osseointegráveis ainda ocorrem. Uma das principais causas associadas a estas falhas e que são temas de diversos estudos é a corrosão. Tal fenômeno muitas vezes é atribuído às condições severas encontradas na cavidade bucal, tais como alterações de pH, presença de íons fluoretos e colonização microbiana. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para que os mecanismos que assegurem a bioaceitação do implante bem como sua estabilização estrutural sejam mais bem compreendidos, tornando a ocorrência de falhas deste tratamento cada vez mais rara.

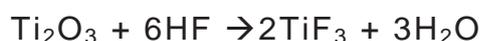
Neste mesmo ano, Sartori et al.⁶⁹ analisaram a influência de soluções fluoretadas com diferentes pHs na superfície de implantes confeccionados em Ti cp. Implantes de três diferentes marcas comerciais (Neodent, 3i Implant Innovations e Nobel Biocare) foram imersos em água destilada ou em soluções fluoretadas com 1.500 ppm F⁻ (pH =

5,3 ou 7,4) permanecendo submersos durante 184 horas. Tal período de imersão simulou, de acordo com os autores, cinco anos de exposição aos íons fluoretos. Para estimar a corrosão propiciada pelos fluoretos, as superfícies foram avaliadas MEV e em EDX. Macroscopicamente, perda de brilho e manchas foram observadas nas superfícies expostas às soluções fluoretadas, sendo tais alterações mais evidentes quando o pH mais baixo foi utilizado. Entretanto, ambas análises não evidenciaram corrosão dos implantes ou deposição de íons fluoretos nas superfícies. Para os autores, os valores de pH avaliados não alteram o efeito dos fluoretos na superfície do titânio quando 1500 ppm F^- são utilizados.

Simulando o uso de enxaguatórios, no ano de 2009, Toniollo et al.⁸² avaliaram os efeitos de soluções fluoretadas sobre a rugosidade do Ti cp. Corpos-de-prova na forma de discos permaneceram imersos em água destilada durante 60 dias, sendo submetidos à imersão em solução aquosa fluoretada (0,05% ou 0,2% de fluoreto de sódio; pH = 7,0) durante 3 minutos diários ou quinzenais. A rugosidade média dos discos (Ra) foi avaliada em rugosímetro logo após o polimento metalográfico, no 15^o, 30^o e 60^o dias. Nenhuma diferença significativa foi encontrada em função da concentração de fluoretos ou dos intervalos de imersão. Segundo os autores, estes resultados permitiram concluir que a utilização de enxaguatórios fluoretados neutros não danificaria a superfície do Ti cp.

Fragou et al.²⁴ (2010) revisaram as evidências sobre os efeitos dos fluoretos no titânio e nas ligas a base de titânio, discutindo os mecanismos envolvidos, possíveis relevâncias clínicas e a validade dos estudos in

vitro já realizados na área. Segundo os autores, os dentifrícios e enxaguatórios fluoretados previnem o desenvolvimento de cáries ao inibirem a atividade microbiana por meio da formação de ácido fluorídrico (HF) quando o pH do biofilme encontra-se em um ácido. Entretanto, o HF possui efeitos negativos na superfície do titânio e das ligas à base de titânio, pelo fato de desorganizarem a camada de óxidos, de acordo com as seguintes reações:



Dessa forma, o espectro de efeitos promovidos por estas reações podem incluir alterações morfológicas, como por exemplo, aumento da rugosidade superficial, redução da resistência à fratura e liberação de íons metálicos. Adicionalmente, segundo os autores, os resultados e as informações disponibilizadas até o momento derivam de estudos in vitro, nos quais a reatividade entre os fluoretos e as superfícies é aparentemente maior em relação às condições reais presentes na cavidade bucal.

Apesar de não possuir caráter regulatório e obrigatório, no ano de 2010, a International Organization for Standardization (ISO)³⁵ revisou as normas técnicas internacionais relacionadas aos requisitos para as propriedades físicas e químicas de dentifrícios, fornecendo as diretrizes para desenvolvimento e para análises destes produtos. Segundo a normativa n^o. 11.609, recomenda-se que

a concentração de fluoretos em dentifrícios não exceda os limites fixados por leis e regulamentos nacionais, apresentando limites de pH entre 4,5 e 10,5.

Joska, Fojt³⁷ (2010) estudaram a interação entre Ti cp e saliva artificial após a imersão em soluções fisiológicas com diferentes concentrações de fluoretos. Corpos-de-prova na forma de discos foram polidos metalograficamente e imersos, durante 15 minutos, em soluções de cloreto de sódio acrescidas ou não de 5.000 ppm F⁻ (na forma de fluoreto de sódio) e com diferentes valores de pH (não ajustado, 5,8 ou 4,2). Após este período, as amostras foram rapidamente transferidas para saliva artificial (pH = 6,8), sendo mantidas imersas neste meio durante 60 minutos. A corrosão do metal foi analisada mediante a utilização de técnicas eletroquímicas durante os dois períodos de imersão. Ao término do experimento, a análise dos elementos químicos presentes nas superfícies foi realizada por meio de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS). Quando imerso em soluções sem fluoretos, a superfície do titânio apresentou curva de polarização passiva. Entretanto, a presença de fluoretos e a redução de pH promoveram um aumento da densidade da corrente e alterações do potencial corrosivo em direção negativa, o que refletiu na deterioração da camada de óxidos. A imersão em solução fluoretada com pH 4,2 promoveu maiores degradações da superfície, sendo identificada a deposição de compostos fluoretados solúveis, os quais retardaram a repassivação da superfície propiciada pela saliva artificial. Para os autores, tais resultados sugerem que mesmo com a remoção do agente agressor (no caso os fluoretos), a desestabilização da passividade do titânio irá

requerer um longo período para ser revertida, tornando a superfície susceptível a consequências negativas.

Muguruma et al.⁴⁹ (2011) investigaram a resistência à torsão de mini-implantes confeccionados em Ti-6Al-4V após imersão em soluções fluoretadas. Os mini-implantes foram imersos em enxaguatórios contendo 1.000 ou 2.000 ppm F⁻ (pH 5,12 e 5,14, respectivamente) durante uma ou 24 horas. Ao término dos períodos de imersão, as superfícies foram avaliadas em MEV e os implantes foram submetidos a um aumento de torque até a ocorrência de fratura. A fim de obter a composição do implante e identificar possíveis deposições de flúor, as superfícies foram analisadas em difratômetro de raios-X. Ambas as soluções utilizadas promoveram a formação de trincas e pites nas superfícies, que apresentaram deposição de produtos de corrosão (Na₃AlF₆). Entretanto, por não haver alterações nos valores de torque e nos ângulos de torção, os autores sugerem que o uso de enxaguatórios fluoretados com as concentrações avaliadas não comprometeria o desempenho clínico dos mini-implantes.

2.2 Aderência de micro-organismos às superfícies de titânio

Diante do notório avanço na utilização de biomateriais, Gristina²⁵ (1987) publicou orientações acerca da utilização de ligas metálicas e polímeros para a confecção de implantes médicos e odontológicos. Segundo o autor, os maiores obstáculos para o uso destes materiais são a

ocorrência de infecções, falta de sucesso na integração e/ou na compatibilidade entre as superfícies. Associados à aderência de micro-organismos, a geometria atômica e a energia livre da superfície dos materiais são listadas como os principais fatores influentes nos mecanismos de interação entre o biomaterial, as células teciduais e os micro-organismos, devendo ser mais bem compreendidos mediante a realização de estudos médicos, bioquímicos e microbiológicos.

Nakazato et al.⁵³ (1989) conduziram um estudo in vivo com o objetivo de avaliar a aderência de micro-organismos em diferentes materiais utilizados para a confecção de implantes. Amostras na forma de discos foram preparadas utilizando alumina, zircônia, hidroxiapatita ou Ti cp. Os discos foram analisados em rugosímetro e goniômetro para mensuração da rugosidade média e da energia livre de superfície. A seguir, foram adaptados em dispositivos de acrílico colocados bilateralmente na região posterior da maxila de três pacientes. Após quatro ou 48 horas da colocação dos dispositivos, os discos foram removidos, analisados em MEV e submetidos a testes microbiológicos de cultura celular para averiguação da aderência de micro-organismos. Após um período de quatro horas, independentemente dos materiais avaliados, os autores verificaram correlação positiva entre o número de micro-organismos aderidos e o aumento da rugosidade de superfície. Os valores de energia livre de superfície não alteraram a aderência. Além disso, durante o período de 4 horas, houve predominância de micro-organismos da espécie dos *Streptococcus*. A maturação do biofilme não dependeu do

material em estudo, havendo aumento das bactérias anaeróbias após 48 horas.

Em 1993, Quirynen et al.⁶² avaliaram a influência da rugosidade de superfície sobre a microbiota de biofilmes supra e subgingivais. Nove pacientes tiveram os pilares de suas próteses implanto-suportadas substituídos por pilares lisos (rugosidade média de 0,35 μm) ou rugosos (rugosidade média de 0,81 μm). Após três meses de uso, as próteses foram removidas e amostras do biofilme formado foram obtidas. O biofilme supragengival foi removido por meio de curetas, enquanto o biofilme subgingival foi adquirido mediante a inserção de cones de papel absorvente no interior da bolsa periodontal, e por meio da curetagem do pilar após sua remoção da cavidade bucal. O biofilme coletado foi avaliado por meio de técnicas de microscopia de contraste de fase, análise de DNA e cultura celular. Os autores notaram que o biofilme supragengival dos componentes rugosos apresentava menor quantidade de micro-organismos na forma de cocos, indicando a formação de um biofilme mais maduro. As regiões subgingivais dos componentes rugosos apresentavam 25 vezes mais bactérias que as superfícies lisas, com uma ligeira diminuição da densidade de cocos e aumento dos micro-organismos móveis e espiroquetas. Desta forma, os autores sugeriram o uso de pilares com superfícies mais lisas reduziriam a colonização bacteriana, diminuindo o risco de desenvolvimento de peri-implantites.

Em 1995, Quirynen, Bolen⁶⁰ realizaram uma revisão de literatura acerca da influência da rugosidade média e da energia livre de superfície sobre a aderência e estagnação dos biofilmes. Segundos estudos in vivo e in vitro,

superfícies mais rugosas promovem a formação e a maturação do biofilme, enquanto superfícies com maior energia livre proporcionam a formação de um biofilme mais espesso e mais firmemente aderido à superfície. Estas duas propriedades interagem entre si, porém, os estudos demonstram ser a rugosidade de superfície o fator mais influente durante a formação do biofilme. Desta forma, segundo os autores, superfícies supragengivais deveriam apresentar a maior lisura superficial possível para que a aderência de micro-organismos fosse reduzida.

Quirynen et al.⁶¹ (1996) estudaram o efeito do uso de pilares com diferentes rugosidades superficiais na formação de biofilme supra e subgengival. Pilares com rugosidade média entre 0,05 μm e 0,2 μm foram instalados em seis pacientes, permanecendo em função durante um período de três meses. Na quarta e na 12^a semanas após a instalação, os pilares foram removidos para desprendimento do biofilme aderido. O material coletado foi avaliado quantitativamente por meio de testes microbiológicos de cultura celular e, qualitativamente, em microscopia de contraste de fase. Os resultados encontrados mostraram não haver diferenças nos valores de unidade formadoras de colônia entre as diferentes superfícies após um e três meses. As superfícies mais lisas apresentaram maior quantidade de micro-organismos na forma de cocos enquanto aquelas mais rugosas possuíam quantidades significantes de micro-organismos móveis. Diante dos resultados obtidos, os autores sugeriram que a igualdade nos parâmetros do biofilme aderido ocorreu pelo fato de a rugosidade média das superfícies serem inferiores a 0,2 μm , valor considerado limítrofe para

alterações significativas no número de micro-organismos aderidos à superfície do titânio.

Sabendo que superfícies com altos valores de rugosidade média podem interferir na formação do biofilme, no ano de 1997, Bolen et al.⁹ investigaram, por meio de uma revisão sistemática, a rugosidade média superficial de vários materiais utilizados na Odontologia. Para os autores, as análises realizadas indicaram haver um valor limítrofe de rugosidade média ($0,2 \mu\text{m}$) abaixo do qual, independentemente do tipo de material – esmalte, amálgama, resina composta, ouro, resina acrílica, ionômero de vidro, cerâmicas ou titânio, parece não haver redução na quantidade de biofilme aderido. Por outro lado, quando os valores de rugosidade média ultrapassam este valor, podem ser observados aumento na aderência microbiana e aumento no risco ao desenvolvimento de cáries, inflamações gengivais, periodontais ou peri-implantares. Tais achados indicam que independentemente do tipo de material e da modalidade de tratamento, deve-se obter e manter a superfície com a menor rugosidade possível.

Neste mesmo ano, Rimondini et al.⁶⁵ realizaram um estudo in vivo no qual analisaram a relação existente entre a colonização de micro-organismos e a rugosidade da superfície do titânio. Discos de titânio foram submetidos a procedimento de polimento de forma que três diferentes valores de rugosidade média fossem obtidos: grupo A = $0,088 \mu\text{m}$, grupo B = $0,201 \mu\text{m}$ e grupo C = $2,142 \mu\text{m}$. Um disco de cada grupo foi fixado em um dispositivo de acrílico posicionado na região mandibular posterior de 16 pacientes. O dispositivo foi mantido na cavidade bucal durante 24 horas,

período no qual os voluntários suspenderam qualquer tipo de procedimento relacionado à higiene bucal. Os discos foram avaliados em MEV. Uma menor quantidade de micro-organismos aderiu nos discos do grupo A. As amostras deste grupo apresentaram apenas cocos, diferentemente das amostras dos grupos B e C que possuíam cocos e bacilos, indicativos de um biofilme mais maduro. Assim sendo, os autores concluíram que a superfície com rugosidade média de 0,088 μm inibia fortemente o acúmulo e maturação do biofilme, sugerindo que uma superfície extremamente polida fosse utilizada em componentes protéticos e cicatrizadores.

Ao investigarem os fatores mais relacionados com a perda de implantes, O'Mahony et al.⁵⁵ (2000) relataram que quando o tratamento não é realizado em pacientes considerados de risco (fumantes e diabéticos), seu insucesso pode estar associado ao acúmulo de biofilme. Segundo os autores, análises em MEV de 40 implantes perdidos após quatro anos em função demonstraram que a presença de micro-fendas entre os componentes, a rugosidade média dos pilares e das próteses bem como a exposição das superfícies tratadas dos implantes favoreceram o acúmulo de biofilme, precipitando ou exacerbando os fatores diretamente relacionados à perda tardia do implante. Dessa forma, os autores recomendam que os implantes e seus componentes sejam planejados com o intuito de minimizar o acúmulo de biofilme e maximizar o acesso para uma correta higienização.

Parâmetros como rugosidade superficial e composição química são considerados fatores determinantes para a formação e aderência de biofilmes na superfície de

implantes. Por este motivo, Groessner-Schreiber et al.²⁷ (2001) avaliaram, *in vitro*, a adesão de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* em superfícies de titânio submetidas a dois tratamentos de superfície: deposição de nitreto de titânio (TiN) ou de nitreto de zircônio (ZrN). Amostras de titânio na forma de discos foram polidas metalograficamente e divididas em três grupos, (1) controle, (2) deposição de TiN e (3) deposição de ZrN. Os discos foram avaliados em MEV e em rugosímetro para determinação, respectivamente, da topografia de superfície e da rugosidade média. Para a avaliação da aderência de micro-organismos, as amostras foram incubadas em suspensões bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. Apesar da rugosidade média não apresentar diferenças significantes em função dos tratamentos experimentais realizados (1 = 0,14 µm; 2 = 0,19 µm; 3 = 0,20 µm), reduções significantes no número de micro-organismos aderidos foram observadas nas superfícies tratadas com TiN e ZrN quando comparadas com o Ti polido. Os autores concluíram que modificações físicas nas superfícies de implantes de titânio podem mascarar a alta reatividade da superfície deste metal, dificultando a adsorção de biomoléculas, reduzindo, por conseguinte, a aderência bacteriana.

Sabendo que a aderência de biofilme à superfície de implantes podem causar reações inflamatórias, muitas vezes levando a perda tardia do implante, Groessner-Schreiber et al.²⁶, em 2004, avaliaram a influência da deposição de nitreto de titânio (TiN) ou de nitreto de zircônio (ZrN) sobre a aderência de biofilmes. Amostras de vidro com a deposição de Ti, TiN ou ZrN foram fixadas em um

dispositivo de acrílico posicionado na cavidade bucal de dois pacientes. Este dispositivo foi removido após 60 horas para análise do biofilme por meio da quantificação (plaqueamento e contagem de UFC/mL), identificação e determinação da atividade celular dos micro-organismos (técnica de reação em cadeia pela polimerase – PCR). A maior aderência de micro-organismos ocorreu nas superfícies recobertas por Ti, as quais apresentaram a maior atividade celular. Independentemente do tipo de tratamento, os micro-organismos do gênero *Streptococcus* representaram as espécies mais abundantes nos biofilmes formados, o que, segundo os autores demonstrou serem estes micro-organismos os colonizadores primários das superfícies.

Dentes, próteses e implantes podem prover nichos que protegem os micro-organismos das forças de remoção, possibilitando a formação de biofilmes. Considerando que o acúmulo ou o metabolismo descontrolado das bactérias nestas superfícies poderão causar cáries, gengivites, periodontites, peri-implantites e estomatites, Teughels et al.⁸⁰ (2006) realizaram uma revisão sistemática com o intuito de identificar o impacto da energia livre de superfície, da rugosidade e da composição química na formação do biofilme sobre as superfícies de titânio. Segundo a literatura revisada, os autores verificaram que aumentos nos valores de rugosidade média acima de 0,2 μm , e/ou aumento nos valores da energia de superfície facilitam a formação do biofilme, havendo, porém, maior influência da primeira variável.

Chin et al.¹⁶ (2007) avaliaram as propriedades físico-químicas e a formação do biofilme em

micro-implantes a base de titânio de cinco diferentes marcas comerciais. Inicialmente, os micro-implantes foram analisados em (I) espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) para quantificação dos elementos presentes na superfície, (II) em MFA para mensuração da rugosidade média e (III) em MEV para caracterização da superfície. A seguir, as amostras foram esterilizadas em autoclave e imersas durante 20 horas em saliva recém-coletada. O biofilme formado sobre as superfícies foi desprendido e quantificado. Todas as superfícies apresentaram altos índices de contaminação por carbono. De acordo com a marca comercial, a rugosidade média variou entre 230 nm e 69 nm, e as superfícies apresentaram desde ranhuras atribuídas ao processo de manufatura até a presença de defeitos estruturais na forma de poros e pites. A comparação entre os diferentes sistemas de implantes usando a análise de regressão linear múltipla destacou que a rugosidade da superfície do implante interferiu na formação do biofilme, sendo estes dois fatores diretamente proporcionais.

Fernandes-Fillho²³ (2008) avaliou os efeitos da imersão do titânio em fluoretos sobre a aderência de *S. mutans*. Amostras de titânio na forma de discos foram imersos em soluções fluoretadas (1.500 ppm F⁻, pH = 5,3) durante períodos que simularam 5, 10, 15 e 20 anos de exposição aos fluoretos. As amostras tiveram sua topografia superficial e rugosidade média mensuradas em MFA antes e após a realização dos tratamentos experimentais. Adicionalmente, após a imersão em fluoretos, as superfícies foram avaliadas em MEV equipado com analisador de energia dispersiva de raios-x. Para avaliação da aderência, após os testes de

imersão, os discos foram incubados em suspensões de *Streptococcus mutans* durante 24 horas para posterior determinação do número de colônias aderido à superfície. Segundo o autor, as alterações na rugosidade de superfície do titânio ocorreram partir do quinto ano, havendo aumento do número de *Streptococcus mutans* aderidos à superfície a partir de 10 anos de exposição titânio aos fluoretos.

