



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**PATRICIA MILAGROS MAQUERA HUACHO**

**CARBONO TIPO DIAMANTE EM COMPONENTES DE  
IMPLANTES DENTÁRIOS: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ANTIMICROBIANAS E DE ADESÃO DE *ESCHERICHIA COLI***

**Araraquara**

**2014**





**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**PATRICIA MILAGROS MAQUERA HUACHO**

**CARBONO TIPO DIAMANTE EM COMPONENTES DE  
IMPLANTES DENTÁRIOS: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES  
ANTIMICROBIANAS E DE ADESÃO DE *ESCHERICHIA COLI***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia-Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Odontologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Denise M.  
Palomari Spolidorio

**Araraquara**

**2014**

Maquera Huacho, Patricia Milagros.

Carbono tipo diamante em componentes de implantes dentários:  
Avaliação das propriedades antimicrobianas e de adesão de *Escherichia coli* / Patricia Milagros Maquera Huacho. - Araraquara: [s.n.], 2014.

60 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Prof. Dr. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Implantes dentários 2. *Escherichia coli* 3. Teste de  
compatibilidade 4. Aderência bacteriana 5. Infiltração I.Título

**PATRICIA MILAGROS MAQUERA HUACHO**

**CARBONO TIPO DIAMANTE EM COMPONENTES DE IMPLANTES  
DENTÁRIOS: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E DE  
ADESÃO DE *ESCHERICHIA COLI***

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de título de Mestre em Odontologia

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

2º Examinador: Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz

3º Examinador: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 13 de Março de 2014

## **DADOS CURRICULARES**

### **PATRICIA MILAGROS MAQUERA HUACHO**

<b>NASCIMENTO</b>	06 de Dezembro de 1986-Moquegua/Perú
<b>FILIAÇÃO</b>	Brablio Gregorio Maquera Ventura Elsa Dora Huacho de Maquera
<b>2004-2008</b>	Graduação em Odontologia Universidad Católica de Santa María-Arequipa/Perú
<b>2011-2013</b>	Especialização em Implantodontia Fundação Baurense de Estudos Odontológicos Faculdade de Odontologia de Bauru-USP
<b>2012-2014</b>	Pós-graduação em Periodontia-Nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara Universidade Estadual Paulista-UNESP



# *Dedicatória*

## **Dedicatória**

### ***Á Deus***

Sempre presente em meu coração e que guia os meus caminhos e sonhos, por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, guiando-me por caminhos desafiadores, porém seguros; por ser meu refugio e fortaleza, socorro bem presente na angústia, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar.

*“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 Bráulio e Elsa***

Que com dedicação infinita e amor incondicional são os principais incentivadores e exemplos da minha vida, a pesar de me terem longe de casa e da saudade, sempre me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para fazer tudo que estava ao seu alcance, tornando esse sonho real mesmo que muitas vezes deixassem de realizar os seus próprios. Minha eterna gratidão. Amo vocês!.

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”.*

**Roberto Shinyashiki**

### ***Aos meus irmãos Walter e Daniel***

Mesmo com a distância, sempre presentes em todas as conquistas de minha vida. Obrigada pelo amor, amizade, apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada, Amo vocês!

# *Agradecimientos*



## **Agradecimentos Especiais**

***À minha querida orientadora Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio***

Pelo imenso conhecimento transmitido, por toda a paciência, disponibilidade e, sobretudo pela sua amizade. Minha profunda admiração pelo excelente exemplo de dedicação e profissionalismo, por acreditar em mim, pelo entusiasmo, motivação e me mostrar o caminho da ciência. Serei eternamente grata por ter compreendido minhas limitações físicas, emocionais e intelectuais durante esse período.

*“O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos.”*

**Oliver Wendell Holmes**

***Aos minhas queridas amigas do coração: Nicole N., Ester B., Renata F., Caroline T. Telma B., Ju Pirola, Aline, Marina G., Juliana F.***

Aos que conheci no transcurso da minha estadia aqui em Araraquara, mas que já moram no meu coração, agradeço por dividirem comigo momentos difíceis e outros tantos agradáveis. Por me receber tão bem, pela paciência, ajuda e participação neste trabalho. Aos que estão mais perto agradeço o convívio diário, carinho, confiança e principalmente a enorme amizade. Obrigada por tudo!, as lembranças jamais se apagarão. Amo em especial todos vocês!.

*“A melhor parte da vida de uma pessoa está nas suas amizades.”*

**Abraham Lincoln**

***Aos meus queridos amigos Krystel S., Grace R., Joel P., Karin A.***

Além da distancia, sempre presentes me apoiando e incentivando. Pela enorme amizade, conselhos e sobre tudo pelas palavras de incentivo nos meus momentos de fraqueza. Obrigada por fazer parte da minha vida. Adoro vocês!

*“A amizade é como a sombra na tarde - cresce até com o ocaso da vida.”*

**Jean de La Fontaine**

## **Agradecimentos**

*Ao coordenador do curso de Pós Graduação – Área de Periodontia: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior:* Por ter me recebido de portas abertas, e me dado a oportunidade de formar parte desta grande equipe e ter acreditado em mim.

*Às empresas; Dentoflex Comércio e Industria de Materiais Odontológicos, CVDVale e ao Centro de Tecnologia das Radiações – CTR / IPEN-CNEN/SP:* Pela colaboração e doação do material necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

*Aos amigos e professores que colaboraram de alguma forma com este trabalho Prof. Dr. Elcio Marcantonio Júnior, Prof. Dr. Luis Geraldo Vaz, Profª. Dra. Janaina Sardi, Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, Nicole N., Tony C., Ju Pirola, Erica D., Fernanda B., Ana Paula T., Renata F., Ester B., Caroline T., Haline C., Marília F.:* Muito Obrigada pelos ensinamentos, paciência, colaboração e acima de tudo amizade.

*À Profª Dra. Linda Wang,* pela colaboração para o desenvolvimento desta pesquisa, paciência e ter me recebido gentilmente no Laboratório de Pesquisas do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

*Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior,* pela colaboração com o desenvolvimento desta pesquisa, conhecimento transmitido, paciência e ter me recebido gentilmente de portas abertas no Laboratório Materiais Magnéticos e Coloides do Departamento de Físico Química, Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP.

*A todos os docentes do curso de Pós Graduação – Área de Periodontia Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli , Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio, Dr Elcio Marcantonio Junior, Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dr. Carlos Rossa Junior, Dr. Joni Augusto Cirelli, Dra Silvana R. P. Orico, Dr. Luís Carlos Spolidorio, Dra. Daniela Leal Zandim-Barcellos:* Pela excelente formação e competência.

*A TODOS (sem distinção) companheiros de pós-graduação:* Pela amizade, momentos agradáveis e alegres de convivência.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP na pessoa da Ilma diretora ***Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon.***

A todos os funcionários dos Departamentos de Diagnóstico e Cirurgia, e Fisiologia e Patologia, pelo carinho paciência e amizade.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara e em especial aos funcionários da biblioteca e da seção de pós graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo apoio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

**Theodore Roosevelt**

Maquera Huacho PM. Carbono tipo Diamante em componentes de implantes dentários: Avaliação das propriedades antimicrobianas e de adesão de *Escherichia coli* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014

## **RESUMO**

O estudo de filmes de Carbono tipo Diamante é objeto de pesquisas devido às suas diferentes propriedades incluindo propriedades antibacterianas. No tratamento reabilitador com implantes, podem ocorrer complicações, proporcionando a infiltração de microrganismos orais para a interface Implante-Componente protético. O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades de molhabilidade e energia livre de superfície a partir dos valores do ângulo de contato; propriedades antimicrobiana, de bioadesão e citotoxicidade de discos de titânio recobertos com DLC. *Escherichia coli* foi mantida em meio BHI a 37°C por 3 h e 24 h para teste antimicrobiano. Para adesão, os discos foram mantidos em cultura de *E. coli* por 90 minutos a 37°C e 20 minutos em ultrassom. A capacidade de prevenção na migração de bactérias para o interior da interface Implante-Componente protético foi realizado em implantes Hexágono Externo, conectados com torque de 32N e deixados em contato com *E. coli* por 24h, e Reação em Cadeia da Polimerase semi-quantitativo foi realizado para confirmação da esterilidade da técnica. Foram quantificados em UFC/mL em BHI Ágar para o teste antimicrobiano, adesão e infiltração bacteriana. Para citotoxicidade foi utilizado queratinócitos humanos (HaCat) cultivados em meio DMEM mantidos em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e avaliados pelo teste colorimétrico MTT. Os resultados de molhabilidade, teste antimicrobiano, teste de adesão e Infiltração bacteriana não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As superfícies de titânio e recobertas com DLC apresentaram uma leve diminuição na viabilidade celular com diferença estatisticamente significativa ao grupo controle. O DLC apresenta-se como material biocompatível com leve grau de citotoxicidade que não modifica as propriedades de superfície, não apresenta propriedades antimicrobianas, não interfere na adesão bacteriana de *E. coli* e não inibem a infiltração bacteriana na interface implante-componente protético.

**Palavras-chave:** Teste de Compatibilidade, aderência bacteriana, Implantes dentários, Infiltração, *Escherichia coli*

Maquera Huacho PM. Diamond-Like Carbon on dental implants components: Evaluation of antimicrobial and adhesion properties of *Escherichia coli* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014

### **ABSTRACT**

The study of DLC films is the subject of research due to their different properties including antibacterial properties. Rehabilitator in implant treatment, complications may occur, providing the infiltration of oral microorganisms for implant- abutment interface. The aim of this study was to evaluate properties and wetting surface free energy from the values of the contact angle; antimicrobial properties bioadhesion and cytotoxicity of titanium discs coated with DLC. *Escherichia coli* was maintained on BHI at 37 ° C for 3 h and 24 h for antimicrobial test. For adhesion test, the discs were maintained in culture of *E. coli* for 90 minutes at 37 ° C and 20 minutes inside ultrasound. The ability to prevent the migration of bacteria into the implant - abutment interface was performed in dental implants External Hexagon connected with a torque of 32N and left in contact with *E. coli* for 24 h , and Polymerase Chain Reaction semi -quantitative was performed to confirm the sterility of the technique. Were quantified in CFU / ml in BHI agar for antimicrobial test, bacterial adhesion and infiltration. Cytotoxicity was performed using human keratinocytes ( HaCaT ) cultured in DMEM maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 ° C and evaluated by the MTT colorimetric assay. The results of wettability, antimicrobial test, adhesion test and bacterial infiltration showed no statistically significant difference between the test groups. The surfaces of titanium and coated with DLC showed a slight decrease in cell viability with a statistically significant difference to the control group. The DLC is presented as biocompatible material with mild cytotoxicity without changing the surface properties, has no antimicrobial properties, does not interfere with bacterial adherence for *E. coli* and do not inhibit bacterial infiltration into the implant-abutment interface.