A influência das características da superfície – composição química, energia livre de superfície, rugosidade média- sobre a formação de biofilme em implantes odontológicos foi o tema de uma revisão realizada por Subramani et al.⁷⁹ no ano de 2009. De acordo com o levantamento realizado, os estudos apontaram não haver nenhuma diferença entre as superfícies de titânio e de esmalte dental quando a sequência para a colonização e a formação do biofilme foi avaliada. A literatura enfatiza haver um predomínio das espécies *Streptococcus* e *Actinomyces* como colonizadores primários da superfície. Maiores quantidades de biofilme aderido são encontradas em superfícies rugosas e com maior energia de superfície. Segundo os autores, a formação e acúmulo de placa podem ocorrer nas interfaces implante/pilar, pilar/prótese e implante/prótese, podendo ser facilitada pela presença de fendas entre os componentes, por um aumento de rugosidade e também em virtude da exposição de superfícies tratadas.

Bürgers et al.¹³ (2010) avaliaram a formação de biofilme, in vitro e in vivo, nas superfícies de titânio, correlacionando-a com as propriedades de superfície deste metal. Amostras de Ti cp na forma de discos foram obtidas e utilizadas em duas condições: (1) após a usinagem ou (2)

após usinagem seguida de jateamento e condicionamento ácido. Nas análises *in vitro*, os discos foram incubados em soluções contendo *Streptococcus sanguinis*. Nas análises *in vivo*, as amostras foram fixadas em dispositivos de acrílicos instalados na região posterior da maxila de seis pacientes, sendo removidas após 12 horas para a coleta do biofilme formado. Os discos de titânio utilizados tiveram a rugosidade média mensurada em rugosímetro e a energia livre de superfície determinada em goniômetro. A quantificação dos micro-organismos aderidos foi efetuada por meio de técnicas de fluorescência. As amostras do grupo 1 apresentaram maior rugosidade média e menor energia de superfície. Tanto no estudo *in vitro* como no estudo *in vivo*, uma maior quantidade de micro-organismo aderiu às superfícies do grupo 1. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a aderência de micro-organismos é primariamente influenciada pela rugosidade média, o que infere na necessidade de um ótimo polimento das superfícies de titânio expostas na cavidade bucal.

Heuer et al.²⁹, em 2010, estudaram, *in vivo*, a diversidade da microbiota supra e subgengival em implantes recém-colonizados. Para tanto, dez cicatrizadores colocados sobre os implantes de dez pacientes foram utilizados. Duas semanas após a colocação destes dispositivos, amostras do biofilme do fluido crevicular e da saliva peri-implantar foram coletados com o auxílio de cones de papel absorvente e rolos de algodão. O material coletado foi avaliado por meio do sequenciamento do DNA. Entre os mais de 31 gêneros de micro-organismos identificados, verificou-se predomínio do *Streptococcus*, independentemente da coleta sub ou

supragengival, o que, segundo os autores, demonstrou a caracterização de colonização primária.

Considerando que tratamentos de superfície podem alterar as propriedades do titânio possibilitando redução na aderência de micro-organismos, Scarano et al.⁷¹ (2010) investigaram, in vivo, o efeito da deposição de TiO₂ em forma de anatase sobre a aderência microbológica. Vinte cicatrizadores de Ti cp foram colocados em dez pacientes voluntários. Dez destes foram utilizados conforme recebidos do fabricante, sendo os demais preparados com a deposição de TiO₂ na forma de anatase. Após sete dias de uso, os cicatrizadores foram removidos e analisados em MEV para determinação da porcentagem da superfície recoberta por micro-organismos. Independentemente do tipo de superfície, os autores verificaram a presença de poucos micro-organismos na forma de cocos, havendo predomínio de bacilos. As superfícies recobertas por TiO₂ apresentaram menor quantidade de bactérias aderidas, sendo consideradas um tipo de tratamento adequado para reduzir a colonização microbiana.

A adesão e a colonização microbiana em superfícies sólidas desempenham um papel fundamental na formação de biofilmes. Estes dois fenômenos podem variar em função dos diferentes tipos de superfícies encontrados na cavidade bucal. Por estes motivos, Shemesh et al.⁷² (2010) investigaram as modificações moleculares que ocorrem durante a formação de um biofilme de *Streptococcus mutans* em diferentes superfícies. Amostras na forma de discos foram confeccionadas em resina composta (Filtek Z250), em liga Ti-6Al-4V e hidroxiapatita. As amostras foram posicionadas em

placa de poços e contaminadas com cepas padrão de *Streptococcus mutans*. Após a formação do biofilme, a viabilidade celular e a espessura do biofilme foram analisadas em microscópio confocal. Técnicas de biologia molecular (microarranjo do DNA e reação em cadeia pela polimerase - PCR) permitiram sequenciar a expressão genética em função das diferentes superfícies. Biofilmes mais espessos foram formados sobre a superfície de hidroxiapatita. O *Streptococcus mutans* apresentou a habilidade em expressar diferentes genes em função do substrato sobre o qual aderiram, refletindo a capacidade deste micro-organismo em se adaptar a diferentes superfícies.

Neste mesmo ano, Truong et al.⁸⁴ compararam a aderência bacteriana sobre superfícies de titânio convencionais ou submetidas ao refinamento nanoscópico de grãos. A composição química, a energia livre de superfície, a topografia superficial e a rugosidade das superfícies foram analisadas, respectivamente, por meio de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), goniômetro, e MFA. Para avaliação da aderência de micro-organismos, as amostras foram incubadas em suspensões de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar das superfícies avaliadas não apresentarem diferenças na composição química, as superfícies tratadas com o refinamento de grãos apresentaram menor rugosidade superficial e maior energia livre de superfície. Devido a este último achado, ocorreu a formação de um biofilme mais espesso sobre as superfícies tratadas o que segundo os autores, pode comprometer o sucesso clínico deste tipo de tratamento superficial.

Barros, Gouvêa⁵ (2011) investigaram os efeitos da imersão em solução fluoretada (1.500 ppm) e da profilaxia com jato de bicarbonato de sódio sobre a aderência de *Streptococcus mutans* em discos de Ti-6Al-4V e de Ti cp. As amostras foram usinadas e polidas metalograficamente, sendo submetidas a quatro tipos de tratamento: (A) imersão em saliva artificial (pH = 7,0); (B) imersão em saliva fluoretada (1500 ppm F⁻; pH = 5,5); (C) jateamento profilático com bicarbonato de cálcio; (D) jateamento profilático com bicarbonato de cálcio seguido da imersão em saliva fluoretada (1500 ppm F⁻; pH = 5,5). O período de imersão simulou cinco anos de exposição aos meios utilizados. Antes e após a realização dos tratamentos experimentais, as superfícies foram analisadas em rugosímetro para a mensuração da rugosidade média. Para avaliação da aderência, as amostras foram incubadas durante 24h em suspensões de *Streptococcus mutans*, sendo posteriormente determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos micro-organismos aderidos à superfície. Segundo os autores, nenhum dos tratamentos causou aumento nos valores de rugosidade média, havendo diferenças no número de UFC/mL apenas quando os valores de rugosidade iniciais foram superiores a 0,2 µm.

3 Proposição

O objetivo deste estudo in vitro foi avaliar a topografia de superfície e a aderência de *Streptococcus mutans* no Ti cp e na liga Ti-6Al-4V simulando 10 anos de uso de dentifrícios fluoretado e não-fluoretado, considerando os seguintes aspectos:

- 1) a ação exclusivamente química (imersão) dos componentes e dos íons fluoretos presentes nos dentifrícios;
- 2) a ação exclusivamente mecânica (escovação) das cerdas das escovas dentais
- 3) a ação exclusivamente mecânica (escovação) das cerdas das escovas dentais + abrasivos presente no dentifrício
- 4) a ação combinada das cerdas das escovas, dos abrasivos e dos íons fluoretos.

4 Material e Método

Para a realização do presente estudo, os seguintes materiais, instrumentos e aparelhos foram utilizados:

4.1 Materiais

1. Acetato de sódio PA, produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
2. Agar bacteriológico, produzido por Difco, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos
3. Água destilada
4. Alças plásticas, descartáveis e estéreis para inoculação de micro-organismos, fabricados por Plast-Bio, Ribeirão Preto, SP, Brasil
5. Álcool etílico absoluto, produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
6. Álcool isopropílico produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
7. Bacitracina, produzida pela Merck®, Jacarepaguá, RJ, Brasil
8. Bacto-casitone, produzido por Difco, Franklin Lakes, Nova Jersey, Estados Unidos
9. Cloreto de sódio (PA), produzido por CAQ - Casa da

química Ind. E Com. Ltda, Diadema, SP, Brasil

10. Cultura de *Streptococcus mutans*, proveniente da empresa National Collection of Type cultures (NTCC number 1023), Salisbury, Wiltshire, Inglaterra

11. Dentifrício fluoretado manipulado, produzido por Gama & Vicentin Ltda, Araraquara, SP, Brasil

Composição^{92, 93}: Carbonato de cálcio – 52,5%

Glicerina – 25%

Natrosol gel – 18%

Lauril sulfato de sódio – 2%

Fluoreto de sódio - 1500 ppm F⁻

Água destilada – qsp

12. Dentifrício não-fluoretado manipulado, produzido por Gama & Vicentin Ltda, Araraquara, SP, Brasil

Composição^{92, 93}: Carbonato de cálcio – 52,5%

Glicerina – 25%

Natrosol gel – 18%

Lauril sulfato de sódio – 2%

Água destilada – qsp

13. Escovas dentais com cerdas macias, Oral B®, #35, fabricadas pela empresa Gillete do Brasil, São Paulo, SP, Brasil

14. Esmalte de unha vermelho ácido resistente da marca Coloroma (L'Oreal do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

15. Extrato de levedura produzido por Acumedia

- Manufacturers Inc, Baltimore, Maryland, Estados Unidos
16. Fita adesiva de alumínio Scotch®, modelo 3311, fabricada pela 3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil
 17. Fosfato de sódio Dibásico 12-hidratado, produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
 18. Fosfato de sódio Monobásico 1-hidratado, produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
 19. Glutaraldeído 25%, produzido por J.T. Baker, Xalostoc, Tlaxco, México
 20. Infusão de cérebro e coração (BHI), produzida por Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, Estados Unidos
 21. L-cistina, produzida por InLab, Diadema, SP, Brasil
 22. Liga Ti-6Al-4V, proveniente da empresa Realum Ind. Com. de Metais Puros e Ligas Ltda, São Paulo, SP, Brasil
Composição: Ti - 89,78%; Al - 6,06%; V - 4,0%; O - 0,10%; Fe - 0,04%; C - 0,007%; N - 0,004%; H - 0,003%
 23. Lixas de carboneto de silício de granulações # 320, 400, 600, 1200, 1500 e 2000, fabricadas pela Norton Abrasivos Brasil, São Paulo, SP, Brasil
 24. Microtubos do tipo Eppendorf® de 1,5 mL, fabricados pela Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil
 25. Mini-swabs estéreis fabricados por Cremer, São Paulo, SP, Brasil
 26. Pano de polimento Microcloth® da marca Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos

27. Placa de cultura de células, estéril, 24 poços, marca TPP, fabricada pela Techo Plastic Products AG, Trasadingen, Unterklettgau Suíça
28. Placas de petri estéreis descartáveis 90 X 15 mm, fabricadas por J Prolab Ind. e Com. de Produtos para Laboratório Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brasil
29. Pontas descartáveis para micropipeta Satelit®, fabricadas pela Hexis Científica S/A, Jundiaí, SP, Brasil
30. Sacarose
31. Suspensão de alumina Alfapolish® 0,05 µm fabricada pela empresa Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos
32. Suspensões de diamante Metadi® Supreme de 3 µm, 1 µm e 0,25 µm, fabricados pela empresa Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos
33. Suspensão de sílica coloidal Mastermet® 0,06 µm fabricada pela empresa Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos
34. Titânio comercialmente puro Grau 2, proveniente da empresa Realum Ind. Com. de Metais Puros e Ligas Ltda, São Paulo, SP, Brasil
Composição: Ti -99,76%; O – 0,16%; Fe -0,06%; C – 0,01%; N – 0,001%; H -0,002%

4.2 Instrumentos

1. Bico de Bunsen
2. Béquer graduado Satelit®, fabricadas pela Hexis

Científica S/A, Jundiaí, SP, Brasil

3. Erlenmeyer graduado, fabricado por Vidrolabor Indústria e Comércio de Vidros para Laboratórios, Poá, SP, Brasil
4. Matriz circular metálica de aço inoxidável com orifício de 6 mm de diâmetro e 3 mm de altura
5. Micropipeta de 05-50 μ L, fabricada por Boeco, Bockel, Hamburg, Alemanha
6. Micropipeta de 100-1000 μ L, fabricada por Boeco, Bockel, Hamburg, Alemanha
7. Micropipeta de 20-200 μ L, fabricada por Boeco, Bockel, Hamburg, Alemanha
8. Paquímetro digital modelo 500-144B, fabricado por Mitutoyo Sul America Ltda, Suzano, SP, Brasil
9. Tubos de ensaio 20 X 150 mm com tampa, marca Satelit®, fabricadas pela Hexis Científica S/A, Jundiaí, SP, Brasil

4.3 Aparelhos

1. Agitador de tubos, fabricado por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil
Modelo: A 162. Série: 8187148
2. Aparelho de ultrassom modelo Thornton, fabricado pela empresa Inpec Eletronics, Vinhedo, SP, Brasil
3. Autoclave vertical, fabricada por Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil

Modelo: AV 60. N°. 6614

4. Balança de precisão, fabricada por Gehaka Ind. e Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, SP, Brasil

Modelo: BG 400. N°. 016450

5. Espectrofotômetro, modelo SP-220, fabricado por Bioespectro, Curitiba, PR, Brasil

6. Estufa bacteriológica, produzida por Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil

Modelo: MA 0324. Série: 9819011

7. Incubadora de bancada com *shacker* modelo Q816M20, fabricada por Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil

8. Jarra de microaerofilia, modelo JA 0400, fabricada por Permution, Curitiba, PR, Brasil

9. Máquina de escovação linear, confeccionada por Mavtec Comércio de Peças, Acessórios e Serviços Ltda. ME, Ribeirão Preto, SP, Brasil

10. Microscópio de força atômica, modelo Nanoscope III ATM, fabricado pela empresa Digital Instruments, Santa Barbara, Califórnia, Estados Unidos

11. Microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 400 FEG ESEM fabricado por FEI Company, Hillsboro, Estados Unidos, equipado com analisador de energia dispersiva de raios-x (EDX) modelo INCA 250, fabricado por Oxford Instruments, Concorde, New Hampshire, Estados Unidos

12. Politriz modelo Aropol 2V, fabricado por Arotec, Cotia, SP, Brasil

4.4 Métodos

4.4.1 Obtenção dos corpos-de-prova

Foram obtidos, por meio do corte de barras de estoque em torno mecânico convencional, 36 corpos-de-prova de Ti cp (Grupo T) e 36 corpos-de-prova de liga Ti-6Al-4V (Grupo L) na forma de discos com dimensões de 4 mm de espessura e 6 mm de diâmetro.

4.4.2 Preparação dos corpos-de-prova

Após o corte das barras, os corpos-de-prova foram encaixados na matriz metálica (Figura 1) e submetidos a procedimentos de acabamento e polimento^{30, 31}. A fim de evitar a formação de facetas na superfície dos corpos-de-prova, fitas adesivas de alumínio foram colocadas sobre a matriz em um número de camadas suficiente para manter a superfície do corpo-de-prova e a matriz em um único plano (Figura 2).

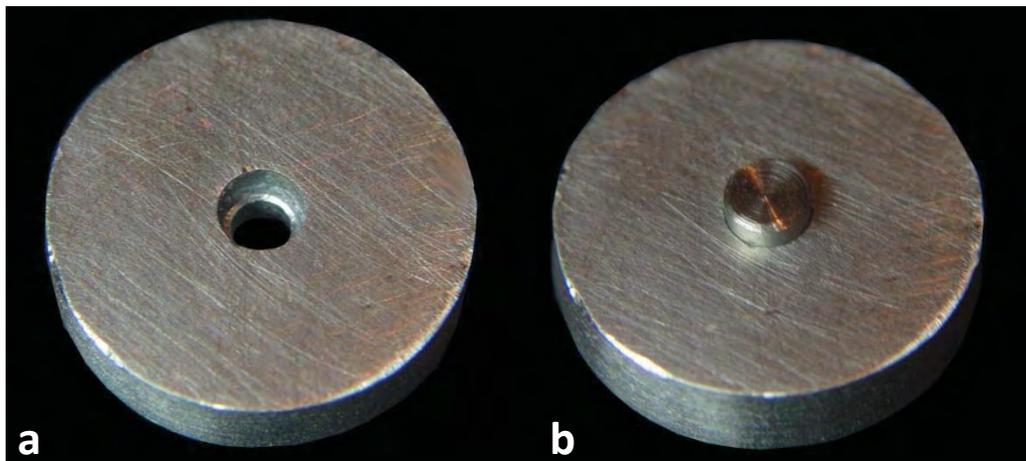


FIGURA 1 – (a) Matriz circular com orifício interno para colocação dos corpos-de-prova; (b) corpo-de-prova posicionado na matriz.

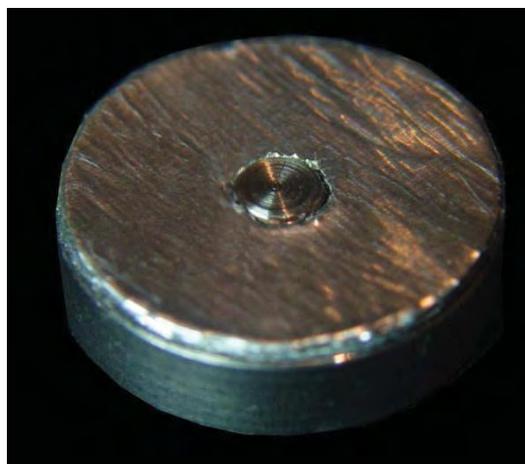


FIGURA 2– Diferença de planos corrigida por meio do uso de fita adesiva de alumínio.

A seguir, a matriz foi adaptada a um dispositivo de polimento na politriz. Os corpos-de-prova foram lixados progressivamente com lixas de carboneto de silício granulações 320, 400, 600 (30 segundos cada), 800, 1200, 1500 e 2000 (40 segundos cada) na presença de água, com velocidade de 600 rpm e força controlada de 0,5 kgf.

Para a realização de um polimento final, os foram utilizados panos especiais Microcloth®, sequencialmente, com as suspensões de diamante de 3 μm , 1 μm e 0,25 μm , de sílica coloidal 0,06 μm e de alumina 0,05 μm .

Após a obtenção de uma superfície espelhada, os corpos-de-prova foram lavados em água destilada e submetidos à limpeza com álcool isopropílico em aparelho de ultrassom durante 3 ciclos com 30 minutos cada. Após a limpeza, os corpos-de-prova tiveram sua espessura mensurada com paquímetro digital aceitando-se uma variação de $\pm 0,02$ mm.

Os corpos-de-prova foram divididos aleatoriamente, em seis subgrupos experimentais (Tabela 1) e submetidos aos seus respectivos tratamentos.