**Keywords:** Compatibility test, bacterial adhesion , Dental Implants , Infiltration , *Escherichia coli*.



# ***Lista de Abreviaturas***

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain heart infusion
CVD	Chemical Vapor Deposition
DLC	Diamond Like Carbon
DLC-PTFE-h	Diamond Like Carbon -híbrido politetrafluoretileno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
FCVA	Filtered Cathodic Vacuum arc
GLC	Grafite Carbono
IBAD	Ion Beam-Assisted Deposition
kGy	Quilogray
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition
PLC	Polímero Carbono
PLD	Pulsed Laser Deposition
PVD	Physical Vapor Deposition – magnetron sputtering
Ra	Rugosidade Média
Ticp	Titânio comercialmente puro
UFC	Unidade Formadora de colônias

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	PROPOSIÇÃO .....	23
3	MATERIAL E MÉTODO .....	25
4	RESULTADO .....	37
5	DISCUSSÃO .....	46
6	CONCLUSÃO .....	52
	REFERÊNCIAS .....	54

# **Introdução**



## 1 INTRODUÇÃO

Uma nova variedade de carbono com características semelhantes ao diamante foi avaliada por Aisenberg, Chabot<sup>1</sup> (1971). Este material foi denominado Carbono amorfo ou Carbono tipo diamante (DLC-Diamond Like Carbon) e possui características de material amorfo onde os átomos encontram-se unido por enlaces tipo diamante ou tipo grafite. Filmes de carbono amorfo são materiais nanoestruturados depositados como filmes finos que consistem de átomos de carbono hibridizado  $sp^2$ , agrupado dentro de um tamanho típico de alguns nanômetros e ligados entre eles por átomos de carbono hibridizado  $sp^3$ . Dependendo da fração do  $sp^2$  para o  $sp^3$  de átomos de carbono hibridizadas, os filmes podem ser citados como de carbono tipo diamante (DLC) , grafite Carbono (GLC) ou quando altamente hidrogenados como polímero Carbono (PLC). A diferença fundamental entre grafite carbono e carbono tipo diamante é a quantidade de átomos de carbono  $sp^3$  hibridizado, que é muito baixa no primeiro grupo e acima de 40-50% para carbono tipo diamante. Isto leva à elevadas diferenças em muitas das propriedades físicas, tais como, a condutividade e a energia de superfície (Robertson<sup>49</sup>, 2002).

Existem várias técnicas utilizadas na produção de Carbono tipo diamante, entre as quais se realçam pela sua utilização as seguintes: pulverização por feixe de íons e/ou deposição assistida por feixe de íons (IBAD- “Ion Beam-Assisted Deposition”), pulverização catódica por magnetron (PVD- “Physical Vapor Deposition – magnetron sputtering”), deposição química em fase de vapor (CVD- “Chemical Vapor Deposition”) ou reforçada com plasma (PECVD- “Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition”), galvanização iônica (“ion plating”), deposição por feixes iônicos por seleção de massas (MSIB- “Mass selected ion beam”), arco catódico filtrado em vácuo (FCVA- “Filtered Cathodic Vacuum arc”) e deposição por laser pulsado (PLD- “Pulsed Laser Deposition”) (Roy, Lee<sup>48</sup> 2007).

O Carbono tipo diamante tem sido base de diversos estudos devido à suas diferentes propriedades mecânicas, físicas e químicas assim como sua vasta área de aplicação na eletrônica, indústria química, mecânica e bioengenharia (Robertson<sup>49</sup>, 2002; Trava-Airoldi et al.<sup>57</sup>, 2007). Filmes finos de Carbono tipo diamante são biocompatíveis, apresentam atividade antibacteriana e antifúngica e podem ser modificados pela adição de nanopartículas de diferentes elementos químicos em sua microestrutura (Marciano et al.<sup>40</sup>, 2011; Wachesk et al.<sup>59</sup>, 2013, Trava-Airoldi et al.<sup>57</sup>, 2007).

O Carbono tipo diamante apresenta importantes propriedades antibacterianas. Filmes de Carbono tipo diamante sem adição de nenhuma partícula podem erradicar cerca de 89,5% de bactérias (Mangolim et al.<sup>34</sup>, 2011). Substratos de aço inoxidável recobertos com filmes de DLC apresentam atividade antibacteriana de cerca de 30% contra *Escherichia coli* (Marciano et al.<sup>36</sup>, 2009a). Quando associados a diferentes partículas, como prata ou cobre, apresentam 93% de ação antimicrobiana, o que evidenciam a aplicabilidade para tratamentos de superfícies (Lan et al.<sup>31</sup>, 2013; Chan et al.<sup>15</sup>, 2011). Para potencializar a ação antimicrobiana, Ishihara et al.<sup>25</sup> (2006) adicionaram nano partículas de flúor sobre filmes de Carbono tipo diamante os quais foram testados sobre *Escherichia coli* resultando na redução bacteriana de 40% a 56%. Da mesma maneira, Marciano et al.<sup>39</sup> (2010) e Marciano et al.<sup>37</sup> (2009) demonstraram que o aumento da incorporação de partículas de flúor aumenta a atividade bacteriana enquanto a adesão é reduzida. A incorporação de nanopartículas pode melhorar a propriedade antimicrobiana do Carbono tipo diamante, podendo melhorar também o tempo de ação, diminuindo aproximadamente 50% das bactérias após 3 horas e 95% após 24 horas (Marciano et al.<sup>38</sup>, 2009c).

Filmes de Carbono tipo diamante são considerados excelentes candidatos para aplicações biomédicas. A superfície lisa desses filmes é vantajosa para a aplicação biológica e a inércia química do material permite um tempo de vida longo no meio biológico. Duas aplicações potenciais dos filmes finos de Carbono tipo diamante no campo biomédico são: Revestimento da superfície dos implantes e tratamento superficial de ferramentas biomédicas ou aparelhos que modificam as superfícies, dando propriedades superficiais diferentes do Carbono tipo diamante e dos materiais do substrato (Yin et al.<sup>62</sup>, 2008).

Alguns trabalhos na literatura mostram a biocompatibilidade do Carbono tipo diamante devido a sua composição de apenas carbono e hidrogênio, que são biologicamente compatíveis com células humanas (Robertson<sup>49</sup>, 2002; Venâncio<sup>58</sup>, 2005; Hasebe et al.<sup>23</sup>, 2007; Trava-Airoldi et al.<sup>57</sup>, 2007). Chai et al.<sup>13</sup> (2008) avaliaram a interação de osteoblastos sobre substratos revestidos de Sílica e Carbono tipo diamante tratados sob diferentes condições. Testes biológicos foram realizados para medir a proliferação, viabilidade, morfologia e adesão celular. As superfícies testadas apresentaram melhores taxas de proliferação celular quando comparadas a superfícies de Sílica pura, além de apresentar ótimo comportamento celular. Calzado-Martín et al.<sup>12</sup> (2010) demonstraram que células osteoblásticas humanas proliferam quando cultivadas em contato com substratos de Carbono tipo diamante e DLC-PTFE-h (Carbono tipo diamante -híbrido politetrafluoretileno).

A incorporação de nanopartículas de Dióxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ ) sobre películas de Carbono tipo diamante aumenta a viabilidade celular quando aumentada a concentração de  $\text{TiO}_2$ . Fatores como o aumento da rugosidade da superfície, diminuição do ângulo de contato de água e aumento da energia superficial podem ser responsáveis por este processo. O aumento da concentração de  $\text{TiO}_2$  também favorece o aumento da proliferação celular evidenciado por meio do aumento de número de projeções, o que indica maior adesão celular (Marciano et al.<sup>40</sup>, 2011; Wachesk et al.<sup>59</sup>, 2013). Assim também filmes de Carbono tipo diamante em amostras de Titânio não apresentam redução de biocompatibilidade quando comparadas com Titânio comercialmente puro (Ti cp) (Manhabosco et al.<sup>35</sup>, 2013).

Na reabilitação de pacientes total ou parcialmente desdentados, sugere-se a utilização de próteses implantossuportadas, como primeira opção do tratamento (Feitosa<sup>19</sup>, 2007) podendo alcançar altos índices de sucesso (Breeding et al.<sup>9</sup>, 1993). Entretanto problemas, em particular com restaurações unitárias de próteses parafusadas, tem surgido. A falta de adaptação passiva, o desajuste entre a base do implante e o componente protético, a fratura dos componentes protéticos, do próprio implante ou do parafuso do componente protético e o afrouxamento do parafuso, podem ser algumas das possíveis complicações no tratamento reabilitador com implantes (Breeding et al.<sup>9</sup>, 1993; Taylor<sup>56</sup>, 1998).

O afrouxamento do parafuso, além de provocar uma situação inconveniente para o paciente e para o profissional (Binon<sup>6</sup>, 1994; Taylor<sup>56</sup>, 1998), devido a perda de tempo no tratamento e aumento de custo para o paciente, promove a desadaptação do conjunto Implante-Componente protético, podendo ocasionar complicações mecânicas assim como processos inflamatórios no tecido peri-implantar (De Mori<sup>16</sup>, 2005). Essa desadaptação agrava-se com a micromovimentação promovendo a infiltração do fluxo bacteriano nesta interface entre o Implante e o Componente protético, independente do tamanho da interface e do tipo de conexão protética (Steinebrunner et al.<sup>55</sup>, 2005; Passos et al.<sup>44</sup>, 2013) o que poderia ocasionar subsequentemente mucosites e/ou peri-implantites e posteriormente a perda do implante (Broggini et al.<sup>10</sup>, 2006).

O nível de osso em torno dos implantes tem sido utilizado como critério para avaliar o sucesso de implantes dentários (Ricomini Filho et al.<sup>48</sup>, 2010). Tradicionalmente uma perda óssea radiográfica marginal menor que 1,5 mm durante o primeiro ano, seguido por perda óssea radiográfica marginal menor ou igual que 0,2 mm para cada ano sucessivo, é considerado um parâmetro importante para avaliar o sucesso do implante (Albrektsson<sup>2</sup>, 1988). São considerados fatores envolvidos na reabsorção óssea no processo de remodelação

óssea marginal, a localização, forma e tamanho da interface entre Implante-Componente protéticos e a contaminação microbiana (Hermann et al.<sup>24</sup>, 2001; Ericsson et al.<sup>18</sup>, 1995).

Estratégias destinadas a reduzir a adesão bacteriana e formação de biofilmes em superfícies de parafusos são de interesse clínico pertinente e pode ser utilizada para a manutenção da saúde dos tecidos moles ou eventualmente, no tratamento da peri-implantite (Hall-Stoodley et al.<sup>22</sup>, 2004). A relação das características das superfícies de parafusos no comportamento e na formação do biofilme ainda não está bem definida. Dentre estas características, a energia livre das superfícies e a rugosidade das superfícies dos materiais merecem destaque. Assim, superfícies de implantes de titânio que são muito lisas impedem a fixação dos osteoblastos. Por outro lado, a rugosidade elevada do substrato promove o acúmulo de biofilme, enquanto os materiais polidos limitam a formação do biofilme inicial in vivo. Neste contexto, um valor da rugosidade média de 0,2  $\mu\text{m}$  para superfícies de parafusos tem sido aceito como o limiar de rugosidade média, abaixo do qual nenhuma redução adicional de acúmulo de bactérias pode ser esperada (Bollen et al.<sup>8</sup>, 1996;. Quirynen et al.<sup>47</sup>, 1996). Estudos observaram diferentes coberturas bacterianas em superfícies com a mesma rugosidade, mas com diferentes morfologias de superfície, concluindo assim que a adesão bacteriana pode ser afetada pela hidrofobicidade da sua superfície celular e pela energia livre de superfície do parafuso de titânio (Scarano et al.<sup>51</sup>, 2004; Barbour et al.<sup>5</sup>, 2007; Araújo et al.<sup>4</sup>, 2010).