Tabela 1 – Subgrupos experimentais de acordo com os tratamentos e soluções

| Tratamentos | Soluções | Subgrupos experimentais |
|-------------|---|-------------------------|
| Imersão | 1,5 mL de água destilada | IA |
| | 1,0 mL de água destilada + 0,5 g de dentifrício não-fluoretado* | ID |
| | 1,0 mL de água destilada + 0,5 g de dentifrício fluoretado* | IDF |
| Escovação | 400 mL de água destilada | EA |
| | 268 mL de água destilada + 134 g de dentifrício não-fluoretado* | ED |
| | 268 mL de água destilada + 134 g de dentifrício fluoretado* | EDF |

* quantidades suficientes para que os corpos-de-prova ficassem totalmente submersos nas soluções, mantendo-se a proporção de 2 partes de água, em mililitros, para 1 parte de dentifrício, em gramas^{30,31}

4.4.3 Imersão

Nos subgrupos IA, ID e IDF, os corpos-de-prova foram dispostos, individualmente, em microtubos tipo eppendorfs, permanecendo estaticamente submersos em suas respectivas soluções durante 244 horas. Este período equivaleu a 10 anos de uso do dentifrício, ao se considerar como padrão a realização de duas escovações diárias com 2 minutos de duração cada^{30, 31}. As soluções foram trocadas a cada 6 horas.

4.4.3 Escovação

A máquina de escovação utilizada é constituída por duas partes, uma fixa, composta por um recipiente de acrílico onde as amostras são posicionadas e outra móvel, onde são fixadas as cabeças das escovas e responsável pela escovação dos corpos-de-prova por meio de movimentação no plano horizontal (Figura 3).

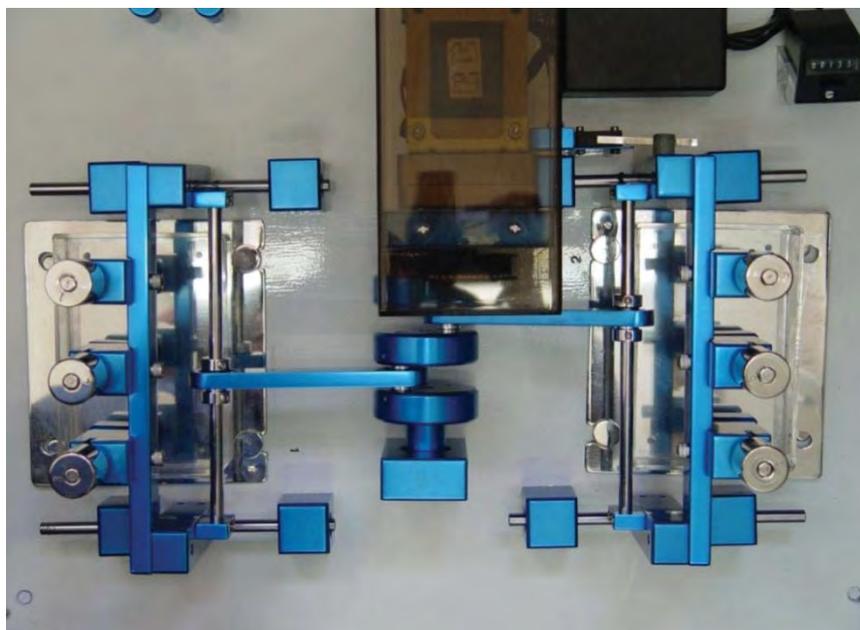


FIGURA 3 – Vista superior da máquina de escovação.

Os corpos-de-prova foram encaixados na parte inferior da máquina permanecendo imóveis durante a escovação. A seguir, as cabeças das escovas dentais foram seccionadas e fixadas nos dispositivos (Figura 4) presentes na parte superior da máquina sobre os quais estão presentes blocos metálicos que aplicam uma força constante de 200 gf²⁰ sobre as escovas (Figura 5).



FIGURA 4 – Escova com cabeça seccionada, posicionada em dispositivo da máquina de escovação.

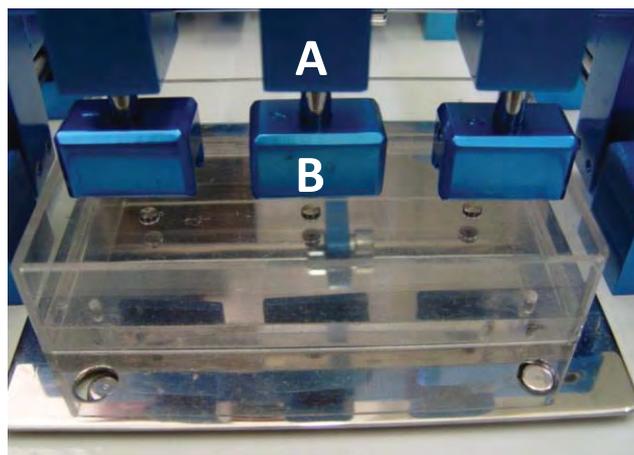


FIGURA 5 – Máquina de escovação. A – Bloco metálico responsável pela aplicação de força sobre os corpos-de-prova durante a escovação; B – Dispositivo para fixação da escova.

De acordo com os subgrupos experimentais, o recipiente de acrílico foi preenchido, de modo manter os corpos-de-prova submersos, mantendo a mesma proporção (2 partes de água, em mililitros, para 1 parte de dentifrício, em gramas) utilizada nos testes de imersão^{30, 31}. Na sequência, a

máquina foi programada e acionada para a realização de 60 ciclos por minuto. Durante o funcionamento da máquina, a parte superior realizou movimentos horizontais^{30, 31}.

Utilizando o mesmo período da imersão (244 horas), os corpos-de-prova foram submetidos a 878.400 ciclos de escovação (60 ciclos por minuto). As escovas e as soluções eram trocadas após cada 22.080 ciclos, o que correspondia a três meses de uso da escova.

Após a imersão ou escovação, os corpos-de-prova foram lavados em água destilada e submetidos à limpeza com álcool isopropílico em banho ultrassônico durante 30 minutos.

4.4.4 Análise da topografia superficial

Para a comparação dos efeitos causados pelos diferentes tratamentos experimentais, os corpos-de-prova de Ti cp e de Ti-6Al-4V tiveram a topografia superficial avaliada quantitativamente por meio da mensuração dos valores de rugosidade média (Ra) e, qualitativamente, por meio da obtenção de imagens tri-dimensionais (3D).

Para tanto, três superfícies (50 x 50 μm^2) de cada corpo-de-prova foram analisadas em microscópio de força atômica (MFA, modo Contato)³⁴, antes (pré-tratamento) e após (pós-tratamento) a execução dos tratamentos experimentais. O microscópio de força atômica pertence à família dos microscópios de escaneamento e permite reconstruir, em tempo real, as superfícies de corpos-de-prova em três dimensões (imagens 3D) para posterior mensuração da rugosidade de superfície⁸⁶.

Os valores de rugosidade média foram mensurados no programa Gwyddion 2.5 (Praga, República Tcheca), no qual as imagens topográficas da superfície 3D em escala Z foram normalizadas.

4.4.5 Análise de elementos – energia dispersiva de raios-X (EDX)

Para identificação de possíveis depósitos de íons fluoretos provenientes dos dentifrícios, após a exposição aos tratamentos experimentais, corpos-de-prova dos subgrupos IDF e EDF tiveram sua composição química quantificada em microscópio eletrônico de varredura equipado com analisador de energia dispersiva de raios-X. Todas as análises foram conduzidas a 20 kV, 137 eV e 90 μ A. Os corpos-de-prova foram posicionados no interior do microscópio e examinados sem qualquer tipo de recobrimento.

4.4.6 Avaliação da aderência bacteriana

Após a análise da topografia superficial e quantificação dos elementos químicos, foi realizada a contaminação dos corpos-de-prova com suspensões de *Streptococcus mutans* para a avaliação da aderência bacteriana.

Previamente à contaminação, as superfícies não avaliadas em MFA foram isoladas com esmalte vermelho (Figura 6). Na sequência, os corpos-de-prova foram acondicionados em microtubos eppendorf e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos^{5, 75}.



FIGURA 6 – Corpo-de-prova com as superfícies isoladas.

- Preparação do material microbiológico

A reativação e incubação do *Streptococcus mutans* foi realizada utilizando-se o meio de cultura BHI. Segundo as recomendações do fabricante, 37 g de pó do meio de cultura foram adicionados em um béquer contendo 1.000 mL de água destilada. Após dissolução completa do meio, alíquotas de 5 mL do meio de cultura preparado foram dispensadas em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram fechados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos de ensaio foram armazenados em geladeira a 5 °C até a utilização.

Para as diluições seriadas, foram preparados tubos de ensaio contendo 900 µL de solução salina. Esta solução foi preparada por meio da dissolução de 8,5 g de cloreto de sódio em 1.000 mL de água destilada; 900 µL foram pipetados e distribuídos em tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram esterilizados em autoclave (121°C; 20 minutos). Após resfriamento a temperatura ambiente e até o

momento da utilização, os tubos de ensaio foram armazenados em geladeira a 5 °C.

Para o preparo do meio de cultura SB-20 utilizado na semeadura das placas de Petri, foram proporcionados 15 g de Bacto casitone; 5 g de extrato de levedura; 0,2g de L-cistina; 0,1g de sulfito de sódio; 20 g de acetato de sódio; 200g de sacarose e 15 g de ágar bacteriológico⁶⁸. Estes componentes foram dissolvidos em um béquer contendo 1.000 mL de água destilada. O conteúdo do béquer foi esterilizado em autoclave (121 °C; 20 minutos), e após o resfriamento a aproximadamente 50°C, 5,0 mL de solução de bacitracina (20,0 µg/mL) foram adicionados ao meio. Ainda na fase líquida, o meio foi dispensado em placas de Petri estéreis, que após solidificação do meio de cultura, foram armazenadas em geladeira a 5 °C até o momento da semeadura.

- Contaminação dos corpos-de-prova

A cepa padrão de *Streptococcus mutans* (NTCC 1023) foi descongelada e 500 µL da suspensão de micro-organismos foram inoculados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de BHI. Para a reativação, o tubo de ensaio foi mantido em jarra de microaerofilia a 37°C⁴ por 24 horas. A seguir, o tubo de ensaio foi colocado em agitador de tubos durante 30 segundos. Após a verificação do turvamento do meio, que identifica o crescimento dos micro-organismos, três alçadas da suspensão foram semeadas em placa de Petri com meio de cultura SB-20⁶⁸ e levados à estufa bacteriológica a 37 °C em jarra de microaerofilia^{4, 19} por 48 horas^{77, 94}.

Concretizado o período de crescimento, a morfologia das colônias foi avaliada para confirmação da

espécie de micro-organismos. Verificada a viabilidade da cepa, a inoculação 500 µL da suspensão de micro-organismos em 5 mL de BHI foi repetida, mantendo-se as mesmas condições e tempo de crescimento para posterior contaminação das amostras.

Para padronização da contaminação, a concentração do inócuo foi determinada em espectrofotômetro, utilizando-se densidade óptica de 600 nm, 40 µL de BHI como *blank* e o valor de 0,082 de absorbância como sendo a concentração equivalente a 10^7 UFC/mL de *Streptococcus mutans*.

Para a contaminação, os discos foram colocados, individualmente, em placa de poços com 2 mL de BHI. A seguir, 100 µl de inócuo com concentração correspondente a 10^7 UFC/mL de *Streptococcus mutans* foram pipetados sobre as superfícies das amostras. As placas de poços foram posicionadas em jarra de microaerofilia^{4, 19} e mantidas durante 1,5 h em incubadora com shaker a 37°C^{17, 23} e com agitação de 75 rpm.

Para a remoção dos micro-organismos não aderidos, após o período de 1,5 h, os corpos-de-prova foram assepticamente transferidos para novos poços e lavados duas vezes em 0,6 mL de solução salina⁷⁷ (Figura 7). As superfícies impermeabilizadas com esmalte de unha foram cuidadosamente limpas com mini-swabs estéreis (Figura 8), sendo os corpos-de-prova acondicionados em novos poços com 2 mL de BHI. As placas de poços foram posicionadas em jarra de microaerofilia e mantidas em incubadora com shaker a 37°C^{17, 23} e com agitação de 75 rpm durante 24 horas.



FIGURA 7 – Corpo-de-prova sendo lavado com 0,6 mL de solução salina por meio do gotejamento com o auxílio de micropipeta.



FIGURA 8 – Limpeza das superfícies impermeabilizadas com esmalte de unha com auxílio de mini-swab estéril.

Após as 24 horas de incubação, os corpos-de-prova foram assepticamente transferidos para novos poços e lavados duas vezes em 0,6 mL de solução salina para remoção de micro-organismos não aderidos⁶⁸. Os corpos-de-prova foram assepticamente transferidos para novos poços

contendo 2 mL de solução salina. Para o desprendimento dos micro-organismos aderidos, a placa de poços foi mantida em ultrassom^{8, 17} durante 20 minutos.

Após esse procedimento 100 μ L do conteúdo do poço com os micro-organismos desprendidos foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 900 μ L de solução salina. Este tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos por 1 minuto. Uma alíquota de 100 μ L foi removida deste tubo e transferida para um novo tubo de ensaio. Tais procedimentos foram realizados mais três vezes, obtendo-se diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} .

Após as diluições seriadas, uma alíquota 25 μ L foi removida de cada tubo de ensaio (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) e semeada em um dos quadrantes de uma placa de Petri com meio SB-20⁶⁸ (Figura 9). A solução foi espalhada com alça Drigalsky estéril em cada quadrante. Todo o procedimento de semeadura foi realizado em triplicata. As placas de Petri foram colocadas em jarra de microaerofilia e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C ^{4, 19} por 48 horas^{77, 94}.

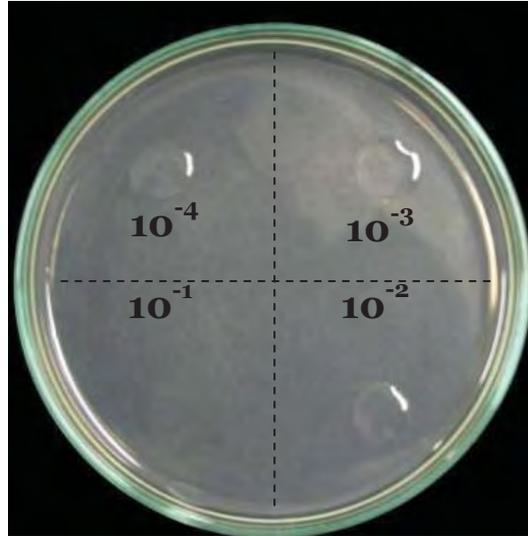


FIGURA 9 – Placa de Petri com meio SB-20 submetida a sementeira. Alíquota 25 μL já pipetada sobre os quadrantes correspondentes às diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}

- Contagem de micro-organismos

Após 48 horas de incubação para crescimento (Figura 10) realizou-se a contagem das colônias para determinação do número de micro-organismos viáveis (unidades formadoras de colônias - UFC/mL). Para cada triplicata, a contagem de colônias foi realizada nos quadrantes com valores entre 30 e 300 colônias. O cálculo de UFC/mL foi feito com base na seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Sendo n equivalente ao número absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4), e q igual a quantidade pipetada em cada quadrante (25 μL = 0,025 mL). Os valores de UFC/mL obtidos foram transformados em logaritmo na base 10.

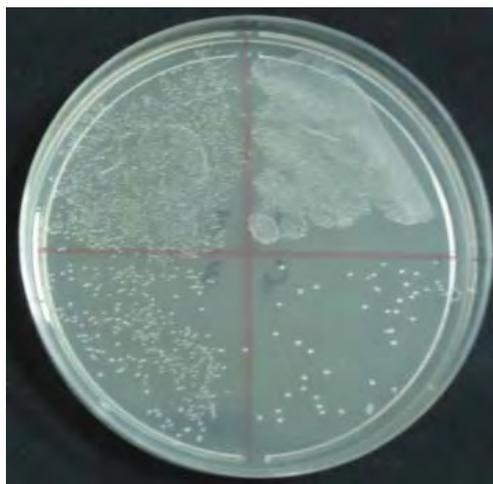


FIGURA 10 – Placa de Petri com as colônias de *Streptococcus mutans*, nas diluições de 10^{-1} a 10^{-4} após crescimento.

Avaliação da aderência em MEV

Para ilustrar a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície, um corpo-de-prova de cada grupo experimental foi autoclavado novamente e re-submetido aos experimentos para aderência do micro-organismo. Para obtenção de imagens em microscópio eletrônico de varredura, os micro-organismos aderidos foram mantidos e submetidos ao processo de fixação, mediante a imersão dos corpos-de-prova em glutaraldeído 2,5% durante 15 minutos^{17, 19, 66}, e ao processo de desidratação, no qual os corpos-de-prova permaneceram imersos em soluções de etanol nas

concentrações de 75, 80, 85, 95 e 100% (15 minutos cada)^{56, 59, 60}. Previamente a análise em MEV, as superfícies receberam deposição de ouro^{19, 63, 66}.

4.5 Planejamento estatístico

4.5.1 Topografia de superfície

As médias de Ra foram submetidas à análise estatística em três etapas, utilizando-se os testes estatísticos mais adequados em virtude do ajuste ou não à curva de distribuição normal.

Na primeira etapa da análise estatística, os valores iniciais (pré-tratamento) foram comparados entre os seis subgrupos experimentais com o intuito de comprovar a padronização de polimento. Em uma segunda etapa, foram realizadas comparações intra-subgrupos (pré-tratamento vs. pós-tratamento) para identificar quais tratamentos experimentais causaram alterações significantes na Ra. Na terceira etapa, os valores pós-tratamento foram comparados entre os seis subgrupos experimentais para identificar diferenças entre os efeitos causados por cada subgrupo.

Como os valores de Ra ajustaram-se a curva normal após transformação linear, a análise de variância a um fator (*one-way* ANOVA) foi aplicada para comparações entre subgrupos (primeira e terceira etapas) sendo complementada pelo teste de Tukey para identificação das diferenças. O teste pareado T-Student foi utilizado para identificar a influência dos tratamentos experimentais (comparações intra-subgrupos, segunda etapa).

Em todos os testes estatísticos adotou-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4.5.2 Aderência de *Streptococcus mutans*

Os valores de log(UFC/mL) se ajustaram a curva de distribuição normal e foram comparadas por meio da análise de variância a um fator (Anova *one-way*) para identificar diferenças entre os subgrupos experimentais. Foi utilizado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

5 Resultado

5.1 Liga Ti-6Al-4V – Grupo L

5.1.1 Topografia superficial

Os valores de rugosidade média (Ra) de cada corpo-de-prova de Ti-6Al-4V avaliado neste estudo encontra-se nas Tabelas A1 a A6 do Apêndice 1. As médias de Ra dos seis subgrupos avaliados são apresentadas na Tabela 2, juntamente com os resultados das etapas 1, 2 e 3 da análise estatística.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão da rugosidade média (Ra, em nanômetros) dos subgrupos de Ti-6Al-4V

| Subgrupos | Ra | |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| IA – água destilada | 1,79 ± 0,25 ^{Aa} | 2,01 ± 0,25 ^{Aa*} |
| ID – dentifrício não-fluoretado | 1,61 ± 0,13 ^{Aa} | 1,74 ± 0,19 ^{Aa†} |
| IDF - dentifrício fluoretado | 1,92 ± 0,39 ^{Aa} | 2,29 ± 0,51 ^{Aa‡} |
| EA – água destilada | 2,00 ± 0,71 ^{Aa} | 2,05 ± 0,43 ^{Aa§} |
| ED – dentifrício não-fluoretado | 2,37 ± 0,86 ^{Aa} | 11,17 ± 2,29 ^{Bb#} |
| EDF - dentifrício fluoretado | 1,83 ± 0,50 ^{Aa} | 15,73 ± 1,78 ^{Cb**} |

Análise estatística: Etapa 1 - Anova: comparações pré-tratamento: $F_{5,30}= 1,05$; $p = 0,40$;

Etapa 2 - Teste T-Student - letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas linhas:

- * Subgrupo IA – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,22$
- † Subgrupo ID – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,12$
- ‡ Subgrupo IDF – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,08$
- § Subgrupo EA – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,77$
- # Subgrupo ED – pré vs. pós-tratamento - $p < 0,01$
- ** Subgrupo EDF – pré vs. pós-tratamento - $p < 0,01$

Etapa 3 - Anova comparações pós-tratamento: $F_{5,30}= 186,26$; $p < 0,01$
 Teste de Tukey - letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas colunas

O resultado obtido pela análise de variância na primeira etapa indica não haver diferença entre os valores de Ra pré-tratamento ($p > 0,05$). Tal observação permite afirmar que os procedimentos de acabamento/polimento foram padronizados, havendo superfícies similares entre subgrupos experimentais antes da execução dos tratamentos.