A adesão bacteriana está ligada diretamente às interações físico-químicas que ocorrem entre a superfície celular do microrganismo e o substrato. A estabilidade do biofilme bacteriano é obtida por interações Lifshitz-van der Waals, eletrostáticas e ácido-base de Lewis. As biomoléculas da parede celular nas bactérias são as que determinam as propriedades da superfície, porém também determinam a termodinâmica e a dinâmica da adesão bacteriana. Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* apresentam na sua estrutura e composição da membrana, a camada de peptidoglicano fina (10 nm) e a superfície externa que possui uma membrana contendo proteínas, lipolissacarídeos e fosfolipídeos, com característica atípica na distribuição assimétrica dos lipídeos sobre a membrana externa e interna (lipolissacarídeos na membrana externa e fosfolipídeos na interna). Assim a presença de lipolissacarídeos na superfície celular de bactérias Gram-negativas torna a bactéria mais hidrofílica e a perda dos mesmos a torna mais hidrofóbica. A termodinâmica da adesão bacteriana é um fator importante para o conhecimento do comportamento bacteriano sobre determinadas superfícies (Araújo et al.<sup>4</sup>, 2010).

Um protocolo de controle de bactérias durante o tratamento com implantes e manutenção é necessário para melhorar a sobrevivência a longo prazo (Paolantonio et al.<sup>43</sup>, 2008). Bactérias alojadas no sistema implante/peri-implante podem também alcançar áreas do interior do implante, devido a fugas na interface Implante-Componente protético (Quirynen, Van Steenberghe<sup>46</sup>, 1993; Scarano et al.<sup>52</sup>, 2005) ou permanecerem aprisionadas durante a instalação do implante (Jansen et al.<sup>26</sup>, 1997) onde os pilares são parafusados (Paolantonio et al.<sup>43</sup>, 2008). A fim de tentar controlar esta infiltração bacteriana, desenvolveram-se estudos com a utilização de Clorexidina aplicado no interior desta interface. Estudos in vivo desenvolvidos por Paolantonio et al.<sup>43</sup> (2008) e in vitro com carregamento cíclico (Koutouzis, et al.<sup>30</sup>, 2013) e sem carregamento cíclico (Silva-Neto, et al.<sup>53</sup>, 2012) não encontraram diferença significativa no efeito sobre a infiltração bacteriana com *Escherichia coli*. (Passos et al.<sup>44</sup>, 2013)

A população bacteriana é frequentemente associada com diferentes tipos de periodontopatógenos (Callan et al.<sup>11</sup>, 2005). Leonhardt et al.<sup>32</sup> (2003) relataram que mais do 50% das lesões peri-implantares apresentavam principalmente microrganismos não associados com a periodontite, tais como espécies de estafilococos, entéricos e espécies de *Candida*. Além disso, três dos nove pacientes tratados por peri-implantite apresentaram bactérias entéricas (*Escherichia coli* e *Escherichia cloacae*).

A avaliação da viabilidade celular é fundamental para determinar a citotoxicidade in vitro de um material a fim de prever reações ao seu uso ou técnicas de tratamento. Queratinócitos da epiderme são linhagens de células apropriadas para testes de compatibilidade cutânea local. As células HaCat são queratinócitos imortalizados e importantes porque formam a primeira camada de células a serem afetadas por substâncias que atingem a mucosa oral. Tendo em vista a possibilidade do uso do DLC aplicado aos componentes dos implantes, torna-se necessário investigar o efeito citotóxico direto desse material sobre células.

Assim, se o DLC fosse aplicado aos componentes dos implantes têm-se a hipótese que ele poderia prevenir a migração de bactérias para a interface Implante-Componente protético, e sendo biocompatível, poderiam contribuir para longevidade e sucesso do tratamento reabilitador com implante.



**Proposição**

## 2 PROPOSIÇÃO

### Objetivo Geral

Avaliar a ação preventiva do Carbono tipo diamante sobre a migração de bactérias para o interior da interface Implante- Componente protético.

### Objetivos Específicos

- a. Avaliar a molhabilidade e energia livre de superfície do recobrimento do Carbono tipo diamante em discos de titânio.
- b. Analisar a capacidade antimicrobiana, bioadesão bacteriana e biocompatibilidade do recobrimento do Carbono tipo diamante em discos de titânio;
- c. Testar a eficácia do método de análise da infiltração de bactérias *E. coli* na interface Implante- Componente protético.



## **Material e Método**

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### **Microrganismos**

Bactéria *Escherichia coli* (ATCC 8739) foi mantida em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C por 3h. Após o crescimento, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e as células lavadas 2 vezes com solução salina estéril. A turbidez do material resultante foi ajustada (Espectrofotômetro -Spectrum, SP-2000 UV), na absorbância 0,3 com comprimento de onda de 600nm para uma solução estoque de  $1,3 \times 10^8$  UFC/ml, sendo posteriormente ajustada para  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml, que foi a concentração utilizada no estudo.

#### **Cultivo Celular**

Para avaliação da biocompatibilidade dos filmes de Carbono tipo diamante, foi utilizada a linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat).

Células HaCat foram cultivadas e mantidas em meio de cultura Dulbecco's Medium (DMEM) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultulab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de penicilina, estreptomicina e glutamina (100 UT/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina e 2mmol/L de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Posteriormente as células foram sub-cultivadas a cada 3 dias em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de cultura de células até atingir a concentração de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

#### **Materiais Testados**

##### **Corpos de Prova**

Discos de titânio e Implantes dentários - Hexágono Externo com seus respectivos componentes protéticos foram cedidos pela empresa Dentoflex Comércio e Indústria de Materiais Odontológicos Ltda., SP, Brasil (Figura 1).

Figura 1- Discos de titânio e Implantes Hexágono Externo com Pilares Protéticos e parafuso



O Carbono tipo diamante recobriu as superfícies dos componentes protéticos dos implantes e dos discos de titânio testados (gentilmente doados pela empresa CVDVale que detém a patente do sistema) (Figura 2).

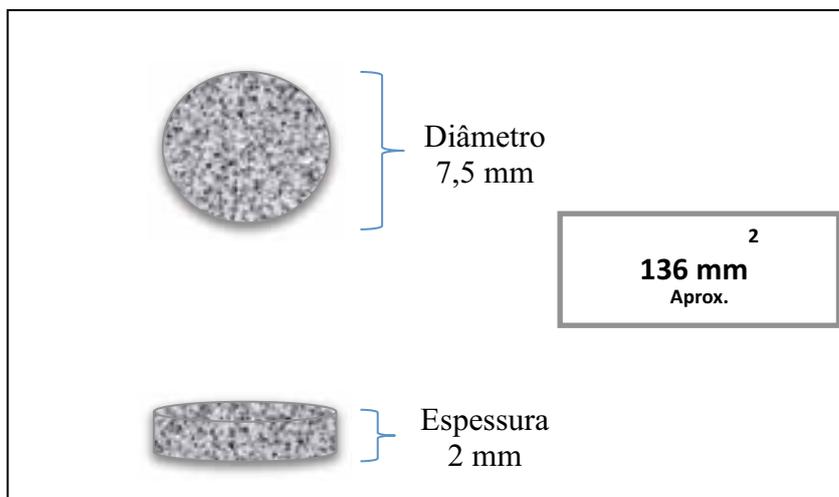
Figura 2- Recobrimento de filmes de DLC sobre os corpos de prova de titânio



### **Preparo dos Discos de Titânio**

Discos de titânio foram confeccionados nas dimensões de 7,5 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, aproximadamente 136 mm<sup>2</sup> da área total (Figura 3).

Figura 3- Dimensões dos discos de titânio



Os Discos de titânio foram encaixados na matriz metálica e submetidos a procedimentos de acabamento e polimento. Posteriormente, a matriz foi adaptada a um dispositivo de polimento na Politriz (Aropol 2V, Arotec, Cotia SP, Brasil). Os corpos de prova foram lixados progressivamente com lixas de carboneto de silício, de granulações 320, 400, 600 (30 segundos cada), 800, 1200, 1500 e 2000 (40 segundos cada) na presença de água, com velocidade de 300 rpm e força controlada de 0,5 kgf.

Os discos de titânio foram submetidos à avaliação da rugosidade superficial ( $R_a$ ) pelo rugossímetro portátil Hommel Tester T1000 da Hommel Werke GmbH. Foram realizadas 4 medidas em cada corpo de prova e posteriormente o valor médio foi obtido com a finalidade de atingir a rugosidade média inferior a  $0,2 \mu\text{m}$  (Bollen et al.<sup>8</sup>, 1996; Quirynen et al.<sup>47</sup>, 1996).

Todos os materiais testados foram lavados em água destilada e submetidos à limpeza com álcool isopropílico em aparelho de ultrassom (Kondortech, digital Ultrasonic Cleaner, São Carlos, SP) durante 2 ciclos com 30 minutos cada. Esta lavagem foi realizada antes do recobrimento com Carbono tipo diamante e antes do processo de esterilização por Radiação Gama a 25kGy, realizado pelo Centro de Tecnologia das Radiações – CTR / IPEN-CNEN/SP

### Ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato (molhabilidade) foram feitas pelo método da gota séssil (Young-Laplace), à temperatura ambiente em goniômetro “Contact Angle System OCA” de DataPhysics Instruments GmbH, Germany acoplado a computador com software SCA 20 (Laboratório Materiais Magnéticos e Coloides do Departamento de Físico Química, Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP).

Este equipamento possui uma câmera que grava a imagem da gota, que por sua vez é tratada num algoritmo para a determinação do ângulo de contato e uma fonte de luz difusa. Com ajuda de uma pinça as amostras foram colocadas sobre a base plana e em seguida com uma micro seringa “Hamilton DS 500/GT” de 500µL acoplada no equipamento foi depositada uma gota de aproximadamente 0,25 µL do líquido sobre os discos testados e depois de 10 segundos da gota entrar em contato com a superfície, se obteve os valores de  $\theta$  pela análise da imagem. Os ângulos dos lados direito e esquerdo da imagem da gota formada com as diferentes soluções foram calculados e automaticamente estabelecido o  $\theta$  médio.

Foram utilizados três discos recobertos com Carbono tipo diamante e os outros três sem recobrimento. Em cada corpo de prova, 3 medidas foram realizadas com os líquidos: Água (polaridade 52,20), Etilenoglicol (polaridade 19), Polietilenoglicol (polaridade 13,60) e Diiodometano (polaridade 2,60). Entre cada medida os corpos de prova foram lavados em acetona e água destilada, submetidos à limpeza durante 20 minutos e posteriormente secos. Esta lavagem foi realizada com o objetivo de eliminar detritos que poderiam interferir nos resultados entre cada medição. Após mensurado o ângulo de contato, desprezou-se os valores mais altos e mais baixos e a média aritmética e desvio padrão foram calculados para calcular a energia livre de superfície de cada grupo de amostras, com a equação do OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) (Janssen et al.<sup>227</sup>, 2006; Göttlicher et al.<sup>20</sup>, 2013)

$$\gamma_L(1 - \cos\theta) = 2(\gamma_{sd}\gamma_{Ld})^{1/2} + 2(\gamma_{sp}\gamma_{Lp})^{1/2}$$

### **Análise Colorimétrica do metiltetrazolium (MTT)**

A biocompatibilidade do Carbono tipo diamante foi realizada por análise colorimétrica do metiltetrazolium (Teste MTT) que avaliou a viabilidade e proliferação celular por meio da atividade citoquímica da enzima desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células viáveis.

Foram utilizados 24 discos de titânio; divididos em dois grupos (n = 12): recobertos por filmes de Carbono tipo diamante e não recobertos com Carbono tipo diamante.