As comparações pré vs. pós-tratamento (teste T-Student) das amostras de Ti-6Al-4 revelaram que os procedimentos de imersão (subgrupos IA, ID e IDF) não alteraram a rugosidade média dos corpos-de-prova. Entre os testes de escovação, a utilização de água destilada (subgrupo EA) não alterou os valores de rugosidade média. Entretanto, diferenças estatisticamente significantes entre os valores pré e pós-tratamento foram encontradas após a escovação com dentífrício não-fluoretado (subgrupo ED) e com dentífrício fluoretado (subgrupo EDF), demonstrando que as amostras destes subgrupos se tornaram mais rugosas após estes tratamentos.

Os resultados da análise de variância para a comparação pós-tratamento mostrou diferença estatisticamente significante entre os subgrupos experimentais ($p < 0,05$). O teste de Tukey indicou que a Ra não diferiu entre os subgrupos de imersão e escovação com água (IA, ID, IDF e EA) os quais apresentaram valores inferiores aos subgrupos submetidos à escovação com dentífrício fluoretado (subgrupo EDF) e não-fluoretado (subgrupo ED). O subgrupo escovado com dentífrício fluoretado (EDF) apresentou Ra maior em relação ao subgrupo escovado com dentífrício não-fluoretado (ED).

As imagens 3D obtidas em MFA corroboram os resultados quantitativos. As superfícies pré-tratamento (Figuras 11a, 11b, 11c, 12a, 12b, 12c) exibiram topografia homogênea, com algumas irregularidades provenientes do polimento. Nenhuma diferença pôde ser observada após as imersões (Figuras 11d, 11e e 11f) e após escovação com água (Figura 12d). A escovação com dentifrício (Figuras 12e e 12f) alterou a topografia da superfície, sendo observado modificações de maior magnitude após a escovação com dentifrício fluoretado (Figura 12f).

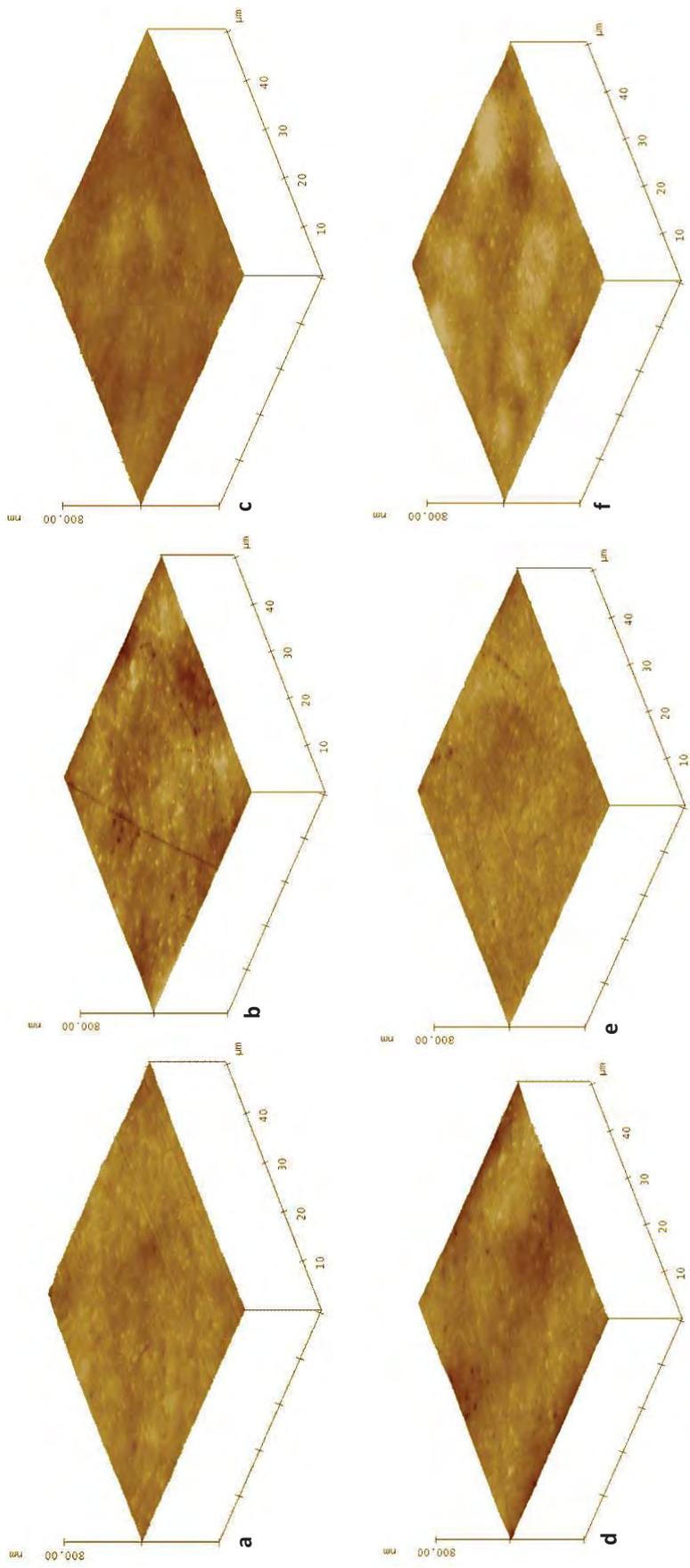


FIGURA 11 - Imagens em 3D dos subgrupos IA (a,d), ID (b,e) e IDF (c,f) obtidas em MFA antes (a, b, c) e após (d, e, f) a realização dos tratamentos experimentais. Regiões mais claras representam picos, enquanto aquelas mais escuras referem-se aos vales.

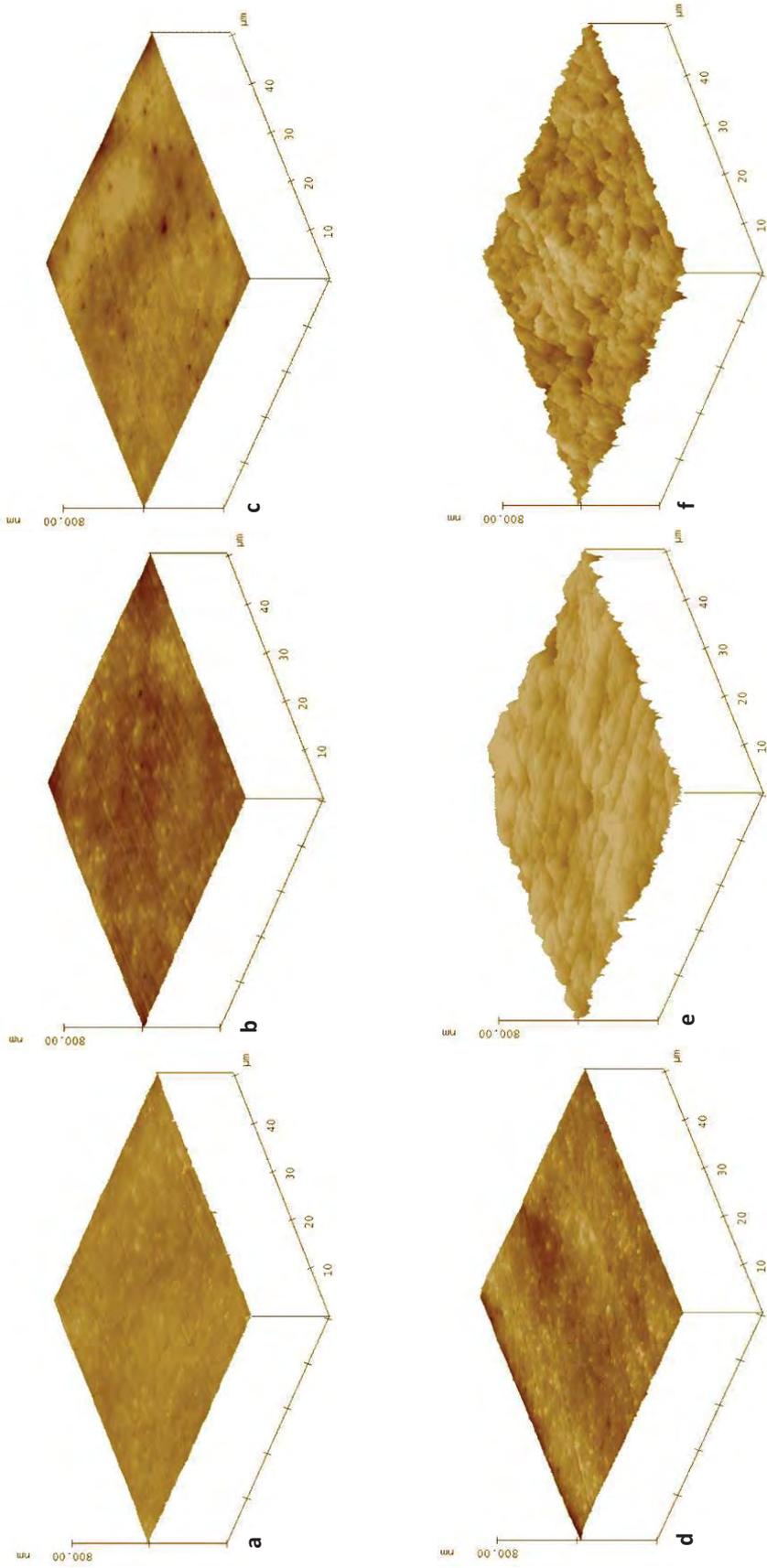


FIGURA 12 - Imagens em 3D dos subgrupos EA (a,d), ED (b,e) e EDF (c,f) obtidas em MFA antes (a, b, c) e após (d, e, f) a realização dos tratamentos experimentais. Regiões mais claras representam picos, enquanto aquelas mais escuras referem-se aos vales.

5.1.2 Avaliação dos elementos químicos (EDX)

Os Gráficos 1 e 2 apresentam a composição química semi-quantitativa dos elementos presentes nos corpos-de-prova dos subgrupos IDF e EDF após a execução da imersão ou escovação. Como pode ser observado, não foram detectados íons fluoreto ou sódio sobre a superfície dos discos avaliados.

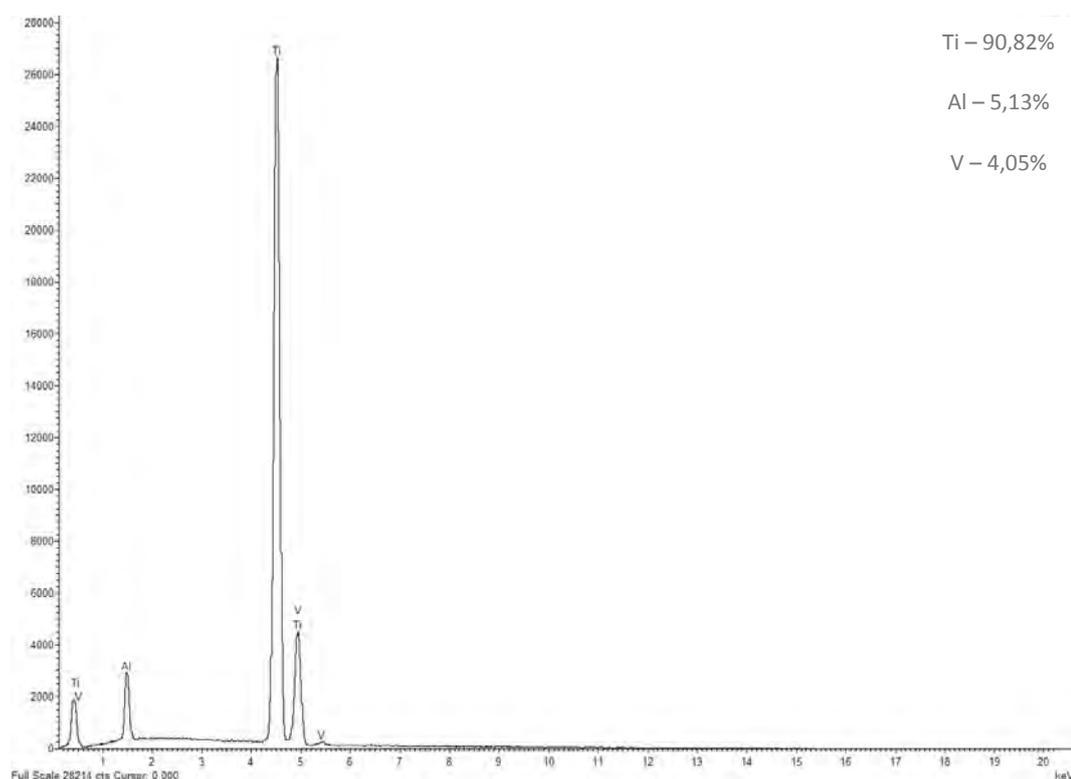


GRÁFICO 1 – Composição semi-quantitativa de um corpo-de-prova de Ti-6Al-4V após imersão em água destilada + dentifrício fluoretado (subgrupo IDF).

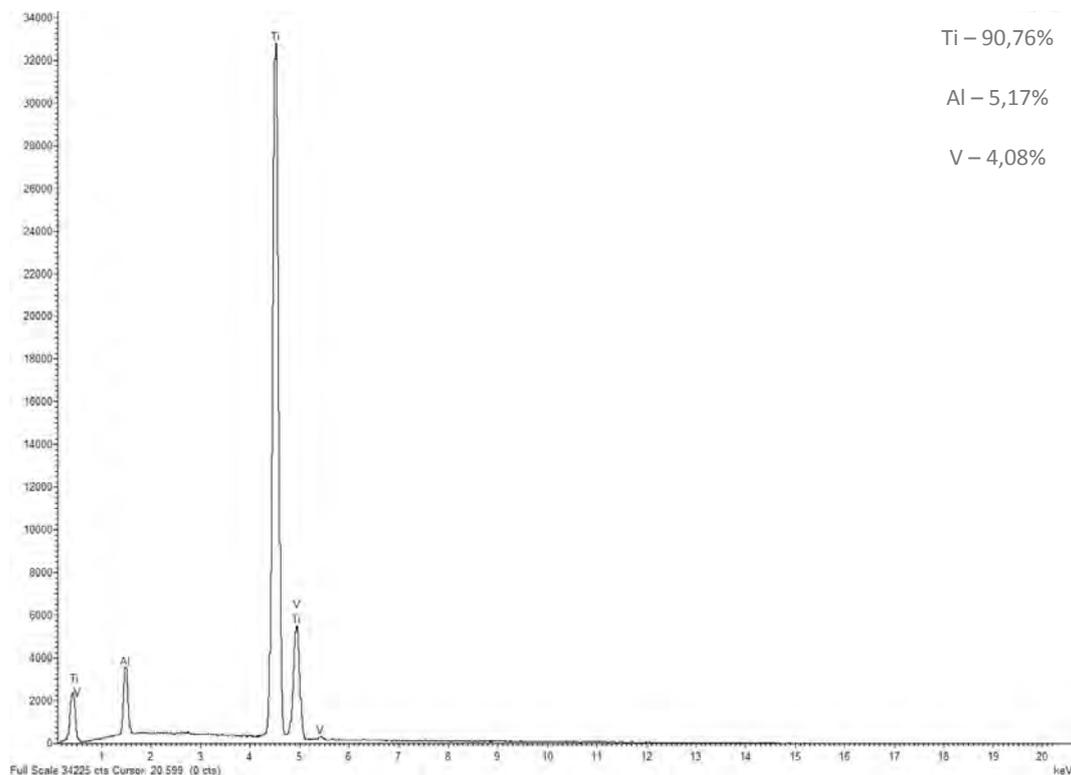


GRÁFICO 2 – Composição semi-quantitativa de um corpo-de-prova de Ti-6Al-4V após escovação com água destilada + dentifrício fluoretado (subgrupo EDF).

5.1.3 Análise da aderência de *Streptococcus mutans*

Os valores de UFC/mL de cada triplicata, referentes aos corpos-de-prova de Ti-6Al-4V avaliados neste estudo encontram-se nas Tabelas A7 a A12 do Apêndice 2. As médias de UFC/mL dos micro-organismos viáveis aderidos à superfície da liga Ti-6Al-4V são apresentadas no Gráfico 3. Os valores de UFC/mL são apresentados na forma de logaritmo na base 10.

De acordo com a análise estatística de variância (*one-way ANOVA*) nenhuma diferença significativa entre o número de *Streptococcus mutans* aderidos à

superfície pode ser atribuído aos diferentes subgrupos ($F_{5,30} = 0,43$; $p = 0,81$).

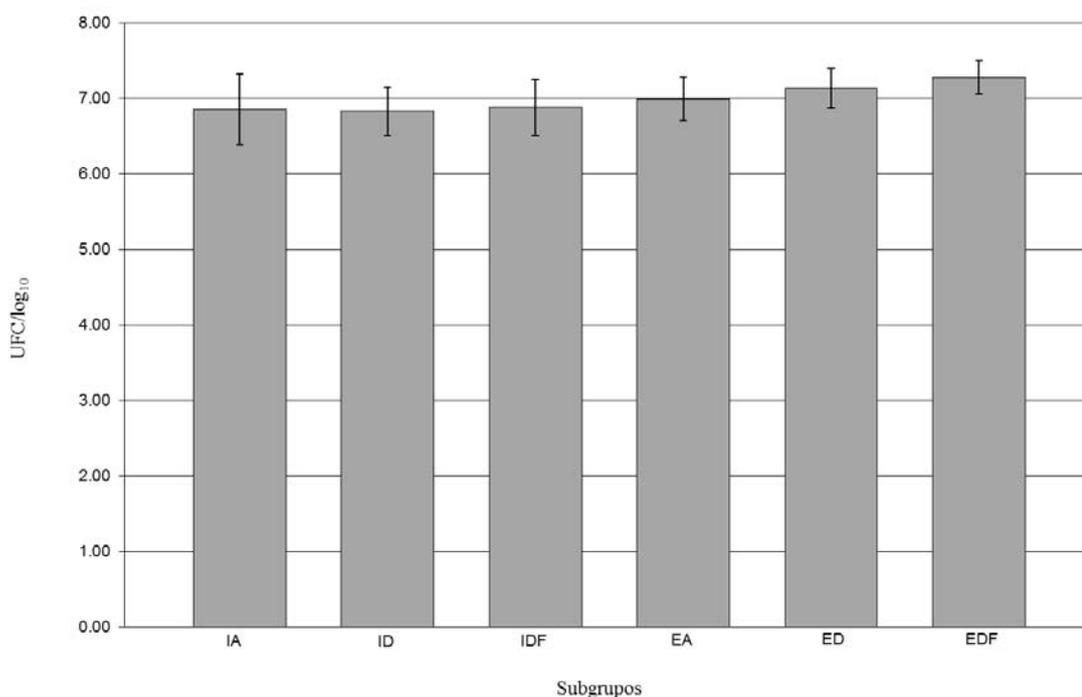


GRÁFICO 3 – Médias de UFC/mL (em \log_{10}) de *Streptococcus mutans* aderidos à superfície da liga Ti-6Al-4V após a execução dos tratamentos experimentais.