Os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

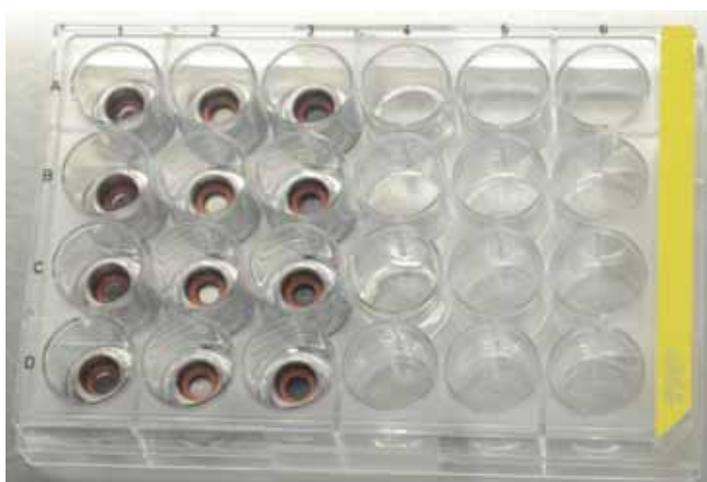
G1: Células HaCat + lamínulas de vidro

G2: Células HaCat + Discos de Titânio recobertos com Carbono tipo diamante

G3: Células HaCat + Discos de Titânio

Para cada grupo foi colocado um anel metálico e um dispositivo de borracha para delimitar a área de contato das células com os discos (Figura 4).

Figura 4- Anel Metálico e dispositivo de borracha sobre amostras testadas para delimitação da área.



Os discos foram colocados em placas de microtitulação (24 poços) (Costar Corp, Cambridge, MA, EUA), em seguida,  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> foram semeadas e mantidas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 15 min. Posteriormente 1 mL de um novo meio de cultura foi colocado por fora do anel metálico e mantido por 24 h a 37°C.

Após este período as amostras receberam uma solução composta por 900 µL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e 100µL de solução de MTT (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), a qual foi preparada por meio da dissolução de 5 µg do sal de MTT em 1mL de PBS esterilizado. As células foram incubadas por um período de 4 horas a 37 °C e posteriormente o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado, os dispositivos retirados e aplicado 400 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04 N para solubilizar os cristais formados na presença de mitocôndrias ativas. Duas alíquotas de 100 µL de cada poço foram transferidas para placas de microtitulação (96 poços) (Costar Corp, Cambridge, MA, USA).

A coloração foi quantificada, considerando que a atividade mitocondrial normal das células foram coradas em violeta intenso. A viabilidade das células foram avaliadas de maneira proporcional à absorbância que foi registrada com o leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader Hercules, Califórnia, EUA) para placas com comprimento de onda 570 nm.

### **Teste de adesão Bacteriana**

Os discos estéreis recobertos com Carbono tipo diamante (n = 12) e discos sem filme de Carbono tipo diamante (n = 12) foram distribuídos em placas de microtitulação (24 poços) (Costar Corp, Cambridge, MA, EUA) contendo 1mL de suspensão bacteriana de *E. coli* numa concentração de  $1,3 \times 10^8$  UFC/mL durante 1 hora e 30 minutos, em agitador orbital (Incubadora, 430, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 75 rpm a 37°C, para adesão do microrganismo à superfície dos discos. Após o período de adesão, a suspensão foi aspirada e o disco lavado duas vezes com PBS estéril para a remoção de microrganismos não aderidos. Em seguida, os discos foram reinseridos em outro poço com 1mL de BHI caldo para promover o crescimento do biofilme e então as placas foram incubadas a 37°C por 24 h a 75 rpm., sendo posteriormente transferidos e lavados duas vezes com PBS estéril e mantidos em 1mL de solução salina estéril e em ultrassom (Kondortech, digital Ultrasonic Cleaner, São

Carlos, SP ) por 20 minutos (Bjerkas et al.<sup>7</sup>, 2009). Posteriormente, 100 µL de cada tubo contendo os microrganismos desprendidos foram diluídos, semeados em meio BHI ágar e mantidos a 37°C por 24 horas para posterior análise quantitativa em UFC/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

### **Teste Antimicrobiano**

Os discos estéreis recobertos com Carbono tipo diamante (n = 12) e discos sem filme de Carbono tipo diamante (n = 12) foram distribuídos em placas de microtitulação (24 poços) (Costar Corp, Cambridge, MA, EUA) contendo 990 µL de caldo BHI e 10 µL de cultura bacteriana de *E. coli* com  $1,3 \times 10^7$  UFC/mL e mantidos a 37°C por um período de 3 h e 24 h. Gentamicina 10 mg/mL (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) na concentração final de 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo e água destilada estéril para o controle negativo.

Após o período de incubação 200 µL da solução de cada poço foi retirado, colocados em placas de microtitulação (96 poços) (Costar Corp, Cambridge, MA, EUA) e levados ao leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, França), com filtro 570 nm (Wakimoto et al.<sup>60</sup>, 2004). As leituras foram realizadas após o término de cada período de incubação.

Para contagem em UFC/mL foram realizadas diluições seriadas para o período de 3 h ( $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ ) e 24 h ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ) com 100 µL de cada poço em solução salina estéril e posteriormente semeados em meio BHI ágar. Todas as placas foram mantidas a 37°C por 24 h para posterior contagem. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

### **Teste da eficácia do método de análise da infiltração de bactérias na interface implante-componente protético**

Para avaliar o efeito bactericida dos filmes de Carbono tipo diamante sobre as superfícies de titânio impedindo a infiltração de bactérias na interface implante e componente protético foram utilizados conjuntos de implantes de Hexágono Externo Cilíndrico de 4,0 x 13 mm e seus respectivos componentes protéticos Munhão Anti rotacional para Prótese Fixa 3,5 x 2 mm, onde 12 parafusos e as superfícies do implante e componente protético que estejam em contato com ele foram revestidos com o filme de Carbono tipo diamante e as outras 12 combinações não receberam revestimento.

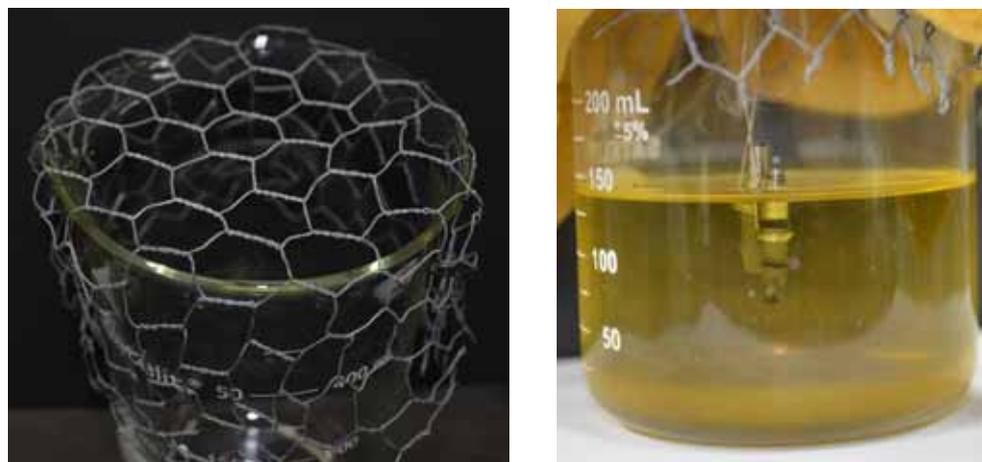
As 28 combinações entre componentes protéticos e implantes foram divididos em quatro grupos:

1. GDLC + Ec: revestido com Carbono tipo diamante e com *E. coli* (grupo teste n = 12);
2. GDLC - Ec: sem Carbono tipo diamante e com *E. coli* ( n = 12);
3. GDLC+: com Carbono tipo diamante e sem *E. coli* (n = 2);
4. GDLC-: sem Carbono tipo diamante e sem *E. coli* (n = 2).

Durante as etapas experimentais foram adotadas as normas de biossegurança para evitar a contaminação do campo de trabalho. Todo o trabalho foi executado por dois operadores utilizando luvas e capotes cirúrgicos estéreis em câmara de fluxo laminar vertical (Pachane PA-115 “Dwyer Mark II”, Michigan, USA). Todo o material utilizado no experimento foi esterilizado e aqueles que não permitiram foram descontaminados com álcool 70%.

As amostras dos conjuntos dos implantes previamente esterilizados foram levadas a “Prensa morsa torno giratório com fixação por vácuo 8RN” (EDA, SP, Brasil) para a fixação do implante. Os componentes protéticos foram conectados e apertados com torque de acordo com o protocolo do fabricante (32 N), utilizando torquímetro digital (Instrutherm-TQ-680, SP, Brasil) para ajuste exato e homogêneo em todos os conjuntos. Os conjuntos foram suspensos e estabilizados no copo Becker, utilizando-se dispositivo especial feito manualmente com fio ortodôntico para amarril de cromo níquel (CrNi) de 0,30 mm de diâmetro (Dental M&F Aguiar, Araraquara) ao redor de cada conjunto implante - componente protético. Todo o conjunto ficou suspenso, utilizando para isso, uma tela de arame medindo aproximadamente 10 cm de diâmetro para que somente a região da interface entre o componente protético e o implante ficasse em contato com o meio de cultura contaminado ou não com *E. coli*. Os conjuntos implante e componente protético foram colocados em Becker contendo 250 mL BHI caldo com inóculo de 500 µL de *E. coli* com  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml. Os demais conjuntos foram mantidos em outro Becker contendo 250 mL de BHI caldo sem bactéria. Todas as amostras foram mantidos a 37°C por um período de 24 h. (Figura 5)

Figura 5- Tela de arame e dispositivo de fio de amarril ao redor de cada conjunto de implante.



Posteriormente os conjuntos implante e componente protético, foram removidos e as superfícies lavadas duas vezes com solução salina estéril e limpas com gaze estéril a fim de remover o biofilme das superfícies externas.

Os conjuntos de implantes de cada grupo, após as lavagem e limpeza, foram desconectados e cada componente do conjunto implante, parafuso e componente protético, colocados individualmente em tubos contendo 500  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril. Para o desprendimento dos microrganismos aderidos, os tubos foram mantidos em cuba ultrassônica por 10 minutos e removidos alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  para realização da diluição seriada. Cada diluição foi plaqueada em meio BHI ágar e mantidas por 24 h à 37°C, sendo posteriormente quantificadas em unidades formadoras de colônias (UFC/ml) e registradas.

Para certificar o vedamento ou infiltração no espaço dos conjuntos implante e componente protético, foi realizado análise microbiológica de *E. coli* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase semi-quantitativo (PCR semi-quantitativo).

## Análise Microbiológica

### Preparo das Amostras Coletadas e Extração do DNA

As amostras bacterianas dos conjuntos Implante-Componente protético foram coletadas, centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em 500 µL de PBS estéril e congeladas a -20°C. Posteriormente para a extração do DNA as amostras foram agitadas em vortex por um minuto e em seguida, aquecidas a 97°C por 10 minutos no Thermomixer (Biorresearch, SP, Brasil). Alíquota de 300 µL da amostra foi colocado em novo tubo tipo eppendorf contendo 300 µL de fenol/clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos e o DNA precipitado a -20°C por 20 minutos acrescido da adição de 0,25 do volume de NaCl (5M) e 2,5 do volume total de DNA de etanol absoluto gelado. Após o período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos para a formação do pellet, o sobrenadante foi retirado e o DNA lavado com etanol 75%. O precipitado foi ressuspendido em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) e congeladas a -20°C até serem utilizadas. O mesmo procedimento foi utilizado para purificação do DNA bacteriano da cepa *E. coli* (ATCC 8739) utilizada como controle positivo.

### Reação em Cadeia da Polimerase semi-quantitativo – PCR

Para identificar a presença da *E. coli*, o par de oligonucleotídeos (5' – 3'), foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo – SP (Tabela 1). (Neves et al.<sup>41</sup>, 2008)

Tabela 1- Sequência de oligonucleotídeos de *E. Coli*

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')
16S14F	CTTG TACACACCGCCCGTC
23S1R	GGGTTTCCCC ATTCG GAAATC

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em solução estéril contendo Tris HCl (10 mM – pH 7,6) e EDTA (1 mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25 µM.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo aproximadamente 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo da bactéria específica (Invitrogen Tech-LineSM), 10,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (Invitrogen Tech-LineSM) 1 a 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM). Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise e controle negativo, sem DNA molde. A termociclagem utilizada foi de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

A presença do DNA amplificado foi observada em eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen Tech-Line<sup>SM</sup>) em solução tamponada TBE 1X (Tris 1 M; Ácido bórico 0,9 M; EDTA 0,5 M), acrescido de 4,5  $\mu\text{L}$  de Sybr Safe DNA gel stain 10000X (Invitrogen Tech-LineSM) para 100 mL de gel, utilizando o sistema Horizon (LOCCUS Biotecnology) e corrente elétrica de 80V por 60 minutos. O marcador de 100pb (GibcoBRLCOLOCAR LA MARCA) foi utilizado como padrão de peso molecular. As bandas presentes no gel foram observadas com o auxílio de transluminador de luz ultravioleta, as imagens digitalizadas com software VisionWorksLS Version 5.5.4 e posteriormente armazenadas para análises indicando a presença ou ausência da infiltração na interface implante e componente protético e até mesmo a eficácia da esterilidade da técnica validando a análise da UFC.

### **Análise Estatística**

Para os dados das variáveis quantitativas foram empregados testes não paramétricos (Teste U de Mann-Whitney) e paramétricos (Teste *t* de Student) para análise dos resultados. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

**Resultado**



## 4 RESULTADO

### Molhabilidade

A Figura 6 ilustra a imagem de ângulo de contato de uma gota de água ( $0.25\mu\text{L}$ ) sobre disco de titânio recoberto com Carbono tipo diamante. Os valores de ângulo de contato para cada grupo formados com Água, Etilenoglicol, Polietilenoglicol e Diiodometano são apresentados na Tabela 2. O valor de cada ângulo de contato é a média de três pontos da superfície testada, onde pode-se observar que os líquidos testados sobre os discos de titânio com e sem recobrimento apresentam um ângulo de contato menor que  $56,14^\circ$  e menor que  $59,14^\circ$  respectivamente.

Assim as superfícies testadas apresentam características hidrofílicas e predominantemente de molhabilidade, não apresentando diferenças estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ) para os líquidos testados, sendo que, o ângulo de contato de cada líquido testado permaneceu constante para cada superfície ( $p=0,348$ ).

Figura 6 - Imagem de ângulo de contato de uma gota de água sobre superfície de disco de titânio recoberto de Carbono tipo diamante

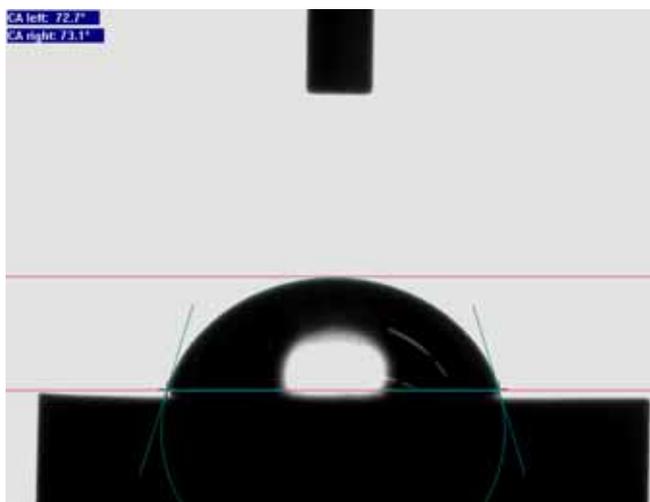


Tabela 2 - Ângulos de contato em discos de Titânio com e sem recobrimento de Carbono tipo diamante (DLC). Valores de média aritmética e desvio padrão.

<b>Ângulo de contato</b>		
<b>Líquidos Testados</b>	<b>Discos de titânio</b>	<b>Discos de titânio Recobertos com DLC</b>
<b>Água Destilada</b>	56.14±16.70	59.14±9.48
<b>Etilenoglicol</b>	25.82±5.87	24.11±2.71
<b>Polietilenoglicol</b>	27.23±7.12	21.98±3.50
<b>Diiodometano</b>	23.75±2.47	19.58±1.39

Resultados entre as superfícies testadas não apresentam diferença estatisticamente significativa (Teste *t* de Student  $p > 0,05$ )

### **Energia Livre de Superfície**

Após a medição dos ângulos de contato e a determinação da molhabilidade sobre as superfícies testadas, foi calculado a energia livre de superfície para cada material, em relação à polaridade dos líquidos usados: Água (52,20), Etilenoglicol (19), Polietilenoglicol (13,60) e Diiodometano (2,60) e desprezaram-se os valores mais altos e mais baixos. A média aritmética e desvio padrão foram utilizados para a aplicação da equação do OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) (Janssen et al.<sup>27</sup>, 2006). As Figuras 7 e 8 são gráficos gerados pela equação de OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) sendo que a reta que intercepta o eixo “Y” gera um valor de 5,4 e 5,6 mN/m para Titânio e Carbono tipo diamante (DLC) respectivamente que corresponde à capacidade polar das superfícies avaliadas.

Figura 7 - Gráfico de OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) para Titânio representa a capacidade polar da superfície expressado no valor de 5,4 da reta que intercepta no eixe “Y”.

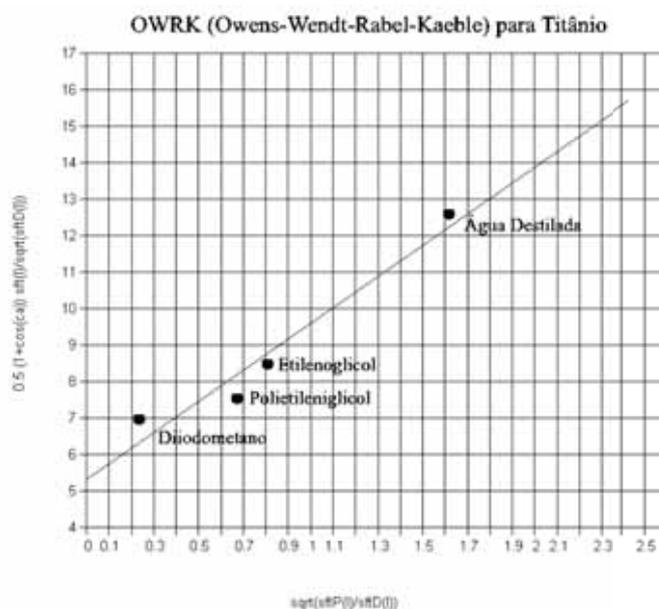
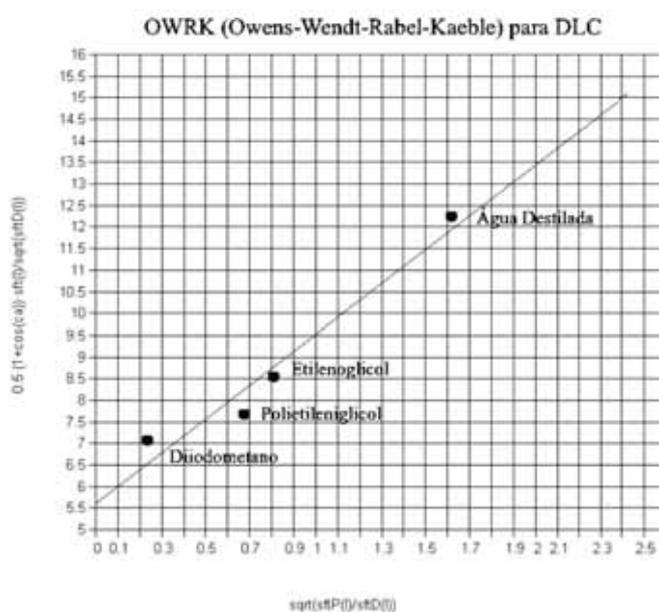


Figura 8 - Gráfico de OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) para Carbono tipo diamante (DLC) representa a capacidade polar da superfície expressado no valor de 5,6 da reta que intercepta no eixe “Y”.



### **Biocompatibilidade**

A viabilidade de queratinócitos humanos (HaCat) avaliada sobre discos de titânio com e sem recobrimento de Carbono tipo diamante, estão ilustrados na Tabela 3.

As superfícies de titânio e recobertas com Carbono tipo diamante apresentaram respectivamente diminuição na viabilidade celular de 40,3% e 33,2% com diferença estatisticamente significante entre o grupo controle (lamínula de vidro) e a superfície de titânio ( $p=0,0001$ ) e entre grupo controle e superfície de titânio recoberta com Carbono tipo diamante (DLC) ( $p=0,0001$ ). Dessa forma, as duas superfícies testadas apresentaram leve grau de toxicidade. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos experimentais ( $p= 0,319$ ).

Tabela 3 - Viabilidade celular (%) determinada por ensaio de MTT.

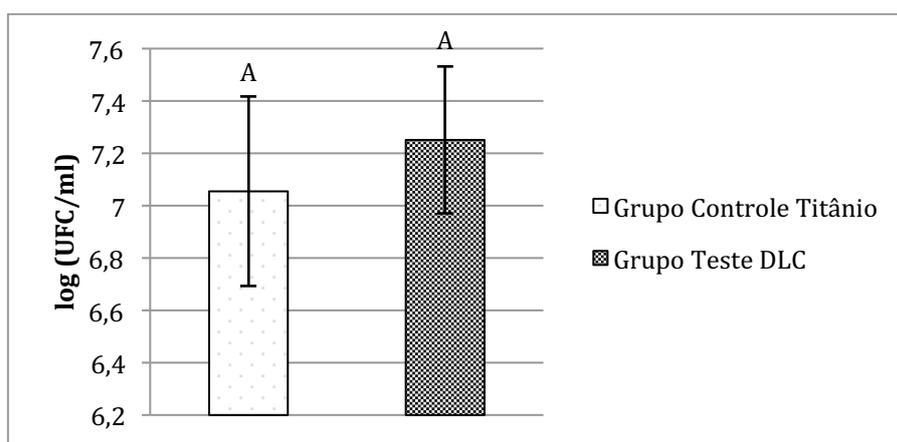
<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade Celular (%)</b>
<b>Lamínula</b>	99,26 (85,99-114,07) A*
<b>Ti</b>	58,99 (56,28-72,99) B
<b>DLC</b>	66,07 (58,51-70,08) B

Todos os valores são apresentados em porcentagens. Letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa entre o número de biomassa celular nos grupos testados; letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

### **Teste de Adesão Bacteriana**

As médias de UFC/mL dos microrganismos viáveis aderidos à superfície dos discos de titânio e discos recobertos com Carbono tipo diamante estão ilustradas na Figura 9 (log UFC/mL). Os valores da adesão para *E. coli* não apresentaram diferença estatisticamente significante ( $p > 0,05$ ) entre o número de bactérias aderidas à superfície dos discos de titânio e Carbono tipo diamante (DLC) ( $p=0,213$ ).