A Figura 13 apresenta as micrografias (aumento de 5.000 vezes) das superfícies com a aderência de *Streptococcus mutans*. Nenhuma diferença no padrão de aderência pôde ser detectada entre os subgrupos experimentais, corroborando a igualdade nos valores de UFC/mL apresentados anteriormente.

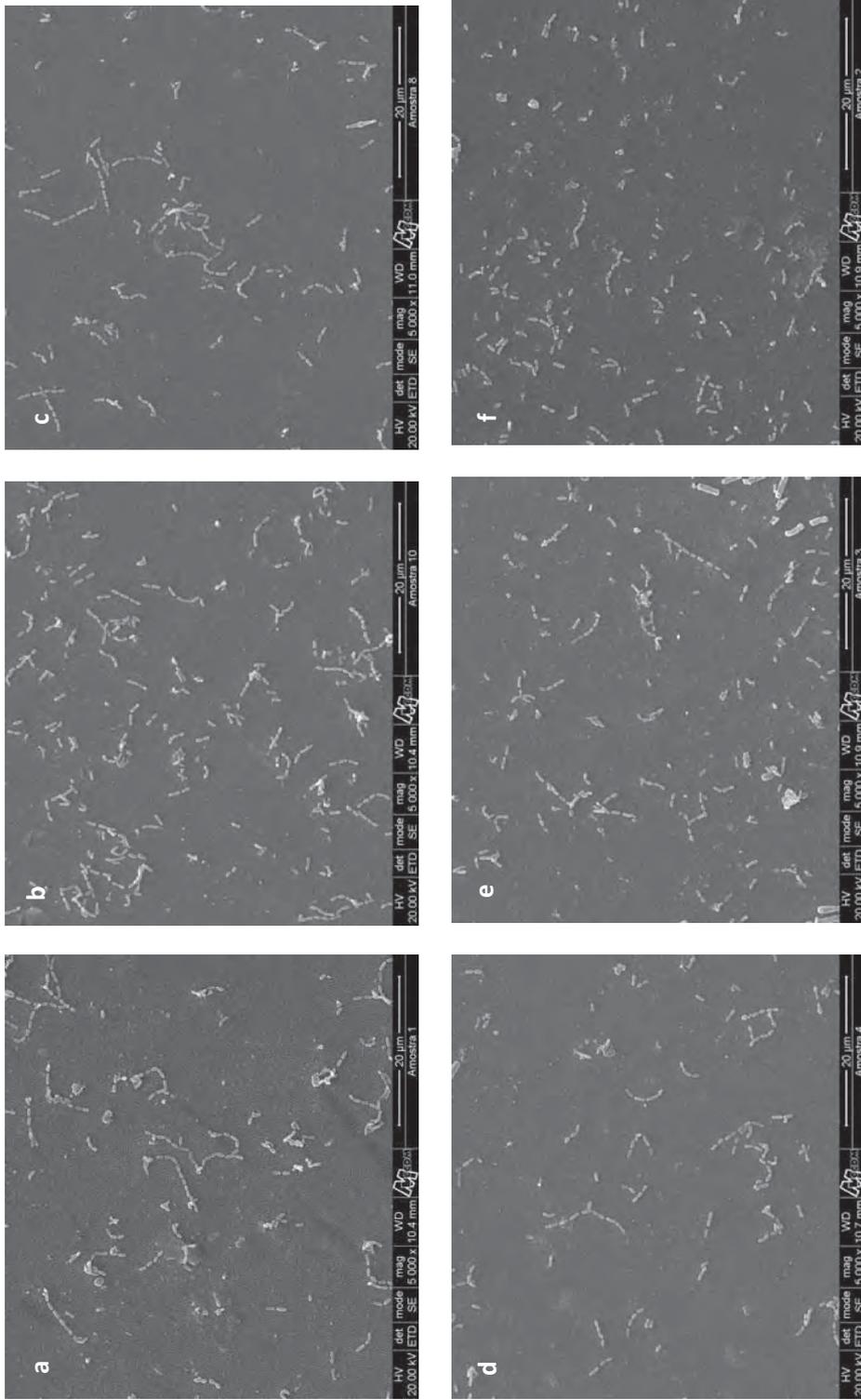


FIGURA 13 - Aderência de *Streptococcus mutans* às superfícies após a realização dos tratamentos experimentais: (a) subgrupo IA, (b) subgrupo ID, (c) subgrupo IDF, (d) subgrupo EA, (e) subgrupo ED, (f) subgrupo ED

5.2 Titânio cp – Grupo T

5.1.1 Topografia superficial

Os valores de rugosidade média (Ra) dos corpos-de-prova de Ti cp são apresentados nas Tabelas A13 a A18 do Apêndice 3. As médias de Ra dos seis subgrupos avaliados, juntamente com os resultados das análises estatísticas (etapas 1, 2 e 3), são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão da rugosidade média (Ra, em nanômetros) dos subgrupos de Ti cp

| Subgrupos | Ra | |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| IA – água destilada | 2,29 ± 0,55 ^{Aa} | 2,33 ± 0,17 ^{Aa*} |
| ID - dentifrício não-fluoretado | 2,24 ± 0,46 ^{Aa} | 2,02 ± 0,38 ^{Aa†} |
| IDF - dentifrício fluoretado | 2,22 ± 0,53 ^{Aa} | 1,95 ± 0,36 ^{Aa‡} |
| EA – água destilada | 2,22 ± 0,42 ^{Aa} | 3,76 ± 0,45 ^{Bb§} |
| ED - dentifrício não-fluoretado | 2,27 ± 0,55 ^{Aa} | 16,05 ± 3,25 ^{Cb#} |
| EDF - dentifrício fluoretado | 2,27 ± 0,51 ^{Aa} | 22,39 ± 5,07 ^{Db**} |

Análise estatística: Etapa 1 - Anova: comparações pré-tratamento: $F_{5,30} = 0,017$; $p = 0,99$

Etapa 2 - Teste T-Student - letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas linhas:

- * Subgrupo IA – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,66$
- † Subgrupo ID – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,16$
- ‡ Subgrupo IDF – pré vs. pós-tratamento - $p = 0,24$
- § Subgrupo EA – pré vs. pós-tratamento - $p < 0,01$
- # Subgrupo ED – pré vs. pós-tratamento - $p < 0,01$
- ** Subgrupo EDF – pré vs. pós-tratamento - $p < 0,01$

Etapa 3 - Anova comparações pós-tratamento: $F_{5,30} = 212,40$; $p < 0,01$

Teste de Tukey - letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas nas colunas

O resultado obtido pela análise de variância na primeira etapa indica não haver diferença entre os valores de Ra pré-tratamento ($p = 0,99$), demonstrando padronização dos procedimentos de acabamento/polimento e igualdade entre as superfícies dos seis subgrupos experimentais.

As comparações entre os valores Ra pré e pós-tratamento demonstraram que os procedimentos de imersão (subgrupos IA, ID e IDF) não alteraram a Ra das amostras de Ti cp. Todos os subgrupos escovados (EA, ED, e EDF) apresentaram aumento de rugosidade média após o tratamento experimental.

A comparação pós-tratamento dos valores de Ra indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos experimentais ($p < 0,01$). Os resultados de Ra foram iguais entre os subgrupos de imersão (IA, ID e IDF), que apresentaram valores mais baixos em relação aos subgrupos escovados (EA, ED e EDF). A rugosidade aumentou gradativamente entre os subgrupos escovados. Os menores valores foram obtidos após escovação com água (subgrupo EA), valores intermediários foram observados após a escovação com dentifrício não-fluoretado (subgrupo ED), e as maiores alterações foram causadas após a escovação com dentifrício fluoretado (EDF).

As imagens 3D obtidas em MFA corroboram os resultados quantitativos referentes à rugosidade média. As superfícies pré-tratamento (Figuras 14a, 14b, 14c, 15a, 15b e 15 c) exibiram topografia homogênea, com algumas irregularidades provenientes do polimento. Os subgrupos de imersão não apresentam diferenças topográficas quando as

imagens pré e pós-tratamento foram comparadas (Figuras 14d, 14e e 14f). Por outro lado, os subgrupos escovados (Figuras 15d, 15e e 15f) apresentam alterações gradativas, sendo a escovação com água destilada (Figura 15d) e a escovação com dentifrício fluoretado (Figura 15f), os tratamentos experimentais que promoveram, respectivamente, as menores e maiores alterações na topografia da superfície.

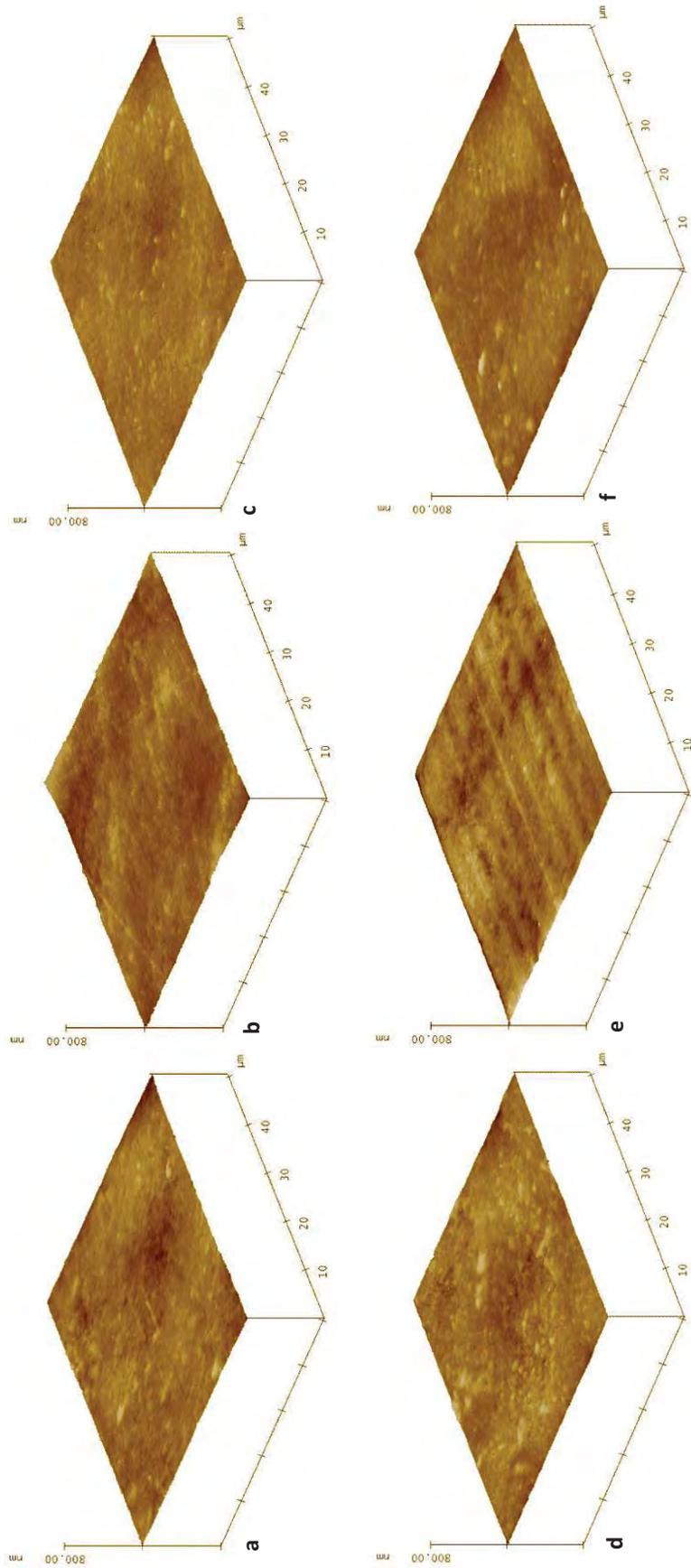


FIGURA 14 - Imagens em 3D dos subgrupos IA (a,d), ID (b,e) e IDF (c,f) obtidas em MFA antes (a, b, c) e após (d, e, f) a realização dos tratamentos experimentais. Regiões mais claras representam picos, enquanto aquelas mais escuras referem-se aos vales.

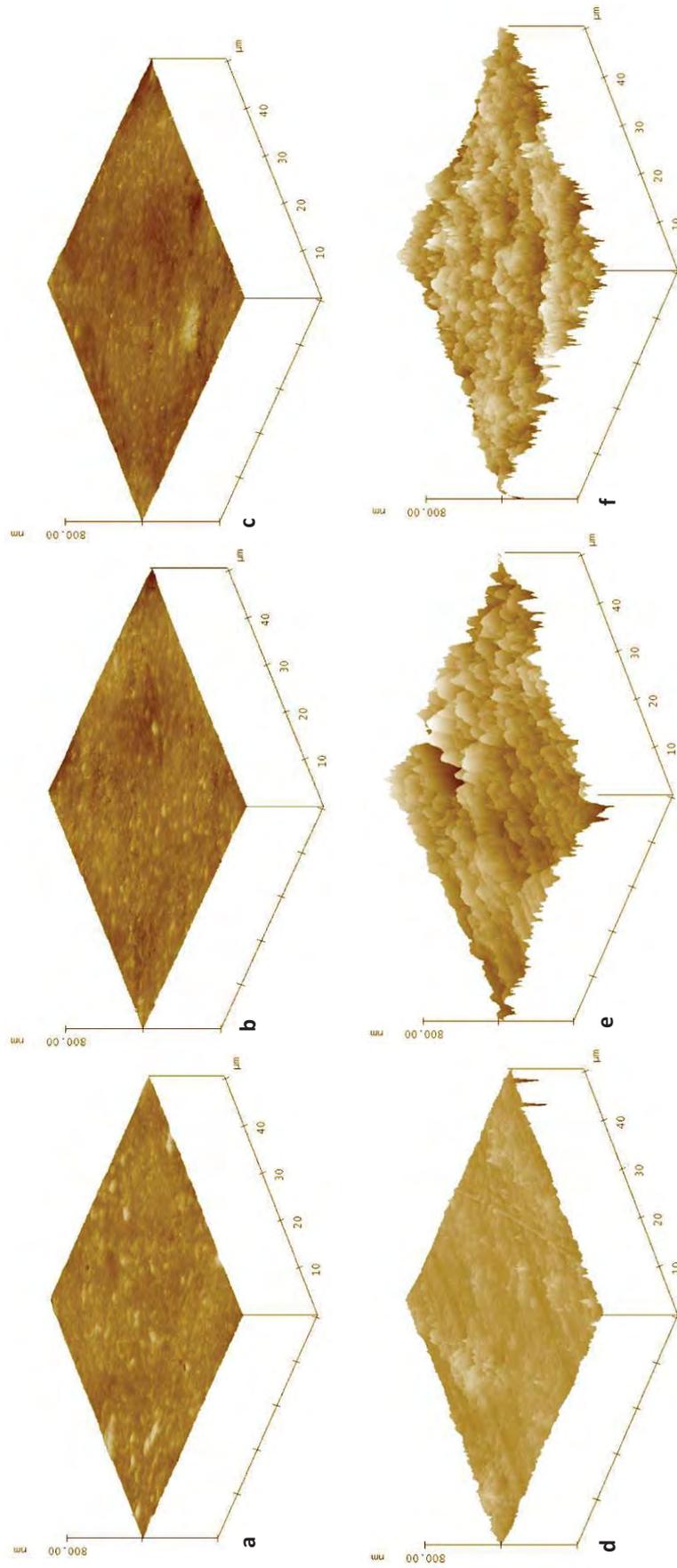


FIGURA 15 - Imagens em 3D dos subgrupos EA (a,d), ED (b,e) e EDF (c,f) obtidas em MFA antes (a, b, c) e após (d, e, f) a realização dos tratamentos experimentais. Regiões mais claras representam picos, enquanto aquelas mais escuras referem-se aos vales.

5.2.2 Avaliação dos elementos químicos (EDX)

Os Gráficos 4 e 5 apresentam a composição química semi-quantitativa dos elementos presentes nos corpos-de-prova de Ti cp dos subgrupos IDF e EDF após execução da imersão ou escovação. Como pode ser observado, não foram detectados íons fluoreto ou sódio sobre a superfície destas amostras.

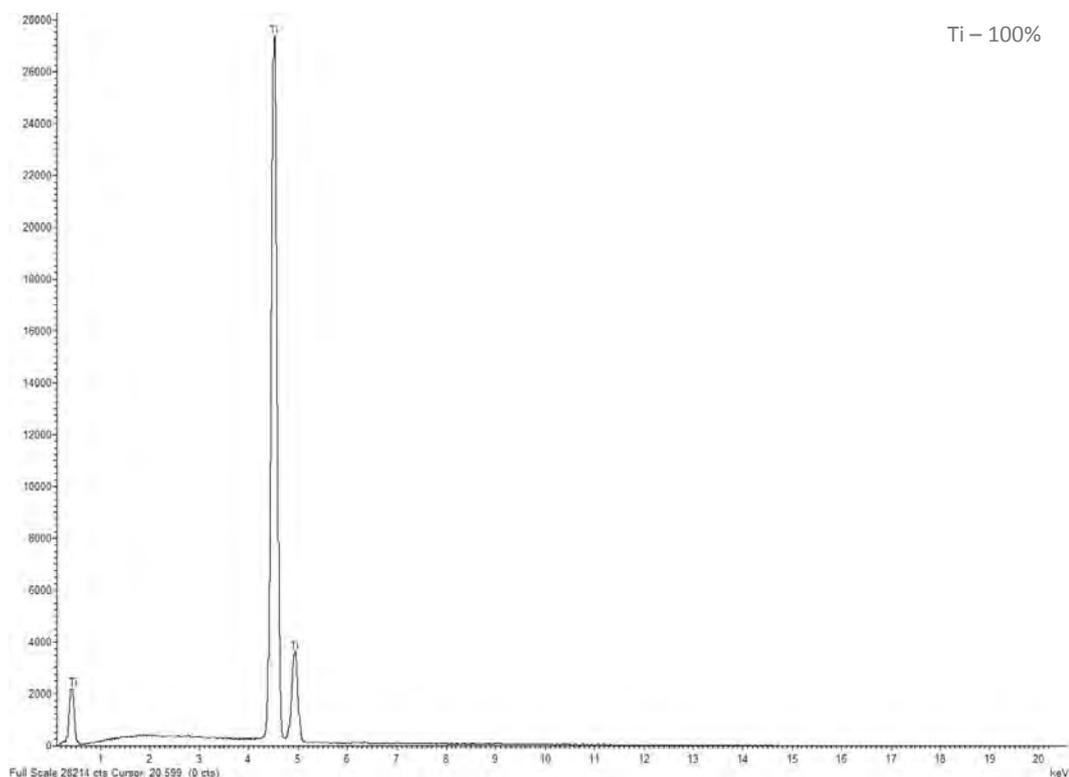


GRÁFICO 4 – Composição semi-quantitativa de um corpo-de-prova de Ti cp após imersão em água destilada + dentifrício fluoretado (subgrupo IDF).