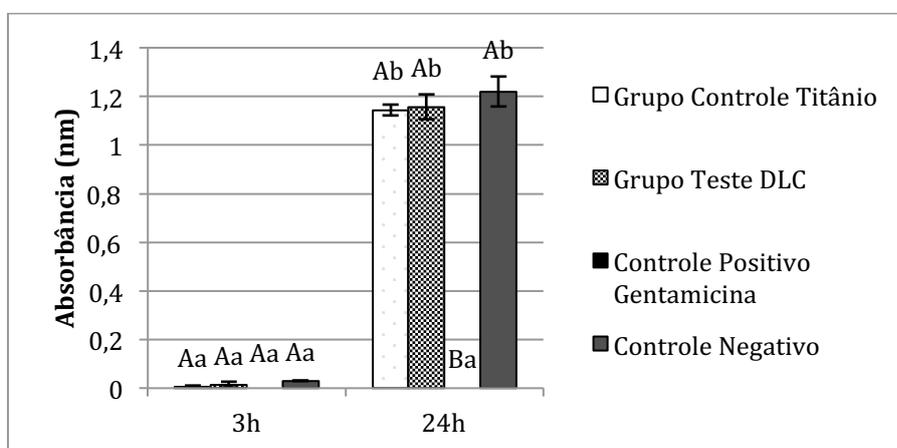
Figura 9 - Média e desvio padrão (log UFC/mL) de microrganismos aderidos (*E. coli*) à superfícies de discos de titânio e Discos recobertos com Carbono tipo diamante (DLC). A barra de erro corresponde ao desvio padrão da média para cada grupo. Letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa entre o número de colônias presentes nos grupos testados (Teste *t* de Student  $p > 0,05$ )



### Teste Antimicrobiano

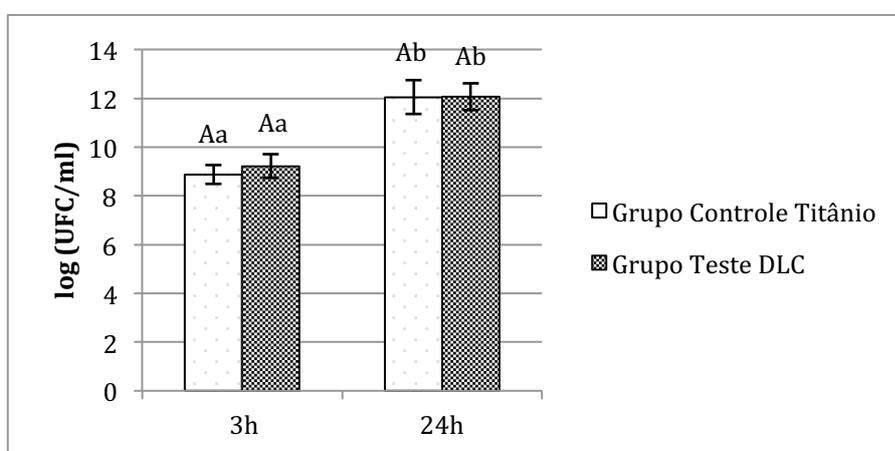
A Figura 10 mostra resultados do teste antibacteriano para os discos de titânio recobertos ou não por Carbono tipo diamante (DLC). Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos testes, pois nenhum deles foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* nos períodos avaliados ( $p_{3h} = 0,218$ ;  $p_{24h} = 0,052$ ). O grupo controle positivo e negativo corresponde, respectivamente, ao grupo *E. coli* tratado com Gentamicina e meio BHI com *E. coli*.

Figura 10 - Média e desvio padrão da ação bactericida medida pela Absorbância (nm) em 3h e 24h de incubação dos grupos: Teste DLC (discos de titânio com recobrimento) e Controle Titânio sem recobrimento. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da média das leituras para cada grupo. Letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa entre o número de células (*E. coli*) no mesmo período de incubação. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de incubação para o mesmo grupo teste. (Teste U de Mann-Whitney e Teste *t* de Student  $p > 0,05$ ).



As médias de UFC/mL dos microrganismos viáveis presentes sobre os discos dos grupos testes, de cada período avaliado estão ilustrados na Figura 11 (log UFC/mL). Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos testes ( $p > 0,05$ ) nos períodos de 3 h e 24 h ( $p_{3h} = 0,445$ ;  $p_{24h} = 0,677$ ).

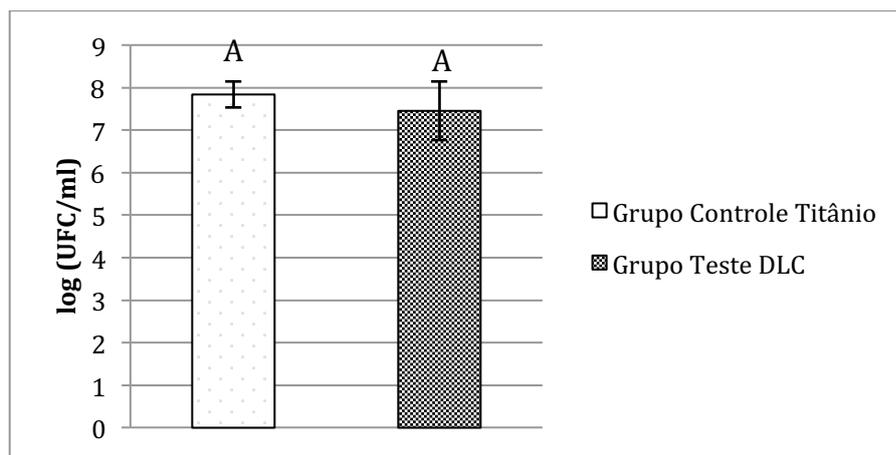
Figura 11 - Média e desvio padrão da presença de *E. coli* (log UFC/mL) após os períodos de 3 h e 24 h de incubação dos subgrupos: Teste DLC e Controle Titânio sem recobrimento. Letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa entre o número de colônias no mesmo período de incubação. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da média para cada grupo. Letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de incubação para o mesmo grupo teste. (Teste U de Mann-Whitney e Teste *t* de Student  $p > 0,05$ ).



### Infiltração Bacteriana

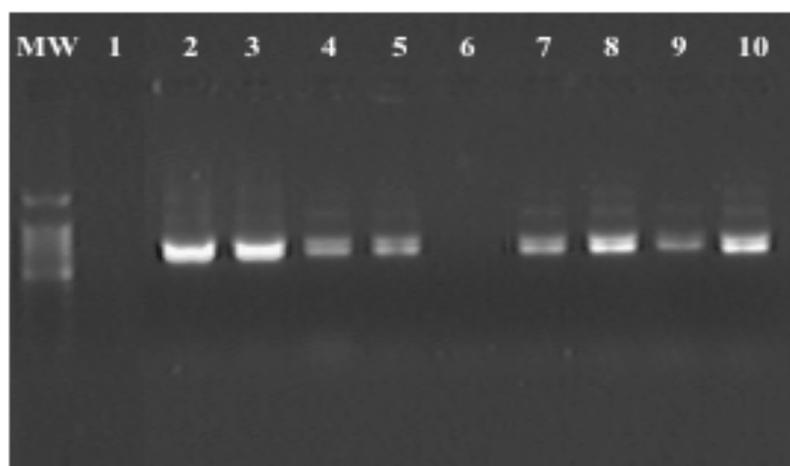
Todos os conjuntos dos grupos testados apresentaram infiltração bacteriana. As médias de UFC/mL dos microrganismos viáveis presentes na interface componente-implante são apresentadas na Figura 12 (log UFC/mL). Os grupos testados não foram estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ) em relação à UFC/mL presentes na interface implante-Componente protético, pois os dois grupos apresentaram presença de infiltração bacteriana ( $p = 0,103$ ).

Figura 12 - Média e desvio padrão da presença de *E. coli* (log UFC/mL) após 24h de incubação dos grupos: Teste DLC e Controle Titânio sem recobrimento. A barra de erro corresponde ao desvio padrão da média para cada grupo. Letras maiúsculas representam diferença estatisticamente significativa entre o número de colônias no mesmo período de incubação. (Teste *t* de Student  $p > 0,05$ ).



A análise microbiológica por PCR semi-quantitativo com a utilização do primer específico para *E. coli* mostrou a presença de DNA positivo em 100% das amostras de ambos os grupos testados confirmando assim a adequada técnica e a não contaminação das amostras durante o processo de elaboração dos experimentos (Figura 13).

Figura 13 - Teste de sensibilidade da análise microbiológica por PCR semi-quantitativo para detecção de *E. coli*. MW- padrão de peso molecular (100bp ladder); Linhas 2-5: grupo Teste Carbono tipo diamante (DLC); Linhas 7-10: grupo controle titânio.





***Discussão***

## 5 DISCUSSÃO

O filme de Carbono tipo diamante vem atraindo grande atenção nos últimos tempos devido as suas propriedades e utilização em diferentes áreas, como na saúde medica e odontológica. O Carbono tipo diamante é um material amorfo que apresenta propriedades físicas, químicas e mecânicas e de acordo com o método de preparação possui diferentes características. As amostras recobertas por Carbono tipo diamante utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram obtidas pela técnica CVD (Chemical Vapor deposition) aplicada pela empresa CVDentus que mantem a patente no Brasil. De acordo com Chai et al.<sup>13</sup> (2008), diversos trabalhos apresentam resultados contraditórios sobre o efeito do revestimento do Carbono tipo diamante o que leva a apresentar diferenças em muitas das propriedades físicas do Carbono tipo diamante tais como, a condutividade e a energia de superfície.

A energia livre de superfície é considerada um fator determinante nas propriedades de adesão celular e/ou bacteriana, formação de biofilmes e conseqüentemente no desenvolvimento de patologias como a peri-implantite e pode ser obtida pela mensuração do ângulo de contato formado entre os líquidos testados e as superfícies avaliadas. No presente estudo foram utilizados líquidos com componentes polares e dispersivos, como água destilada, etilenoglicol, polietilenoglicol e diiodometano; e a superfície foi determinada pela interação eletrostática e hidrofílica/hidrofóbica (Wang et al.<sup>61</sup>, 2004). A superfície hidrofóbica tem ângulo de contato superior a 70°, enquanto a superfície hidrofílica tem ângulo de contato menor que 70°. As médias dos valores do ângulo de contato mostrados na Tabela 2 comportaram-se como superfícies hidrofílicas não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os grupos testados. Observam-se diferenças relevantes quanto às características hidrofílicas das superfícies. O recobrimento dos discos de Titânio com Carbono tipo diamante diminui o ângulo de contato em 5,34% para água destilada e um acréscimo de 6,62%, 19,28% e 17,55% são observados nos ângulos de contato medidos com Etilenglicol, Polietilenoglicol e Diiodometano respectivamente. Tal comportamento se deve à natureza polar-apolar dos solventes, o que sugere que o recobrimento do Carbono tipo diamante sobre amostras de titânio torna a superfície ainda mais hidrofílica. Os resultados do presente trabalho corroboram com os achados de Zhao et al.<sup>63</sup> (2004), Robertson<sup>49</sup> (2002), que encontraram valores semelhantes aos apresentados para o ângulo de contato (água destilada) com valores de  $59.14 \pm 9.48$  para amostras recobertas com Carbono tipo diamante, estando

também de acordo com Choi<sup>14</sup>(2008) que mostraram que o menor ângulo significa uma maior área de contato, ou seja, que o líquido está mais espalhado na superfície do biomaterial, ou ainda, que o biomaterial é mais molhável.