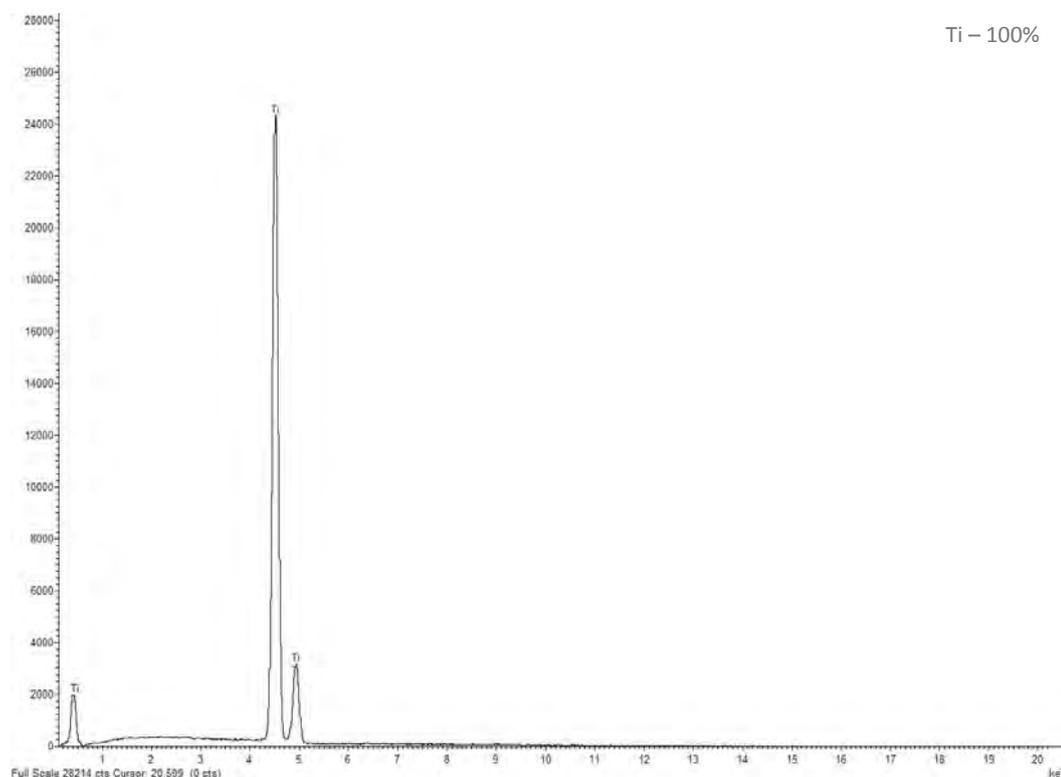


GRÁFICO 5 – Composição semi-quantitativa de um corpo-de-prova de Ti cp após escovação com água destilada + dentifrício fluoretado (subgrupo EDF).

5.2.3 Análise da aderência de *Streptococcus mutans*

Os valores em triplicata de UFC/mL dos corpos-de-prova de Ti cp são apresentados nas Tabelas A19 a A24 do Apêndice 4. As médias de micro-organismos viáveis aderidos à superfície deste metal encontram-se no Gráfico 6. Os valores de unidades formadoras de colônias são apresentados na forma de logaritmo na base 10. De acordo com o valor de p resultante da análise estatística de variância (*one-way* ANOVA), não houve diferença significativa entre os subgrupos ($F_{5,30} = 0,84$; $p = 0,52$).

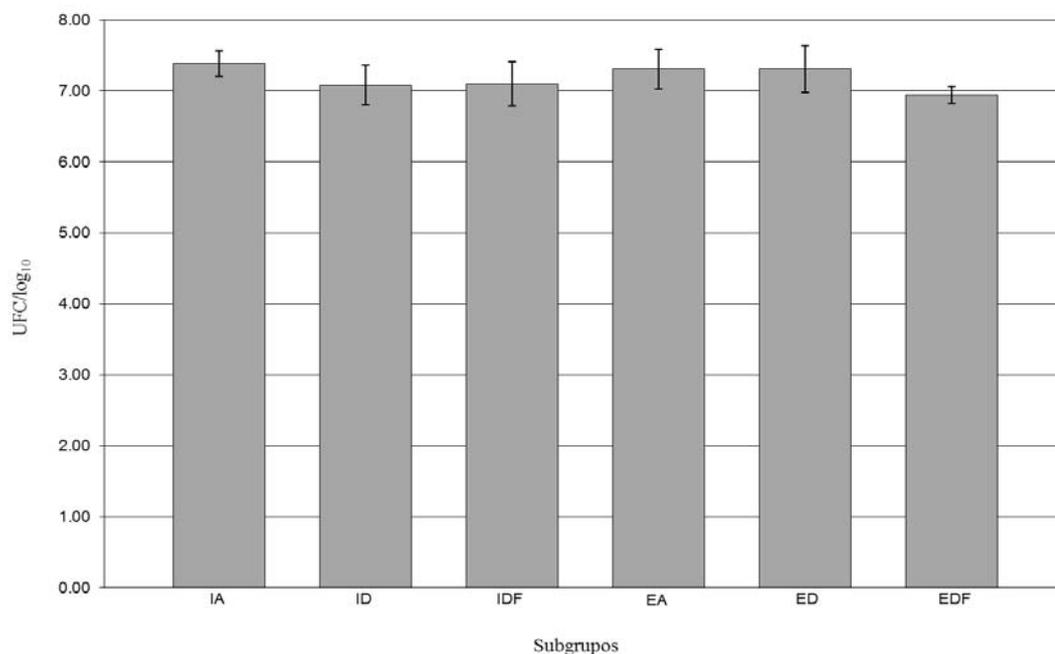


GRÁFICO 6 – Médias de UFC/mL (em log₁₀) de *Streptococcus mutans* aderidos à superfície do Ti cp após a execução dos tratamentos experimentais.

A Figura 16 apresenta as micrografias (aumento de 5.000 vezes) das superfícies de Ti cp com *Streptococcus mutans* aderidos. Corroborando os dados e a análise estatística referente a quantificação do número de micro-organismos aderidos, nenhuma diferença no padrão de aderência foi detectada entre os subgrupos experimentais.

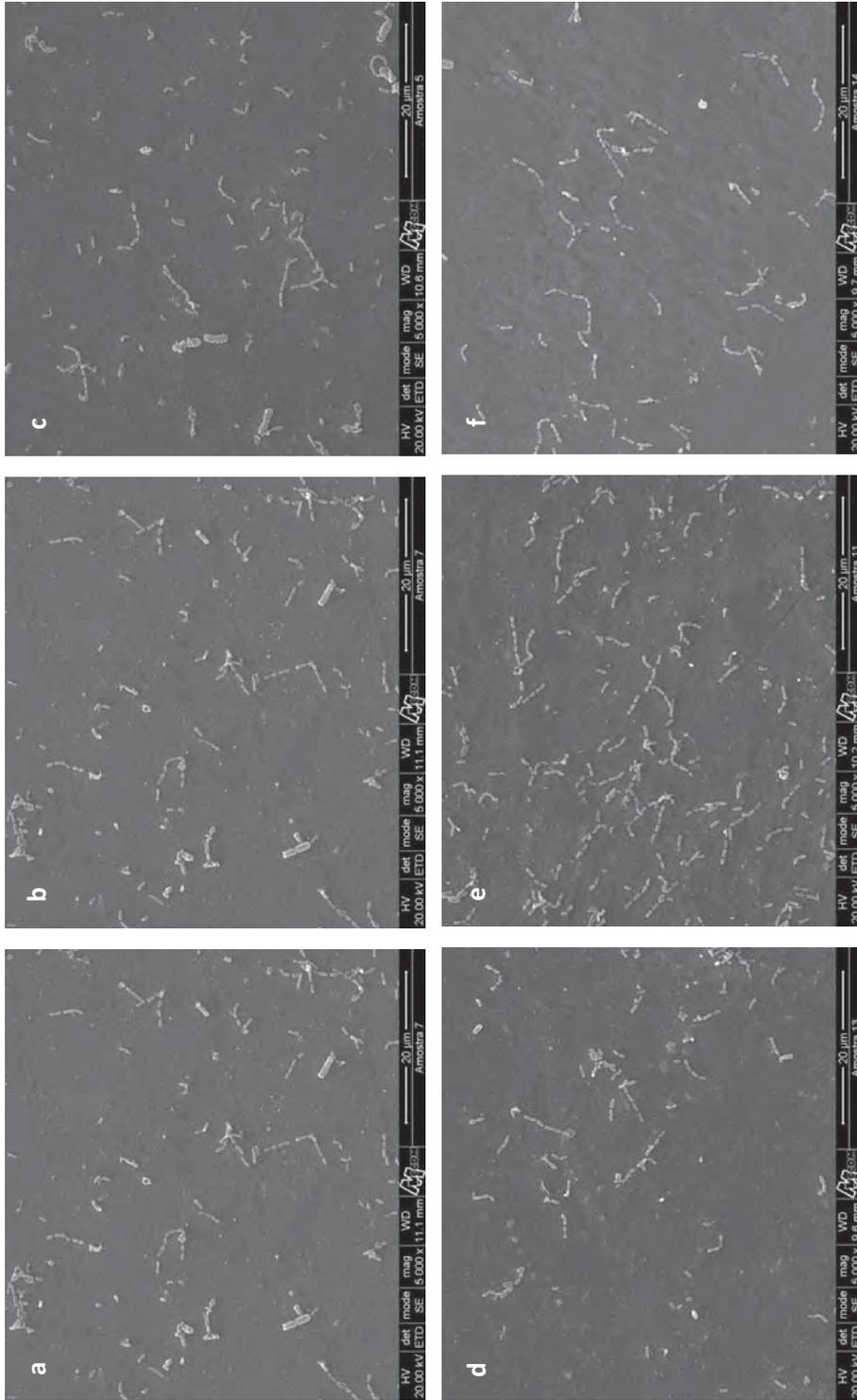


FIGURA 16 - Aderência de *Streptococcus mutans* às superfícies após a realização dos tratamentos experimentais: (a) subgrupo IA, (b) subgrupo ID, (c) subgrupo ED, (d) subgrupo EA, (e) subgrupo ID, (f) subgrupo IDF.

6 Discussão

6.1 Imersão e escovação com dentifrícios fluoretado e não-fluoretado

Na área Odontológica, várias propriedades físicas e mecânicas tornaram o titânio e as ligas à base de titânio materiais desejáveis para a confecção de implantes, além de opções viáveis em substituição a metais nobres e ligas mais tradicionais. Independentemente da forma de obtenção (fundição, usinagem mecânica ou computadorizada) das estruturas em titânio, a natureza altamente reativa deste metal possui vantagens e desvantagens que podem interferir no sucesso dos tratamentos³.

Apesar da reatividade do titânio promover a formação da camada de óxidos responsável pela biocompatibilidade e resistência à corrosão, especula-se que seus óxidos não sejam tão estáveis como inicialmente previa-se^{73, 78}, principalmente quando expostos a determinadas condições da cavidade bucal. As alterações enzimáticas, as alterações de pH e a presença de produtos fluoretado são enumerados como condições adversas à manutenção das propriedades da camada de óxidos do titânio.

Sabe-se que a resistência à corrosão é de fundamental importância uma vez que a corrosão pode alterar a rugosidade da superfície, diminuir a resistência de

infraestruturas, além de possibilitar a liberação de elementos dos metais e ligas, contribuindo para aumento da toxicidade¹⁵.

Especificamente com relação aos produtos fluoretados, se por um lado o uso de enxaguatórios, géis profiláticos e dentifrícios com flúor em suas composições atingiram impactos notórios na prevenção de cáries durante as últimas décadas⁷, tais produtos têm sido considerados danosos à superfície do titânio. Apesar dos relatos encontrados na literatura acerca do efeito de fluoretos sobre a superfície do titânio, a maioria dos estudos avaliou altas concentrações de flúor, o que possivelmente não conjectura os efeitos de dentifrícios, mas sim o de vernizes, de géis, e, eventualmente, de enxaguatórios que são os agentes com as maiores concentrações de flúor.

O uso de dentifrícios fluoretado foi introduzido nos países industrializados na década de 60, sendo este produto, atualmente, um dos veículos mais comuns para o fornecimento de flúor à cavidade bucal. Apresentam concentrações variando entre 500 e 1.500 ppm F, predominantemente na forma de fluoreto de sódio (NaF) ou monofluorofosfato de sódio, além de adoçantes, detergentes e abrasivos, que podem ser a base de sílica ou de carbonato de cálcio⁸⁵. No Brasil e na União Européia, a concentração de 1.500 ppm de flúor é considerada o limite máximo de fluoretos que pode ser adicionado a um dentifrício^{11, 18}.

Dessa forma, considerando que o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da imersão e da escovação com dentifrícios fluoretado e não-fluoretado sobre a topografia superficial e sobre a aderência de *Streptococcus*

mutans no Ti cp e na liga Ti-6Al-4V, optou-se pela utilização da concentração máxima de 1.500 ppm F⁻. Adicionalmente, nenhum dentifrício disponível comercialmente foi utilizado, selecionando-se dentifrícios manipulados com o intuito de minimizar possíveis interferências referentes a diferentes composições. Comercialmente, a seleção de dois dentifrícios com a mesma composição e cuja diferença recaísse sobre a presença ou não de flúor mostrou-se inviável.

De acordo com os resultados obtidos, a hipótese nula de que nenhuma diferença seria encontrada após a ação química dos componentes dos dentifrícios foi aceita. Entretanto, a hipótese nula referente à ação mecânica das cerdas das escovas, dos abrasivos do dentifrício, e da associação entre as cerdas, os abrasivos e os íons fluoretos foi rejeitada. Apesar de não terem sido observadas alterações na topografia de superfície após os tratamentos de imersão, os resultados dos testes de escovação mostraram que a presença do abrasivo no dentifrício afetou a rugosidade e a topografia do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V. As maiores alterações foram apresentadas quando, durante a escovação, houve a associação entre os íons fluoretos e os abrasivos.

Estudos prévios da literatura demonstram que alterações na topografia superficial e nos valores de Ra após testes de imersão em soluções fluoretadas estão relacionadas à concentração de flúor e/ou ao pH da solução^{2, 32, 44, 59, 69, 73, 82}. Tal constatação pode ser explicada pelas reações que ocorrem entre o NaF e a camada de óxidos protetora. O NaF presente no dentifrício dissocia-se em íons fluoretos e íons sódio. Os íons fluoretos reagem com íons hidrogênio, sendo parcialmente convertidos em ácido

fluorídrico (HF)⁴⁹. O HF, por sua vez, reage com a camada de óxidos, degradando o titânio e formando, em níveis de corrosão severos, compostos de fluoreto óxido de titânio, fluoreto de titânio e/ou fluortitanato de sódio na superfície do titânio^{37, 44, 45, 49, 76}. Estas reações desorganizam a camada de óxidos e conseqüentemente diminuem suas propriedades protetoras^{32, 38, 64, 78, 83}. Desta forma, todos os fatores que contribuírem para uma maior produção de HF, como por exemplo, baixo pH e altas concentrações de NaF, poderão interferir na resistência à corrosão do titânio²⁴.

Neste estudo, a imersão em dentifrício fluoretado (subgrupos IDF) não alterou as imagens 3D nem a rugosidade de superfície da liga Ti-6Al-4V e do Ti cp. Tais resultados, associados a não detecção de compostos fluoretados ou sódicos na superfície (Gráficos 1, 2, 4 e 5), provavelmente, indicam que a reação entre o NaF do dentifrício e a superfície do titânio não foram capazes de alterar significativamente a superfície dos metais estudados. Esses achados podem ser explicados pela concentração de flúor (1.500 ppm) e pH do dentifrício utilizado^{2, 37, 44, 49-52, 64, 69, 83, 91}. É importante salientar que apesar do pH da solução influenciar a resistência à corrosão do titânio, esta variável não foi incluída neste estudo. Segundo as especificações da ISO, o pH dos dentifrícios podem variar entre 4,5 e 10,5³⁵. O valor de 6,3, referente ao dentifrício utilizado neste estudo, foi propiciado pelos componentes do mesmo, não sendo feito nenhum tipo de ajuste.

Em uma série de estudos, Nakagawa et al.⁵⁰⁻⁵² determinaram importantes parâmetros relacionados a corrosão do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V em função da

concentração de NaF e dos valores de pH das soluções. Segundo estes autores, existem limites para que tais variáveis alterem a resistência à corrosão do titânio. Dessa forma, a probabilidade de danos na superfície do titânio pode ser previsível quando o pH e a concentração de flúor forem conhecidas.

Uma explicação para os resultados dos testes de imersão encontrados no presente estudo recai nos limiares corrosivos e não corrosivos estabelecidos por Nakagawa et al.⁵⁰⁻⁵². Segundo estes autores, uma concentração de 1.500 ppm F⁻ só induziria processos corrosivos no Ti cp se o pH da solução fosse aproximadamente igual a 4,7; já para a liga Ti-6Al-4V, o pH considerado limítrofe para a indução de corrosão seria igual a 5,1. Por outro lado, dentifrícios com pH igual a 6,3 precisariam de mais de 10.000 ppm F⁻ para corroerem estes metais.

Projetando tais limites para a cavidade bucal, pode-se prever que a ação química deste dentifrício não seria danosa ao Ti cp e à liga Ti-6Al-4V. Espontaneamente, o pH da saliva varia entre 5,2 e 7,8¹⁵, havendo uma redução do pH no ambiente bucal após o consumo de produtos ácidos, momento no qual o limite mínimo de 4,8 é atingindo³¹. Apesar de este valor mínimo estar no limite corrosivo da liga proposto por Nakagawa et al.⁵⁰⁻⁵² também deve ser considerado que a concentração de fluoretos não se mantém constante; após a escovação com um dentifrício com 1.250 ppm de F⁻, por exemplo, a concentração diminui a níveis próximos de 200 ppm F nos primeiros 90 segundos, estabilizando-se em torno de 29 ppm

nos 30 minutos seguintes¹⁴, valores que podem ser considerados insignificantes para a degradação da superfície do titânio.

Demais resultados encontrados na literatura corroboram os limiares de corrosão determinados por Nakagawa⁵⁰⁻⁵² e os resultados encontrados no presente estudo. Siirila, Kononem⁷³ reportaram que as superfícies do Ti cp não apresentaram corrosão visível em micrografias após duas semanas de imersão em dentifrícios fluoretado com 1.250 ppm F⁻; Entretanto, observaram corrosão por pites e fissuras apenas quando 12.500 ppm F⁻ foram usados. Toniollo et al.⁸² não encontraram aumentos significantes na rugosidade do Ti cp após 15 dias de imersão em soluções neutras com 500 ppm ou 2.000 ppm F⁻. Sartori et al.⁶⁹ avaliaram as superfícies de implantes confeccionados em Ti cp após 144 horas de imersão em soluções fluoretadas com 1.500 ppm F⁻ e pHs iguais a 5,3 e 7,4, não encontrando corrosão ou outros efeitos que poderiam ser atribuídos ao flúor.

Outra liga com titânio, a Ni-Ti, também não apresentou alterações tri-dimensionais na superfície e diferenças na rugosidade média (Ra) após 672 horas de imersão em dentifrícios comercializados com concentrações de flúor entre 527 ppm e 2.491 ppm e com pH variando entre 6,3 e 7,3³³.

Alterações topográficas e aumento na rugosidade média do Ti cp e na liga Ti-5Al-4V foram encontrados, respectivamente, por Mabileau et al.⁴⁴ após nove dias de imersão em solução salina com alta concentrações de flúor (5.000 e 25.000 ppm F⁻), e por Popa et

al.⁵⁹ após 500 horas de imersão em saliva artificial com 0,01M F⁻ com pH igual a 5. Al-Mayouf et al.² correlacionaram o aumento da concentração de fluoretos a um aumento de porosidade na camada de óxidos do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V, demonstrando que 0,01 e 0,05M de NaF reduzem a proteção contra a corrosão.

Por outro lado, Fernandes-Filho²³ encontrou alterações nas superfícies do titânio comercialmente puro após a imersão em solução fluoretada com 1.500 ppm de F⁻ e pH = 5,3. Aumentos nos valores de rugosidade média deste metal foram obtidos após a simulação de cinco, dez, quinze e vinte anos de contato com os fluoretos. Porém, o pesquisador utilizou ácido fluorídrico para ajuste do pH da solução, o que poderia ter influenciado os resultados encontrados.

Com relação aos testes de escovação, os resultados das imagens 3D e da rugosidade média do presente estudo sugerem que a ação abrasiva das cerdas das escovas dentais não alteram a topografia superficial da liga Ti-6Al-4V, estando tal tratamento associado às menores alterações dentre aquelas provocadas pela escovação no Ti cp. No Grupo T, os valores de Ra obtidos após a escovação com dentifrício não-fluoretado (subgrupo ID) e com dentifrício fluoretado (subgrupo IDF) foram, respectivamente, 6,8 e 9,6 vezes maiores que os valores do subgrupo controle (IA); no Grupo L foram 5,5 e 7,8 vezes maior que os valores do subgrupo controle (IA). Adicionalmente, as imagens da topografia superficial mostraram alterações significantes tanto em função da ação mecânica dos abrasivos (Figuras 12e e 15e) como em decorrência da associação entre os fluoretos e os abrasivos (Figuras 12f e 15f).

Inúmeros fatores podem influenciar o desgaste de uma superfície durante a escovação. Dentre eles, alguns são determinados pelos componentes do dentífrico, como por exemplo, a abrasividade³⁰, a viscosidade^{43, 64}, a concentração de flúor⁷³ e o pH³¹, variáveis controladas neste estudo mediante a utilização de dentífricos com mesma formulação. Outros fatores, como por exemplo, a microestrutura, a dureza, a tenacidade à fratura e a resistência à fadiga^{40, 54} estão diretamente relacionados ao tipo de metal utilizado, e também podem interferir na resposta da superfície durante a escovação.

Os efeitos mecânicos dos abrasivos provenientes de dentífricos (subgrupos ED), responsáveis por um aumento da rugosidade de superfície, também foram verificados por outros autores quando testes de escovação linear e dentífricos sem flúor foram utilizados^{30, 31}. Entretanto, existem controvérsias a respeito dos efeitos dos dentífricos fluoretados abrasivos. Siirila, Kononem⁷³ relataram que as cerdas das escovas dentais foram as responsáveis pelas maiores alterações na superfície do titânio. Nogues et al.⁵⁴ não detectaram diferenças significantes na rugosidade do titânio com o uso de dentífricos fluoretados de diferentes abrasividades. Tais divergências de resultados podem ser atribuídas ao emprego de diferentes metodologias, visto que os primeiros autores realizaram uma escovação manual na superfície e que Nogues et al.⁵⁴, utilizaram escovas elétricas com rotação oscilatória, as quais possuem um menor poder abrasivo²⁰.

O aumento significativo de Ra apresentado nos corpos-de-prova escovados com dentífrico fluoretado

(subgrupos EDF) em relação aqueles escovados com dentifrício não-fluoretado (subgrupos ED) (Tabelas 2 e 3) supõe que a ação dos fluoretos foi favorecida pelo desgaste causado na superfície durante a ação mecânica do abrasivo presente no dentifrício.

A ação mecânica dos dentifrícios abrasivos pode destruir e/ou remover a camada de óxidos³¹, produzindo em consequência, estresses internos que aumentam a densidade da corrente do meio e favorecem a corrosão do titânio⁴⁶. Em um ambiente livre de íons fluoretos, ocorre uma recuperação espontânea da camada de óxidos mediante procedimento de re-passivação³¹. Entretanto, apesar da repassivação na camada de óxidos ser instantânea, sua reorganização e estabilidade não ocorrerão no mesmo momento²⁸. Desta forma, em um ambiente fluoretado, a superfície poderá estar mais susceptível aos efeitos do F⁻, os quais influenciarão as propriedades da camada de óxidos neo-formada, que poderá ser dividida em duas estruturas: uma camada externa porosa, e uma interna densa².

6.2 Aderência de *Streptococcus mutans*

A cavidade bucal é naturalmente colonizada por uma diversidade de espécies de micro-organismos, que aderem a várias superfícies presentes neste ambiente. Assim sendo, superfícies de Ti cp ou de Ti-6Al-4V, seja na forma de estruturas protéticas, implantes expostos ou componentes do sistema protético proverão novas superfícies que irão interagir com os micro-organismos presentes²⁷.

Já está comprovado que a aderência e o sucesso da colonização de micro-organismos em superfícies sólidas desempenham um papel chave na formação do biofilme e na patogênese de infecções relacionadas aos biomateriais²⁵. A aderência dos micro-organismos presentes na cavidade bucal associada à formação de biofilmes patogênicos resultam em infecções nos tecidos peri-implantares levando, conseqüentemente, a perda do implante¹².

Nos tecidos duros intra-buciais, as espécies de *Actinomyces* e *Streptococcus* são classificadas como colonizadores primários, sendo os responsáveis em preparar o ambiente para o demais colonizadores²⁶, tais como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Fusobacterium*, os quais requerem condições mais específicas para o crescimento^{26, 80} e que estão envolvidos nos processos patogênicos das periodontites e peri-implantites²⁹. O *Streptococcus mutans* é considerado o principal micro-organismo anaeróbio facultativo presente na placa supragengival, exibindo altas taxas de sobrevivência, mesmo em condições laboratoriais^{72, 79}. As espécies de *Streptococcus*, incluindo o *Streptococcus mutans*, são consideradas os colonizadores predominantes das superfícies orais⁷².

Algumas características da superfície do substrato, tais como composição química, energia livre de superfície, hidrofobicidade, rugosidade e irregularidades^{16, 53, 55, 71}, além da presença de proteínas⁷¹, apresentam a habilidade de interferir na qualidade e na quantidade de biofilme acumulado.

Fisicamente, a aderência e a retenção dos micro-organismos ocorrem em quatro fases: (1) transporte de nutrientes dos micro-organismos para o substrato; (2) aderência inicial; (3) aderência por meio de interações específicas e (4) colonização das superfícies^{9, 60}. A aderência inicial de um micro-organismo a um substrato se deve a interações entre forças atrativas de Van der Waals e forças eletrostáticas repulsivas. Após esta fase, considerada reversível, o segundo estágio de aderência por meio de ligações iônicas, covalentes, ou pontes de hidrogênio é estabelecida. Esta segunda fase de aderência é considerada irreversível, e ocorre, preferencialmente, em superfícies rugosas da cavidade bucal, onde os micro-organismos estarão protegidos contra forças de remoção^{61, 62}. Por este motivo, a rugosidade de superfície vem sendo a variável mais estudada e associada à aderência de biofilmes^{12, 49, 53, 61, 62, 65}.

Acerca do uso do titânio e de suas ligas na área da implantodontia, dois aspectos são considerados: as superfícies que estarão em contato com o tecido ósseo, normalmente, apresentam maior rugosidade para o favorecimento da osseointegração, enquanto pilares e outras estruturas expostas ao ambiente bucal devem apresentar uma lisura superficial que será crucial para o controle de formação do biofilme^{65, 79}. Enquanto na área médica deseja-se que os implantes e componentes associados apresentem menos de 10 nm de rugosidade⁸⁴, não existe nenhuma padronização na rugosidade superficial dos pilares protéticos⁹.

Segundo Teughels et al.⁸⁰, superfícies mais rugosas de coroas e pilares acumulam e retém um biofilme mais espesso, com maior volume, maior número de unidades

formadoras de colônias, maiores proporções de bacilos, organismos móveis e espiroquetas. Conseqüentemente, todas as estruturas expostas a cavidade bucal e aos seus micro-organismos deveriam ser altamente polidas com o intuito de dificultar a aderência de micro-organismos, reduzindo a formação do biofilme¹².

Na literatura, grande ênfase é dada para a aderência de micro-organismos em superfícies do titânio. Entretanto, apesar de Quirynen et al.⁶⁰ destacarem a aplicação de géis fluoretado acidulados (pH < 5) e de géis que contém ácido fluorídrico como um tratamento que requer uma atenção redobrada devido à possibilidade destes produtos alterarem a rugosidade do titânio, favorecendo a adesão de micro-organismos, nenhum trabalho avaliou a rugosidade e a adesão de micro-organismos em função da ação de dentifrícios fluoretados, como realizado no presente estudo.

Apesar dos valores de Ra e das imagens 3D serem influenciadas pela execução de alguns dos tratamentos experimentais avaliados neste estudo, a hipótese nula, de que tais procedimentos não alterariam a aderência de *Streptococcus mutans* sobre as superfícies do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V, foi aceita. A presença de riscos e ranhuras na topografia além de maiores valores de rugosidade nos subgrupos EA, ED e EDF do Grupo T e nos subgrupo ED e EDF do Grupo L, não foram suficientes para alterarem as médias de UFC/mL, havendo um padrão similar de aderência com distribuição esparsa de *Streptococcus mutans* e uma tendência para a formação de cadeias de células em todas as superfícies avaliadas.

Tais resultados podem ser explicados pelos limiares de rugosidade média estabelecidos por Bollen et al.⁹ e Quirynen et al.⁶². Estes pesquisadores realizaram uma série de estudos in vivo, nos quais superfícies de implantes e pilares com diferentes valores de rugosidade média eram avaliados para determinação da aderência de micro-organismos. Com estes estudos, os autores conseguiram estipular um limiar de rugosidade igual a 0,2 μm , abaixo do qual nenhuma alteração na aderência de micro-organismos poderia ser observada.

Desta forma, do ponto de vista da aderência microbiológica, pelo fato das alterações propiciadas pela ação da escovação com dentifrício abrasivo fluoretado (1.500 ppm; pH = 6,3) estarem com valores de Ra menores que 0,20 μm , possivelmente, nenhum impacto na aderência e na composição da microbiota, supra ou subgengival, seria observado clinicamente.

Os tratamentos experimentais do presente estudo foram definidos com o objetivo de melhor entender se os fluoretos provenientes de dentifrícios possuíam algum efeito químico sobre a topografia do titânio e se tais efeitos poderiam ser intensificados pela escovação com dentifrício abrasivo fluoretado, alterando o comportamento clínico dos metais estudados em relação à aderência de micro-organismos. Entretanto, algumas limitações tais como a ausência da quantificação da liberação de íons, estudo da resistência mecânica e outras variáveis relacionadas ao ambiente bucal, tais como a presença de proteínas, flutuações na concentração de fluoretos, alterações de pH e

de temperatura, talvez auxiliassem na completa compreensão dos fenômenos envolvidos.

7 Conclusão

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que:

- a ação exclusivamente química (imersão) dos íons fluoreto e dos demais componentes dos dentifrícios utilizados não alterou a topografia superficial e a rugosidade média do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V;

- a ação exclusivamente mecânica (escovação) das cerdas das escovas dentais não promoveu alterações significativas na topografia superficial e na rugosidade média da liga Ti-6Al-4V, diferentemente do que foi verificado para o Ti cp;

- a ação mecânica dos abrasivos, associada ou não à presença dos íons fluoreto (1.500 ppm; pH = 6,3), alterou significativamente a topografia superficial e a rugosidade média de ambos, Ti cp e Ti-6Al-4V;

- as alterações na topografia superficial e o aumento dos valores de rugosidade média, quando verificados, não interferiram na aderência de *Streptococcus mutans*.

8 Referências*

1. Al Hussaini I, Al Wazzan KA. Effect of surface treatment on bond strength of low-fusing porcelain to commercially pure titanium. *J Prosthet Dent.* 2005; 94: 350-6.
2. Al-Mayouf AM, Al-Sawayih AA, Al-Mobarak NA, Al-Jabab AS. Corrosion behavior of a new titanium alloy for dental implant application in fluoride media. *Mater Chem Phys.* 2004; 86: 320-9.
3. American Dental Association. Titanium applications in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2003; 134: 347-9.
4. Barbour ME, O'Sullivan DJ, Jenkinson HF, Jagger DC. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonisation of titanium abutments. *J Mater Sci Mater Med.* 2007; 18: 1439-47.
5. Barros RN, Gouvea CV. Prophylactic agents and bacterial adherence to titanium. *Clin Oral Implants Res.* Feb 11. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02099.x. [Epub ahead of print].
6. Berg E. Dentists' opinions on aspects of cast titanium restorations. *J Dent.* 1997; 25: 113-7.
7. Biesbrock AR, Gerlach RW, Bollmer BW, Faller RV, Jacobs SA, Bartizek RD. Relative anti-caries efficacy of 1100, 1700, 2200, and 2800 ppm fluoride ion in a sodium fluoride dentifrice over 1 year. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2001; 29: 382-9.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Bjerkan G, Witso E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop.* 2009; 80: 245-50.
9. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997; 13: 258-69.
10. Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 201-11.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 22, de 20 de dezembro de 1989. DO de 22/12/1989, p. 241.
12. Burgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 156-64.
13. Burgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010; 6: 2307-13.
14. Campus G, Lallai MR, Carboni R. Fluoride concentration in saliva after use of oral hygiene products. *Caries Res.* 2003; 37: 66-70.
15. Chaturvedi TP. An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian J Dent Res.* 2009; 20: 91-8.

16. Chin MY, Sandham A, de Vries J, van der Mei HC, Busscher HJ. Biofilm formation on surface characterized micro-implants for skeletal anchorage in orthodontics. *Biomaterials*. 2007; 28: 2032-40.
17. Correa CB, Pires JR, Fernandes-Filho RB, Sartori R, Vaz LG. Fatigue and fluoride corrosion on *Streptococcus mutans* adherence to titanium-based implant/component surfaces. *J Prosthodont*. 2009; 18: 382-7.
18. Davies RM, Ellwood RP, Davies GM. The rational use of fluoride toothpaste. *Int J Dent Hyg*. 2003; 1: 3-8.
19. Duarte PM, Reis AF, de Freitas PM, Ota-Tsuzuki C. Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. *J Periodontol*. 2009; 80: 1824-32.
20. Dyer D, MacDonald E, Newcombe RG, Scratcher C, Ley F, Addy M. Abrasion and stain removal by different manual toothbrushes and brush actions: studies in vitro. *J Clin Periodontol*. 2001; 28: 121-7.
21. Ehrensberger MT, Sivan S, Gilbert JL. Titanium is not "the most biocompatible metal" under cathodic potential: The relationship between voltage and MC3T3 preosteoblast behavior on electrically polarized cpTi surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 93: 1500-9.
22. Fathi MH, Salehi M, Saatchi A, Mortazavi V, Moosavi SB. In vitro corrosion behavior of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants. *Dent Mater*. 2003; 19: 188-98.

23. Fernandes-Filho RB. Avaliação da rugosidade, corrosão e aderência bacteriana no titânio comercialmente puro após ação de fluoretos em diferentes períodos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.
24. Fragou S, Eliades T. Effect of topical fluoride application on titanium alloys: a review of effects and clinical implications. *Pediatr Dent*. 2010; 32: 99-105.
25. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*. 1987; 237: 1588-95.
26. Groessner-Schreiber B, Hannig M, Duck A, Griepentrog M, Wenderoth DF. Do different implant surfaces exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities? *Eur J Oral Sci*. 2004; 112: 516-22.
27. Grossner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Muller WD, Lange KP, Briedigkeit H, et al. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12: 543-51.
28. Hanawa T, Asami K, Asaoka K. Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. *J Biomed Mater Res*. 1998; 40: 530-8.
29. Heuer W, Stiesch M, Abraham WR. Microbial diversity of supra- and subgingival biofilms on freshly colonized titanium implant abutments in the human mouth. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010; 30: 193-200.
30. Hossain A, Okawa S, Miyakawa O. Effect of toothbrushing on titanium surface: an approach to understanding surface properties of brushed titanium. *Dent Mater*. 2006; 22: 346-52.

31. Hossain A, Okawa S, Miyakawa O. Surface texture and composition of titanium brushed with toothpaste slurries of different pHs. *Dent Mater.* 2007; 23: 186-92.
32. Huang HH. Effects of fluoride concentration and elastic tensile strain on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Biomaterials.* 2002; 23: 59-63.
33. Huang HH. Variation in surface topography of different NiTi orthodontic archwires in various commercial fluoride-containing environments. *Dent Mater.* 2007; 23: 24-33.
34. Huang HH, Lee TH. Electrochemical impedance spectroscopy study of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva with fluoride and/or bovine albumin. *Dent Mater.* 2005; 21: 749-55.
35. International Organization for Standardization. ISO 11609: Dentistry - Dentifrices - Requirements, test methods and marking. Geneva: ISO; 2010.
36. Jang KS, Youn SJ, Kim YS. Comparison of castability and surface roughness of commercially pure titanium and cobalt-chromium denture frameworks. *J Prosthet Dent.* 2001; 86: 93-8.
37. Joska L, Fojt J. Corrosion behaviour of titanium after short-term exposure to an acidic environment containing fluoride ions. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21: 481-8.
38. Kaneko T, Hattori M, Hasegawa K, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Influence of finishing on the electrochemical properties of dental alloys. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2000; 41: 49-57.
39. Kang EH, Park SB, Kim HI, Kwon YH. Corrosion-related changes on Ti-based orthodontic brackets in acetic NaF solutions: surface morphology, microhardness, and element release. *Dent Mater J.* 2008; 27: 555-60.

40. Kononen MH, Lavonius ET, Kivilahti JK. SEM observations on stress corrosion cracking of commercially pure titanium in a topical fluoride solution. *Dent Mater.* 1995; 11: 269-72.
41. Lautenschlager EP, Monaghan P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J.* 1993; 43: 245-53.
42. Leong D, Chai J, Lautenschlager E, Gilbert J. Marginal fit of machine-milled titanium and cast titanium single crowns. *Int J Prosthodont.* 1994; 7: 440-7.
43. Lindholm-Sethson B, Ardlin BI. Effects of pH and fluoride concentration on the corrosion of titanium. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86: 149-59.
44. Mabileau G, Bourdon S, Joly-Guillou ML, Filmon R, Basle MF, Chappard D. Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater.* 2006; 2: 121-9.
45. Matono Y, Nakagawa M, Matsuya S, Ishikawa K, Terada Y. Corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys in various concentrations of Acidulated Phosphate Fluoride (APF) solutions. *Dent Mater J.* 2006; 25: 104-12.
46. Molina C, Nogues L, Martinez-Gomis J, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, et al. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes of various abrasivities. Part II: corrosion and ion release. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 3015-9.
47. Morgan TD, Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microb.* 2001; 91: 47-53.

48. Mori T, Togaya T, Jean-Louis M, Yabugami M. Titanium for removable dentures. I. Laboratory procedures. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 338-41.
49. Muguruma T, Iijima M, Brantley WA, Yuasa T, Kyung HM, Mizoguchi I. Effects of sodium fluoride mouth rinses on the torsional properties of miniscrew implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011; 139: 588-93.
50. Nakagawa M, Matsuya S, Udoh K. Corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys in fluoride-containing solutions. *Dent Mater J.* 2001; 20: 305-14.
51. Nakagawa M, Matsuya S, Udoh K. Effects of fluoride and dissolved oxygen concentrations on the corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys. *Dent Mater J.* 2002; 21: 83-92.
52. Nakagawa M, Matsuya S, Shiraishi T, Ohta M. Effect of fluoride concentration and pH on corrosion behavior of titanium for dental use. *J Dent Res.* 1999; 78: 1568-72.
53. Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989; 4: 321-6.
54. Nogues L, Martinez-Gomis J, Molina C, Peraire M, Salsench J, Sevilla P, et al. Dental casting alloys behaviour during power toothbrushing with toothpastes with various abrasivities. Part I: wear behavior. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 3041-8.
55. O'Mahony A, MacNeill SR, Cobb CM. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. *Quintessence Int.* 2000; 31: 249-56.