A energia livre de superfície foi determinada pela equação de OWRK (Owens-Wendt-Rabel-Kaeble) (Janssen et al.<sup>27</sup>,2006; Kalin, Polajnar<sup>28</sup>, 2013), mais comumente utilizada na literatura, obtida pela avaliação dos ângulos de contato de mais de um líquido testados sobre uma superfície que pode ser sólida e apresenta componentes dispersivos e polares (Robertson<sup>49</sup>, 2002). Por outro lado, a energia livre de superfície da fase sólida e a tensão superficial da fase líquida, especialmente a combinação das partes polares, têm uma influência sobre as propriedades de molhabilidade da superfície (Podgornika et al.<sup>45</sup>, 2007). Isto sugere que as polaridades das superfícies apresentam papel importante sobre as interações sólido-líquido (Kalin, Polajnar<sup>28</sup>, 2013), porém as diferenças na energia de superfície entre os substratos parece ser, em grande parte, devido as diferenças nos seus componentes polares. (Janssen et al.<sup>27</sup>, 2006). Assim as Figuras 7 e 8, mostram o componente polar da energia livre de superfície das amostras testadas, apresentando valores de 5,4 e 5,6 mN/m para titânio e Carbono tipo diamante respectivamente sem nenhuma diferença relevante. Diab Al-Radha et al.<sup>17</sup>, 2012; encontraram valores semelhantes (5,19 mN/m) para o componente polar de energia livre de superfície para amostras de titânio com rugosidade média inferior a 0,2 µm, o mesmo padrão utilizado em nosso estudo, corroborando assim com os valores encontrados no presente estudo. Por outro lado, estudos que avaliaram a energia livre de superfície do Carbono tipo diamante depositados sobre substratos de aço pela técnica CVD, apresentaram componente polar de energia livre de superfície de 10 mN/m (Podgornika et al.<sup>45</sup>, 2007). Pode-se afirmar então que o recobrimento do Carbono tipo diamante sobre amostras de titânio não modifica as propriedades de superfície do material quanto à molhabilidade e Energia Livre de Superfície como demonstrado.

Biomateriais devem satisfazer determinados critérios para serem utilizados como dispositivo médico. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com materiais revestidos com Carbono tipo diamante a fim de melhorar as características desses biomateriais (Grill<sup>21</sup>, 2003). Estudos *in vitro* avaliam a biocompatibilidade dos materiais utilizando testes de viabilidade das células pelo método MTT. Marciano et al.<sup>40</sup> (2011), e Wachesk et al.<sup>59</sup>(2013); observaram que o primeiro período de tempo (24 horas) é essencial para a adesão celular devido à migração e proliferação das células sobre a superfície a ser avaliada. Os resultados da viabilidade de queratinócitos humanos (HaCat) avaliada sobre discos de titânio com e sem

recobrimento de Carbono tipo diamante, indicam que o recobrimento com Carbono tipo diamante não afetou a resposta celular quando comparadas com discos de titânio sem recobrimento. De acordo com a norma ISO 10993-5:2009: "Avaliação biológica de dispositivos médicos: métodos in vitro", o valor de referência 99,26% encontrado no presente estudo para a viabilidade celular (controle), pode-se afirmar que ambas as superfícies testadas apresentaram grau leve de toxicidade. Esses resultados concordam com os achados de Robertson<sup>49</sup> (2002), Venâncio<sup>58</sup> (2005), Hasebe et al.<sup>23</sup> (2007), Trava-Airoldi et al.<sup>57</sup> (2007); os quais verificaram também em estudos in vitro, que a biocompatibilidade dos filmes de Carbono tipo diamante é bem tolerado e não causa efeitos adversos. Entretanto mais informações do efeito do Carbono tipo diamante no metabolismo celular são escassas, assim como estudos do Carbono tipo diamante in vivo.

A cavidade oral é capaz de ser colonizada por mais de 500 espécies de microrganismos e a exposição do implante dentário na microbiota bucal é susceptível à formação de biofilme, podendo ser um fator determinante do sucesso do tratamento com implantes dentários (Almaguer-Flores et al.<sup>3</sup>, 2009). Assim, estudos relatam que mais do 50% das lesões peri-implantares apresentavam principalmente microrganismos não associados com a periodontite e apresentaram bactérias entéricas tais como *Escherichia coli* e *Escherichia cloacae* (Leonhardt et al.<sup>32</sup>, 2003). *Escherichia coli*, bactéria utilizada no estudo, é uma bactéria anaerobia facultativa, em forma de bacilo com 1,1 a 1,5 µm de diâmetro e 2 a 6 µm de comprimento, com grande capacidade de motilidade (Jansen et al.<sup>26</sup>, 1997; Steinebrunner et al.<sup>55</sup>, 2005) e apresenta características fisiológicas de sobrevivência em meios adversos, garantindo de tal forma a possibilidade de se infiltrar no interior da interface pilar-implante (Neves et al.<sup>42</sup>, 2010), a qual apresenta tamanhos entre 1 mm e 10 mm porem a possibilidade de uma troca de fluidos e de microorganismos é muito evidente. (Jansen et al.<sup>26</sup>, 1997).

A adesão bacteriana sobre determinada superfície depende de muitos fatores que incluem características das cepas bacterianas assim como o tipo do biomaterial. As características das duas superfícies interatuantes, assim como a hidrofobicidade, carga elétrica e condições ambientais, irão influenciar na adesão e posteriormente na formação do biofilme (Katsikogianni, Missirlis<sup>29</sup>, 2004). A capacidade do biomaterial em resistir a aderência bacteriana é um dos fatores que podem influenciar na colonização ou infecção bacteriana (Levon et al.<sup>33</sup>, 2008). Os resultados do presente trabalho mostram que as superfícies de titânio e as recobertas com Carbono tipo diamante apresentam capacidade de aderência

bacteriana, indicando que as propriedades de superfície do recobrimento das superfícies com Carbono tipo diamante, não têm influência significativa na adesão. Esses resultados contradizem os estudos de Levon et al.<sup>33</sup> (2008), Soininen et al.<sup>54</sup> (2011) que avaliaram superfícies de Carbono tipo diamante associados ou não com outros materiais e os mesmos apresentam alta resistência a aderência bacteriana quando testados com cepas de *Staphylococcus aureus* e/ou *Staphylococcus epidermidis*. Por outro lado estudos de aderência bacteriana com biofilmes de única espécie com *A. israeli*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram capazes de reduzir essa característica. Biofilmes multiespécies com microrganismos anaeróbios testados sobre superfícies de Carbono tipo diamante demonstraram que estes não foram capazes de reduzir a aderência bacteriana (Almaguer-Flores et al.<sup>3</sup>, 2009). A determinação das propriedades antibacterianas das superfícies com recobrimento de Carbono tipo diamante testadas com única espécie não poder ser considerada como fundamento de resposta in vivo, uma vez que na microbiota bucal há uma diversidade de microrganismos.

Testes antimicrobianos sobre superfícies recobertas com Carbono tipo diamante, em associação ou não com outras partículas demonstraram evidências do poder antibacteriano quando testados sobre a bactéria *Escherichia coli* (Mangolim et al.<sup>34</sup>, 2011; Marciano et al.<sup>36</sup>, 2009; Lan et al.<sup>31</sup>, 2013; Chan et al.<sup>15</sup>, 2011). O aumento da biomassa (número de células) total de uma cultura bacteriana em crescimento em meio líquido pode ser monitorado por medidas da densidade óptica da cultura. A absorvância aumenta proporcionalmente ao aumento do número de células na população. A Figura 10 ilustra que nenhum dos grupos testados foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Diferentes autores (Mangolim et al.<sup>34</sup>, 2011; Marciano et al.<sup>34</sup>, 2009; Lan et al.<sup>31</sup>, 2013; Chan et al.<sup>15</sup>, 2011; Ishihara et al.<sup>25</sup>, 2006; Marciano et al.<sup>39</sup>, 2010; Marciano et al.<sup>37</sup>, 2009; Marciano et al.<sup>38</sup>, 2009) mostram que filmes de Carbono tipo diamante com e sem associação à outros partículas, apresentam atividade antibacteriana de 33% em 3h de incubação, diferindo dos resultados apresentados no presente trabalho. É importante ressaltar que a metodologia aplicada no presente estudo (cepa bacteriana, meio de cultura e concentração do microrganismo) foi a mesma utilizada nos estudos acima citados.

No teste de infiltração bacteriana na interface implante-pilar protético, na primeira fase foi estabelecido o método de infiltração das bactérias do meio externo para o meio interno, simulando o processo in vivo, assim como o tipo de implante a ser utilizado. Após o período estabelecido, 24 horas de contato com a suspensão bacteriana, todos os conjuntos implante-parafuso-pilar protético foram retirados e descontaminados manualmente, pois o

objetivo do trabalho foi avaliar somente a interface implante-pilar protético. Esta descontaminação externa pode ter influenciado nos resultados, pois a descontaminação mecânica manualmente pode ser diferente para cada conjunto, em relação à força aplicada do operador. A não adaptação do conjunto implante-pilar protéticos pode ser ocasionado pelo afrouxamento do parafuso e assim provocar complicações mecânicas e/ou inflamatórias (Binon<sup>6</sup>, 1994; Taylor<sup>56</sup>, 1998; De Mori<sup>16</sup>, 2005). Esta não adaptação está relacionada com o torque aplicado assim como pode influenciar na quantidade de fluxo bacteriano que pode penetrar nesta interface independente do tamanho da interface (Passos et al.<sup>44</sup>, 2013). Assim, no presente estudo foi aplicado o torque indicado pelo fabricante com a utilização de torquímetro digital com a finalidade de que todos os conjuntos recebessem a mesma força.

Na Figura 12 os dois grupos avaliados apresentaram infiltração bacteriana, ou seja, o recobrimento do parafusos assim como das áreas em contato recobertas com Carbono tipo diamante não apresenta características antibacterianas, ou seja não impediu a infiltração bacteriana para o interior da interface. Esses resultados corroboram com os achados de Neves et al.<sup>42</sup> (2010) que avaliaram a microinfiltração em implantes Hexágono externo utilizando parafusos recobertos de Carbono tipo diamante e também não encontraram diferenças significativas quando comparado ao grupo que não recebeu o recobrimento. Dessa maneira, parece claro que as superfícies recobertas com o filme de Carbono tipo diamante não possui ação antibacteriana sobre os grupos avaliados.

Todo o procedimento foi desenvolvido dentro das normas estabelecidas de Biossegurança para evitar a contaminação externa. Todos os conjuntos utilizados no presente estudo não apresentaram contaminação externa e nenhum conjunto foi excluído. Os resultados da análise microbiológica por PCR semi-quantitativo confirma que todas as amostras foram contaminadas por *E. coli* e não por outros microrganismos do ambiente externo.

Os resultados apresentados neste trabalho apresentam divergências das propriedades químicas do Carbono tipo diamante quando comparados aos existentes na literatura, já que existem várias técnicas utilizadas na produção de Carbono tipo diamante (Diamond Like Carbon - DLC) e de acordo com o método de preparação possui diferentes características. Assim, este estudo contribui com informações adicionais sobre o Carbono tipo diamante e sua aplicação sobre superfícies de materiais da área da saúde e odontologia.