56. Oh TJ, Yoon J, Misch CE, Wang HL. The causes of early implant bone loss: myth or science? *J Periodontol.* 2002; 73: 322-33.
57. Ortorp A, Linden B, Jemt T. Clinical experiences with laser-welded titanium frameworks supported by implants in the edentulous mandible: a 5-year follow-up study. *Int J Prosthodont.* 1999; 12: 65-72.
58. Poondla N, Srivatsan TS, Patnaik A, Petraroli A. A study of the microstructure and hardness of two titanium alloys: Commercially pure and Ti-6Al-4V. *J Alloys Compounds.* 2009; 468: 162-7.
59. Popa MV, Vasilescu E, Drob P, Vasilescu C, Demetrescu I, Ionita D. Long-term assessment of the implant titanium material--artificial saliva interface. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 1-9.
60. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 1-14.
61. Quirynen M, Bollen CM, Papaioannou W, Van Eldere J, van Steenberghe D. The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11: 169-78.
62. 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: 1304-9.

63. Rasperini G, Maglione M, Cocconcelli P, Simion M. In vivo early plaque formation on pure titanium and ceramic abutments: a comparative microbiological and SEM analysis. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9: 357-64.
64. Reclaru L, Meyer JM. Effects of fluorides on titanium and other dental alloys in dentistry. *Biomaterials.* 1998; 19: 85-92.
65. 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: 556-62.
66. Rocha SS, Bernardi ACA, Pizzolitto AC, Adabo GL, Pizzolitto EL. Streptococcus mutans attachment on a cast titanium surface. *Mater Res.* 2009; 12: 41-4.
67. Sakairi M, Miyata H, Kikuchi K, Takahashi H. Effect of potential, temperature, and fluoride ions on the repassivation kinetics of titanium in phosphate buffered saline solution with the photon rupture method. *Laser Chem.* 2009; 2009: 1-5.
68. Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, da Silva LA, da Silva RA, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiol Res.* 2011; 166: 63-7.
69. Sartori R, Correa CB, Marcantonio E, Jr., Vaz LG. Influence of a fluoridated medium with different pHs on commercially pure titanium-based implants. *J Prosthodont.* 2009; 18: 130-4.
70. Scarano A, Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol.* 2004; 75: 292-6.

71. Scarano A, Piattelli A, Polimeni A, Di Iorio D, Carinci F. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and anatase-coated titanium healing screws: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2010; 81: 1466-71.
72. Shemesh M, Tam A, Aharoni R, Steinberg D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 51.
73. Siirila HS, Kononen M. The effect of oral topical fluorides on the surface of commercially pure titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991; 6: 50-4.
74. Sivakumar B, Kumar S, Narayanan TSNS. Fretting corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions. *Wear*. 2011; 270: 317-324.
75. Souza JC, Henriques M, Oliveira R, Teughels W, Celis JP, Rocha LA. Do oral biofilms influence the wear and corrosion behavior of titanium? *Biofouling*. 2010; 26: 471-8.
76. Stajer A, Ungvari K, Pelsoczi IK, Polyanka H, Oszko A, Mihalik E, et al. Corrosive effects of fluoride on titanium: investigation by X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, and human epithelial cell culturing. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 87: 450-8.
77. Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent*. 2002; 30: 47-51.
78. Strietzel R, Hosch A, Kalbfleisch H, Buch D. In vitro corrosion of titanium. *Biomaterials*. 1998; 19: 1495-9.
79. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24: 616-26.

80. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 (Suppl 2): 68-81.
81. Thomas CJ, Lechner S, Mori T. Titanium for removable dentures. II. Two-year clinical observations. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 414-8.
82. Toniollo MB, Tiozzi R, Macedo AP, Rodrigues RC, Ribeiro RF, Mattos Mda G. Effect of fluoride-containing solutions on the surface of cast commercially pure titanium. *Braz Dent J.* 2009; 20: 201-4.
83. Toumelin-Chemla F, Rouelle F, Burdairon G. Corrosive properties of fluoride-containing odontologic gels against titanium. *J Dent.* 1996; 24: 109-15.
84. Truong VK, Lapovok R, Estrin YS, Rundell S, Wang JY, Fluke CJ, et al. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials.* 2010; 31: 3674-83.
85. Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Kallestal C, Lagerlof F, et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontol Scand.* 2003; 61: 347-55.
86. Valois CR, Silva LP, Azevedo RB. Multiple autoclave cycles affect the surface of rotary nickel-titanium files: an atomic force microscopy study. *J Endod.* 2008; 34: 859-62.
87. Walter M, Marre B, Eckelt U. Prospective study on titanium bar-retained overdentures: 2-year results. *Clin Oral Implants Res.* 2000; 11: 361-9.
88. Walter M, Reppel PD, Boning K, Freesmeyer WB. Six-year follow-up of titanium and high-gold porcelain-fused-to-metal fixed partial dentures. *J Oral Rehabil.* 1999; 26: 91-6.

89. Wang RR, Boyle AM. A simple method for inspection of porosity in titanium castings. *J Prosthet Dent.* 1993; 70: 275-6.
90. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int.* 1996; 27: 401-8.
91. Watanabe I, Watanabe E. Surface changes induced by fluoride prophylactic agents on titanium-based orthodontic wires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003; 123: 653-6.
92. Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LR, Ambrosano GM. Brushing effect of abrasive dentifrices during at-home bleaching with 10% carbamide peroxide on enamel surface roughness. *J Contemp Dent Pract.* 2006; 7: 25-34.
93. Worschech CC, Rodrigues JA, Martins LR, Ambrosano GM. In vitro evaluation of human dental enamel surface roughness bleached with 35% carbamide peroxide and submitted to abrasive dentifrice brushing. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17: 342-8.
94. Xu J, Ding G, Li J, Yang S, Fang B, Sun H, et al. Zinc ion implanted and deposited titanium surfaces adhesion of *Streptococcus mutans*. *Appl Surface Sci.* 2010; 256: 7540-4.

9 Apêndice

Apêndice 1

Resultados de rugosidade média (Ra) referentes a cada corpo-de-prova de Ti-6Al-4V avaliados neste estudo.

Tabela A1 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo IA (imersão com água destilada)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 2,00 | 1,93 |
| 2 | 2,10 | 1,70 |
| 3 | 1,43 | 1,77 |
| 4 | 1,80 | 2,07 |
| 5 | 1,80 | 2,33 |
| 6 | 1,60 | 2,23 |
| Média | 1,79 | 2,01 |
| Desvio-padrão | 0,25 | 0,25 |
| Coefficiente de variação | 14% | 13% |

Tabela A2 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo ID (imersão com água destilada + dentifrício não-fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 1,70 | 1,90 |
| 2 | 1,46 | 1,83 |
| 3 | 1,60 | 1,53 |
| 4 | 1,60 | 1,56 |
| 5 | 1,50 | 1,63 |
| 6 | 1,80 | 2,00 |
| Média | 1,61 | 1,74 |
| Desvio-padrão | 0,13 | 0,19 |
| Coefficiente de variação | 8% | 11% |

Tabela A3 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo IDF (imersão com água destilada + dentífrico fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 1,40 | 1,63 |
| 2 | 2,40 | 2,16 |
| 3 | 2,00 | 2,02 |
| 4 | 1,80 | 2,27 |
| 5 | 1,60 | 2,50 |
| 6 | 2,30 | 3,13 |
| Média | 1,92 | 2,29 |
| Desvio-padrão | 0,39 | 0,51 |
| Coefficiente de variação | 20% | 22% |

Tabela A4 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo EA (escovação com água destilada)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 3,10 | 2,12 |
| 2 | 1,80 | 1,67 |
| 3 | 1,27 | 1,87 |
| 4 | 1,70 | 1,85 |
| 5 | 1,50 | 2,87 |
| 6 | 2,63 | 1,90 |
| Média | 2,00 | 2,05 |
| Desvio-padrão | 0,71 | 0,43 |
| Coefficiente de variação | 35% | 21% |

Tabela A5 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo ED (escovação com água destilada + dentifrício não-fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 1,40 | 12,57 |
| 2 | 2,10 | 10,63 |
| 3 | 4,00 | 11,73 |
| 4 | 2,20 | 14,60 |
| 5 | 2,20 | 9,00 |
| 6 | 2,30 | 8,47 |
| Média | 2,37 | 11,17 |
| Desvio-padrão | 0,86 | 2,29 |
| Coefficiente de variação | 37% | 21% |

Tabela A6 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo EDF (escovação com água destilada + dentífrico fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 2,83 | 18,07 |
| 2 | 1,64 | 14,77 |
| 3 | 1,50 | 12,97 |
| 4 | 1,90 | 15,80 |
| 5 | 1,60 | 15,93 |
| 6 | 1,50 | 16,87 |
| Média | 1,83 | 15,73 |
| Desvio-padrão | 0,51 | 1,75 |
| Coefficiente de variação | 28% | 11% |

Apêndice 2

Resultados da contagem de *S. mutans* referentes a cada corpo-de-prova de Ti-6Al-4V avaliados neste estudo.

Tabela A7 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo IA (imersão em água destilada) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 92 | 100 | 105 | 99 | 3,96E+07 | 7,598 |
| 2 | 30 | 36 | 33 | 33 | 1,32E+07 | 7,121 |
| 3 | 36 | 131 | 137 | 101 | 4,05E+06 | 6,608 |
| 4 | 85 | 62 | 103 | 83 | 3,33E+07 | 7,523 |
| 5 | 32 | 30 | 31 | 31 | 1,24E+05 | 5,093 |
| 6 | 34 | 41 | 31 | 35 | 1,41E+07 | 7,150 |

Tabela A8 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo ID (imersão em água destilada + dentifrício não-fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|-----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 42 | 33 | 34 | 36 | 1,45E+07 | 7,162 |
| 2 | 80 | 80 | 80 | 80 | 3,20E+06 | 6,505 |
| 3 | 35 | 27 | 18 | 27 | 1,07E+07 | 7,028 |
| 4 | 131 | 121 | 137 | 130 | 5,19E+07 | 7,715 |
| 5 | 100 | 102 | 113 | 105 | 4,120E+05 | 5,623 |
| 6 | 42 | 44 | 49 | 45 | 1,80E+07 | 7,260 |

Tabela A9 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo IDF (imersão em água destilada + dentifrício fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 153 | 162 | 175 | 163 | 6,53E+07 | 7,815 |
| 2 | 72 | 69 | 74 | 71 | 2,87E+06 | 6,457 |
| 3 | 25 | 20 | 27 | 24 | 9,60E+05 | 5,982 |
| 4 | 106 | 128 | 172 | 135 | 5,41E+06 | 6,733 |
| 5 | 137 | 124 | 130 | 130 | 5,21E+06 | 6,718 |
| 6 | 48 | 52 | 46 | 49 | 1,96E+07 | 7,292 |

Tabela A10 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo EA (escovação com água destilada) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 62 | 46 | 68 | 59 | 2,35E+06 | 6,370 |
| 2 | 30 | 35 | 44 | 36 | 1,45E+06 | 6,162 |
| 3 | 39 | 39 | 33 | 34 | 1,36E+07 | 7,134 |
| 4 | 43 | 55 | 51 | 50 | 1,99E+07 | 7,298 |
| 5 | 67 | 58 | 51 | 59 | 2,35E+07 | 7,370 |
| 6 | 95 | 100 | 101 | 99 | 3,95E+07 | 7,599 |

Tabela A11 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo ED (escovação com água destilada + dentifrício não-fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 118 | 132 | 107 | 119 | 4,76E+06 | 6,678 |
| 2 | 33 | 39 | 42 | 38 | 2,11E+07 | 7,181 |
| 3 | 199 | 197 | 190 | 195 | 7,81E+07 | 7,990 |
| 4 | 31 | 30 | 31 | 30 | 1,23E+07 | 7,089 |
| 5 | 74 | 71 | 54 | 66 | 2,65E+07 | 7,424 |
| 6 | 55 | 46 | 57 | 53 | 2,11E+07 | 7,324 |

Tabela A12 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo EDF (escovação com água destilada + dentifrício fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 62 | 46 | 68 | 59 | 3,25E+06 | 7,363 |
| 2 | 30 | 35 | 44 | 36 | 1,45E+06 | 6,629 |
| 3 | 39 | 30 | 33 | 34 | 1,36E+07 | 7,708 |
| 4 | 43 | 55 | 51 | 50 | 1,99E+07 | 7,326 |
| 5 | 67 | 58 | 51 | 59 | 2,35E+07 | 7,391 |
| 6 | 95 | 100 | 101 | 99 | 3,95E+07 | 6,377 |

Apêndice 3

Resultados de rugosidade média (Ra) referentes a cada corpo-de-prova de Ti cp avaliados neste estudo.

Tabela A13 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo IA (imersão com água destilada)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 1,60 | 2,17 |
| 2 | 2,35 | 2,60 |
| 3 | 2,50 | 2,23 |
| 4 | 2,19 | 2,45 |
| 5 | 1,90 | 2,17 |
| 6 | 3,20 | 2,39 |
| Média | 2,29 | 2,33 |
| Desvio-padrão | 0,55 | 0,17 |
| Coefficiente de variação | 24% | 7% |

Tabela A14 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo ID (imersão com água destilada + dentifrício não-fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 2,90 | 2,67 |
| 2 | 2,24 | 2,23 |
| 3 | 2,18 | 2,03 |
| 4 | 1,80 | 1,73 |
| 5 | 1,70 | 1,70 |
| 6 | 2,60 | 1,77 |
| Média | 2,24 | 2,02 |
| Desvio-padrão | 0,46 | 0,38 |
| Coefficiente de variação | 21% | 19% |

Tabela A15 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo IDF (imersão com água destilada + dentífrico fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 3,10 | 1,83 |
| 2 | 1,64 | 1,69 |
| 3 | 1,90 | 1,57 |
| 4 | 2,20 | 1,98 |
| 5 | 2,54 | 2,61 |
| 6 | 1,91 | 2,01 |
| Média | 2,22 | 1,95 |
| Desvio-padrão | 0,53 | 0,36 |
| Coefficiente de variação | 24% | 19% |

Tabela A16 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo EA (escovação com água destilada)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 2,20 | 4,76 |
| 2 | 1,78 | 3,03 |
| 3 | 2,62 | 4,03 |
| 4 | 2,30 | 3,73 |
| 5 | 2,79 | 3,83 |
| 6 | 1,70 | 3,53 |
| Média | 2,22 | 3,76 |
| Desvio-padrão | 0,42 | 0,45 |
| Coefficiente de variação | 19% | 12% |

Tabela A17 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo ED (escovação com água destilada + dentifrício não-fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 2,30 | 16,80 |
| 2 | 2,52 | 9,73 |
| 3 | 2,07 | 16,63 |
| 4 | 1,90 | 16,63 |
| 5 | 1,62 | 19,27 |
| 6 | 3,20 | 17,23 |
| Média | 2,27 | 16,05 |
| Desvio-padrão | 0,55 | 3,25 |
| Coefficiente de variação | 24% | 20% |

Tabela A18 – Rugosidade média (Ra), em nanômetros, referentes aos corpos-de-prova do Grupo L, subgrupo EDF (escovação com água destilada + dentifrício fluoretado)

| Amostra | Ra | |
|---------------------------------|----------------|----------------|
| | Pré-tratamento | Pós-tratamento |
| 1 | 3,10 | 15,23 |
| 2 | 2,30 | 27,15 |
| 3 | 2,02 | 27,90 |
| 4 | 1,90 | 22,03 |
| 5 | 2,60 | 17,80 |
| 6 | 1,70 | 24,20 |
| Média | 2,27 | 22,39 |
| Desvio-padrão | 0,51 | 5,07 |
| Coefficiente de variação | 23% | 23% |

Apêndice 4

Resultados da contagem de *S. mutans* referentes a cada corpo-de-prova de Ti cp avaliados neste estudo.

Tabela A19 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo IA (imersão em água destilada) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 24 | 35 | 38 | 32 | 1,29E+07 | 7,112 |
| 2 | 32 | 35 | 33 | 33 | 1,34E+07 | 7,127 |
| 3 | 154 | 147 | 141 | 147 | 5,89E+07 | 7,770 |
| 4 | 44 | 36 | 30 | 37 | 1,47E+07 | 7,166 |
| 5 | 157 | 158 | 153 | 154 | 6,16E+07 | 7,784 |
| 6 | 162 | 147 | 153 | 154 | 6,16E+07 | 7,790 |

Tabela A20 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo ID
(imersão em água destilada + dentifrício não-fluoretado)
após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|-----------------|-----------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 54 | 56 | 60 | 57 | 2,28E+06 | 6,358 |
| 2 | 210 | 211 | 210 | 210 | 8,41E+07 | 7,925 |
| 3 | 41 | 47 | 31 | 40 | 1,59E+07 | 7,200 |
| 4 | 180 | 165 | 156 | 167 | 6,68E+06 | 6,825 |
| 5 | 87 | 87 | 93 | 89 | 3,56E+06 | 6,551 |
| 6 | 110 | 112 | 108 | 110 | 4,40E+07 | 7,643 |

Tabela A21 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo IDF (imersão em água destilada + dentífrico fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 54 | 48 | 32 | 45 | 1,79E+07 | 7,252 |
| 2 | 95 | 88 | 80 | 88 | 3,51E+06 | 6,545 |
| 3 | 55 | 51 | 51 | 52 | 2,09E+07 | 7,321 |
| 4 | 80 | 93 | 79 | 84 | 3,36E+06 | 6,526 |
| 5 | 211 | 158 | 141 | 170 | 6,80E+06 | 7,832 |
| 6 | 47 | 50 | 39 | 45 | 1,81E+06 | 6,259 |

Tabela A22 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo EA (escovação com água destilada) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 174 | 175 | 170 | 173 | 6,92E+07 | 7,840 |
| 2 | 49 | 53 | 57 | 53 | 2,12E+07 | 7,326 |
| 3 | 100 | 92 | 94 | 95 | 3,81E+06 | 6,581 |
| 4 | 119 | 80 | 88 | 96 | 3,83E+06 | 6,583 |
| 5 | 105 | 151 | 119 | 125 | 5,00E+06 | 6,699 |
| 6 | 101 | 131 | 124 | 118 | 4,74E+07 | 7,676 |

Tabela A23 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo ED (escovação com água destilada + dentífrico não-fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 32 | 31 | 30 | 31 | 1,24E+07 | 7,093 |
| 2 | 38 | 40 | 47 | 42 | 1,67E+07 | 7,222 |
| 3 | 34 | 33 | 32 | 33 | 1,32E+07 | 7,121 |
| 4 | 94 | 80 | 74 | 83 | 3,31E+07 | 7,519 |
| 5 | 97 | 100 | 87 | 95 | 3,79E+07 | 7,578 |
| 6 | 49 | 64 | 68 | 60 | 2,41E+07 | 7,383 |

Tabela A24 - Valores originais obtidos em cada triplicata do subgrupo EDF (escovação com água destilada + dentifrício fluoretado) após 48 horas da semeadura em placas de SB-20

| Amostra | Número de colônias viáveis | | | Média | UFC/mL | Log ₁₀ |
|---------|----------------------------|--------------|--------------|-------|----------|-------------------|
| | Triplicata 1 | Triplicata 2 | Triplicata 3 | | | |
| 1 | 144 | 148 | 152 | 148 | 5,92E+07 | 7,772 |
| 2 | 41 | 35 | 38 | 38 | 1,52E+07 | 7,182 |
| 3 | 99 | 90 | 97 | 95 | 3,81E+06 | 6,581 |
| 4 | 36 | 32 | 34 | 34 | 1,36E+07 | 7,134 |
| 5 | 23 | 28 | 32 | 28 | 1,11E+06 | 6,044 |
| 6 | 93 | 86 | 86 | 88 | 3,53E+07 | 7,548 |

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 22 de julho de 2011.

LAIZA MARIA GRASSI FAIS