**Conclusão**

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- O Diamond Like Carbon (DLC) não modifica as propriedades de superfície quando aplicado sobre o Titânio em relação à molhabilidade e energia livre de superfície.
- O DLC apresenta-se como material biocompatível com leve grau de citotoxicidade.
- O DLC sobre discos de titânio não apresenta propriedades antimicrobianas e não interfere na adesão bacteriana quando testadas com *Escherichia coli*.
- O recobrimento do DLC sobre parafuso e áreas de contato com ele (conjunto implante-pilar protético), não apresentam propriedades antimicrobianas e não inibem a infiltração bacteriana nesta interface.



## ***Referências***

## REFERÊNCIAS\*

1. Aisenberg S, Chabot R. Ion-beam deposition of thin films of diamond-like carbon. *J Appl Phys.* 1971; 42(7): 2953-8.
2. Albrektsson TA. Multicenter report on osseointegrated oral implants. *J Prosthet Dent.* 1988; 60(1): 75-84.
3. Almaguer-Flores A, Olivares-Navarrete R, Lechuga-Bernal A, Ximénes-Fyvie LA, Rodill SE. Oral bacterial adhesión on amorphous carbón films. *Diam relat mater.* 2009;18(18): 1179-85
4. Araújo EA, Andrade NJ, Carvalho AF, Ramos AM, Sá Silva CA, Da Silva LH. Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Quim Nova.* 2010; 33(9): 1940-8.
5. Barbour ME, O' Sullivan, Jenkinson HF, Jagger DC. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonization of titanium abutments. *J Mater Sci: Mater Met.* 2007; 18(7): 1439-47.
6. Binon PP. The role of screws in implants systems. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994; 9(1): 48-63.
7. Bjerkan G, Witso E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and Steel surface in vitro. *Acta Orthopeda.*2009; 80(2): 245-50.
8. Bollen CML, Papaioannou W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, Van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7(3): 201-11.
9. Breeding LC, Dixon DL, Nelson EW, Tietge JD. Torque required to loosen single- tooth implant abutment screws before and after simulated function. *Int J Prostodont.* 1993; 6(5): 435-9.
10. Brogini N, McManus LM, Hermann JS, Medina R, Schenk RK, Buser D, Cochran DL. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J Dent Res.* 2006; 85(5): 473-8.
11. Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J Periodontol.* 2005; 76(1): 115-20.

- 
- De acordo com o Manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas de Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

12. Calzado-Martín A, Saldaña L, Korhonen H, Soininen A, Kinnari TJ, Gómez-Barreda E, et al. Interaction of human bone cells with diamond-like carbon polymer hybrid coatings. *Acta Biomater.* 2010; 6(8): 3325-38
13. Chai F, Mathis N, Blanchemain N, Meunier C, Hildebrand HF. Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates. *Acta Biomater.* 2008; 4(5): 1369-81
14. Choi HW, Dauskardt RH, Lee SC, Lee KR, Oh KH. Characteristics of silver doped DLC films on surface properties and protein adsorption. *Diam relat mater.* 2008(3); 17: 252-7
15. Chan YH, Huang CF, Ou KL, Peng PW. Mechanical properties and antibacterial activity of copper doped diamond-like carbon films. *Surf Coat Technol.* 2011; 206(6): 1037-40.
16. De Mori R. Avaliação da interface implante/pilar protético antes e após carregamento cíclico [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Faculdade de Odontologia de Taubaté; 2005.
17. Diab Al-Radha AS, Dymock D, Younes C, O'Sullivan D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent.* 2012; 40(2): 146-53
18. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(3): 255-61.
19. Feitosa PCP. Estabilidade do parafuso do intermediário em implantes de hexágono externo, hexágono interno e cone morse, após ensaio de fadiga. [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Faculdade de Odontologia de Taubaté; 2007.
20. Göttlicher M, Rohnke M, Helth A, Leichtwei T, Gemming T, Gebert A, et al. Controlled surface modification of Ti-40Nb implant alloy by electrochemically assisted inductively coupled RF plasma oxidation. *Acta Biomater.* 2013; 9(11): 9201-10.
21. Grill A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials-an overview. *Diam Relat Mater.* 2003; 12(1): 166-70.
22. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(2): 95-108.
23. Hasebe T, Hotta A, Kodama H, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T. Recent advances in Diamond-like carbon films in the medical and food packaging fields. *NDFCT.* 2007; 17(6): 263-79.

24. Hermann JS, Schoolfield JD, Schenk RK, Buser D, Cochran DL. Influence of the size of the microgap on crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol.* 2001; 72(10): 1372-83.
25. Ishihara M, Kosaka T, Nakamura T, Tsugawa K, Hasegawa M, Kokai F, Koga Y. Antibacterial activity of fluorine incorporated DLC films. *Diam Relat Mater.* 2006; 15(4-8): 1011-4.
26. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(4): 527-40.
27. Janssen D, De Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicone dioxide. *Thin solid films.* 2006; 515(4):1433-8.
28. Kalin M, Polajnar M. The correlation between the surface energy, the contact angle and the spreading parameter, and their relevance for the wetting behaviour of DLC with lubricating oils. *Tribol Int.* 2013; 66: 225-33
29. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 2004; 8: 37-57
30. Koutouzis T, Gadalla H, Kettler Z, Elbara A. The role of chlorexidine on endotoxin penetration to the implant-abutment interface (IAI). *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013 Sep 23 [Epub ahead of print]. doi: 10.1111/cid.12158
31. Lan WC, Ou SF, Lin MH, Ou KL. Development of silver-containing diamond-like carbon for biomedical applications. Part I: microstructure characteristics, mechanical properties and antibacterial mechanisms. *Ceram Int.* 2013; 39(4): 4099-104.
32. Leonhardt A, Dahlén G, Renvert S. Five-year clinical, microbiological, and radiological outcome following treatment of peri-implantitis in man. *J Periodontol.* 2003; 74(10): 1415-22.
33. Levon J, Myllymaa K, Kouri VP, Rautemaa R, Kinnari T, Myllymaa S, et al. Patterned macroarray plates in comparison of bacterial adhesion inhibition of tantalum, titanium, and chromium compared with diamond-like carbon. *J Biomed Mater Res: Part A.* 2010; 92(4): 1606-13.

34. Mangolin JF, Marciano FR, Trava-Airoldi VJ, da Silva NS. Atividade antibacteriana do filme DLC. In: 13 Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e 9 Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba, de 20 a 21 outubro de 2011, São José dos Campos-SP. São José dos Campos: UNIVAP; 2011.
35. Manhabosco TM, Martins LAM, Tamborim SM, Ilha M, Vieira MQ, Guma FCR, Müller IL. Cell response and corrosion behavior of electrodeposited diamond-like carbon films on nanostructured titanium. *Corros Sci.* 2013; 66: 169-76.
36. Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films. *Appl Surf Sci.* 2009; 255(20): 8377-82.
37. Marciano FR, Lima-Oliveira DA, Da-Silva NS, Diniz AV, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC films containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2009; 340(1): 87-92.
38. Marciano FR, Bonetti LF, Santos LV, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC and Ag-DLC films produced by PECVD technique. *Diam Relat Mater.* 2009; 18(5-8): 1010-4.
39. Marciano FR, Lima-Oliveira DA, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of fluorinated diamond-like carbon films produced by PECVD. *Surf Coat Technol.* 2010; 204(18-19): 2986-90.
40. Marciano FR, Wachesk CC, Lobo AO. Thermodynamic aspects of fibroblastic spreading on diamond-like carbon films containing titanium dioxide nanoparticles. *Theor Chem Acc.* 2011; 130(4-6): 1085-93.
41. Neves GK, Mangrich IE, Zoccoli CM, Cancian R, Persuhn DC. Análise molecular de estirpes de *Escherichia coli* isoladas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais por RFLP da região intergênia 16s-23s'. *RBAC.* 2008; 40(1): 61-4.
42. Neves FD, Prudente MS, Carneiro TAPN, Neto JPS, Penatti MPA. Avaliação da microinfiltração bacteriológica em implantes hexagono externo com diferentes superfícies de parafuso. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 19(49): 119-23
43. Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S, Graziani F, Catamo G, Sammartino G, et al. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. *J Periodontol.* 2008; 79(8): 1419-25.

44. Passos SP, May LG, Faria R, Ozcan M, Bottino MA. Implant-abutment gap versus microbial colonization: clinical significance based on literal review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101(7): 1321-8.
45. Podgornik B, Zajec B, Strnad S, Stana-Kleinschek K. Influence of surface energy on the interactions between hard coatings and lubricants. *Wear*. 2007; 262: 1199-204.
46. Quirynen M, Van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res*. 1993; 4(3): 158-61.
47. 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(2): 169–78.
48. Ricomini Filho AP, Fernandes FSF, Straioto FG, Silva WJ, Del Bel Cury AA. Preload loss and bacterial penetration on different implant-abutment connection systems. *Braz Dent J*. 2010; 21(2): 123-9.
49. Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R Rep*. 2002; 37(4): 129-281
50. Roy RK, Lee KR. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 83(1): 72-84
51. Scarano A, Piatelli M, Caputi, Favero GA, Piatelli A. Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J Periodontol*. 2004; 75(2): 292-6.
52. Scarano A, Assenza B, Piatelli M, Lezzi G, Leghissa GC, Quaranta A, et al.. A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments. *J Oral Implantol*. 2005; 31(16): 269- 75.
53. Silva-neto JP, Prudente MS, Carneiro TAPN, Nóbilo MAA, Penatti MPA, Neves FD. Micro-leakage at the implant-abutment interface with different tightening torques in vitro. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(5): 581-7.
54. Soininen A, Levon J, Katsikogianni M. In vitro adhesion of staphylococci to diamond-like carbon polymer hybrids under dynamic flow conditions. *J Mater Sci: Mater Med*. 2011; 22(3): 629-36.

55. Steinebrunner L, Wolfart S, Bobmann K, Kern M. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-Abutment interface of different implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20(6): 875-81.
56. Taylor TD. Prosthodontic problems and limitations associated with osseointegration. *J Prosthet Dent*. 1998; 79(1): 74-8.
57. Trava-Airoldi VJ, Bonetti LF, Capote G, Santos LV, Corat EJ. A comparison of DLC film properties obtained by r.f. PACVD, IBAD, and enhanced pulsed-DC PACVD. *Surf Coat Technol*. 2007; 202(3): 549-54.
58. Venancio VS. Caracterização de filmes de carbon do tipo diamante para aplicações biomédicas. [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.
59. Wachesk CC, Pires CAF, Ramos BC, Trava-Airoldi VJ, Lobo AO, Pacheco-Soares C, et al. Cell viability and adhesion on diamond-like carbon films containing titanium dioxide nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2013; 266: 176-81.
60. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, Nataro JM, Sarantuya J, Iwashita M, Manago K, Tokuda k, Yoshinaga M, Kawano Y. Quantitative biofilm assay using microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 71(5): 687-90.
61. Wang J, Huang N, Yang P, Leng YX, Sun H, Liu ZY, et al. The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials*. 2004; 25(16): 3163-70
62. Yin Y, Hang L, Xu J, McKenzie DR, Bilek MMM. Surface adsorption and wetting properties of amorphous Diamond-like carbon thin films for biomedical applications. *Thin Solid Films*. 2008; 516(16): 5157-61.
63. Zhao Q, Liu Y, Abel EW. Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films. *J Colloid Interf Sci*. 2004; 280(1): 174-83.

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 13 de março de 2014

Patricia Milagros Maquera Huacho