UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Amanda Fucci Wady

Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO.

Araraquara
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia de Araraquara

Amanda Fucci Wady

Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO.

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

Orientadora: Profª Drª Ana Lucia Machado

Araraquara
2015

Wady, Amanda Fucci
Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO / Amanda Fucci Wady .-- Araraquara: [s.n.], 2015.
185 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

1. *Candida albicans* 2. *Porphyromonas gingivalis* 3. Saliva 4. Biofilmes 5. Prótese dentária I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

AMANDA FUCCI WADY

Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO.

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

2 Examinador: Prof. Dr. Prof. Dr. Francisco Assis Mollo Jr

3 Examinador: Prof. Dr. Luiz Antonio Borelli Barros

4 Examinador: Prof. Dr. Rogério Margonar

5 Examinador: Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza

Araraquara, 23 de março de 2015

DADOS CURRICULARES

Amanda Fucci Wady

NASCIMENTO: 04/01/1986

FILIAÇÃO: Gilberto Elias Wady e Joana Fucci Wady

2004-2007- Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2008-2011- Mestrado em Reabilitação Oral - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2013-2014- Especialização em Periodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP/FAEPO

2011-2015- Doutorado em Reabilitação Oral - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A ***Deus,*** por proteger-me e me iluminar sempre, fazendo-me substituir as incertezas pela segurança e o medo pela vitória.

Senhor Jesus!!!

Agradeço pela Tua proteção no dia de ontem e no dia de hoje. Os trabalhos aos quais me dediquei foram profícuos, graças à Tua proteção e eu como uma criatura agradecida, venho aos Teus pés exultante, dar oferenda em sentimento das minhas vitórias, pois sei que tudo na vida está em Tuas Mãos. Agradeço, ainda pelas oportunidades que me foram dadas e, principalmente por ter conhecido pessoas tão especiais, que junto ao senhor puderam me mostrar caminhos, que tenho seguido. Muito obrigada pelas palavras consoladoras que me chegam de todas as formas.

Eu sigo e sempre seguirei os Teus passos a todo o instante e ofereço aos meus irmãos tudo o que o Tu me ensinas e que eu aprendo com avidez.

Sinto-me sempre amparada pelo Senhor!!
Muito obrigada!!!

Aos meus pais, **Gilberto** e **Joana**, que sempre me ensinaram a viver com dignidade e sempre se dedicaram para que eu conseguisse trilhar o meu caminho. Muitos momentos tiveram que renunciar seus sonhos e me ajudaram de todas as formas para que o meu fosse realizado. Quero poder me dedicar com todo meu amor e carinho a vocês!! Meu amor por vocês é incondicional!!!

Ao meu irmão **Arthus** que pude aprender o verdadeiro significado do amor eterno!!!

"A morte não é nada.
Eu somente passei
para o outro lado do Caminho.

Eu sou eu, vocês são vocês.
O que eu era para vocês,
eu continuarei sendo.

Me dêem o nome
que vocês sempre me deram,
falem comigo
como vocês sempre fizeram.

Vocês continuam vivendo
no mundo das criaturas,
eu estou vivendo
no mundo do Criador.

Não utilizem um tom solene
ou triste, continuem a rir
daquilo que nos fazia rir juntos.

Rezem, sorriam, pensem em mim.
Rezem por mim.

Que meu nome seja pronunciado
como sempre foi,
sem ênfase de nenhum tipo.
Sem nenhum traço de sombra
ou tristeza.

A vida significa tudo

o que ela sempre significou,
o fio não foi cortado.
Porque eu estaria fora
de seus pensamentos,
agora que estou apenas fora
de suas vistas?

Eu não estou longe,
apenas estou
do outro lado do Caminho...

Você que aí ficou, siga em frente,
a vida continua, linda e bela
como sempre foi."
Santo Agostinho

Aos meus irmãos **Ariel e Ariane** e aos meus cunhados **Paulo e Denise**, que também sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim, valorizando minhas conquistas e me ensinando a reconhecer ainda mais o valor da vida e de cada uma de suas fases.

Aos meus sobrinhos **Rafael, Marina, Pedro e João** por me darem tantas alegrias e momentos de diversão.

Muito obrigado por tudo!

Amo vocês!

À minha **vó Emma** que é uma mulher que todos devem se espelhar!! Adoro compartilhar todos os momentos de minha vida com ela!! Sempre tenho muito carinho amor e conselhos com muita sabedoria!!! Me ajuda sempre!! Amo muito você Vó!!!

Agradecimentos Especiais

Aos meus amigos **Aline Lopes, Carol Endres, Fernada Terruggi, Eduardo Moffa, Dani Cruz** que sempre estão ao meu lado. Sei que sou uma pessoa de muita sorte, pois tenho amigos verdadeiros!!! Sempre dispostos a ajudar, não importa se será fácil ou difícil, sempre dizem sim!! Fundamentais em todas as etapas da minha vida!! Amigos sinceros, pacientes e que respeitam as dores, alegrias e cada momento que estou vivendo!! Muito obrigada!!!

Também aos amigos **Chico, Junior, Márcio, Pedro e, em especial, o Renato**!! Pessoas maravilhosas, com um coração enorme, que conheci a pouco tempo, mas que parece há muito mais!! Pessoas que meu querido irmão Arthus escolheu como família! E que para mim, agora, estão em meu coração!

...E seu principal objetivo de ser o de ser amigo.

Precisa-se de um amigo que faça a vida valer a pena, não porque a vida é bela, mas por já se ter um amigo.

Precisa-se de um amigo que nos bata no ombro, sorrindo ou chorando, mas que nos chame de amigo.

Precisa-se de um amigo para ter-se a consciência de que ainda se vive.

Carlos Drummond de Andrade

À minha orientadora, ***Profª. Ana Lucia:***

Quando a conheci e tive oportunidade de desenvolver trabalhos pude ver a excelência na capacidade em ser pesquisadora! Tive uma grande oportunidade em conviver durante 10 anos!! Tivemos muitas alegrias, tristezas, atritos, agrados... Tudo o que se tem em um relacionamento orientador/aluno durante muitos anos!! Sem dúvida, pude aprender muito e o seu papel na minha vida contribuiu para meu amadurecimento!! Com certeza ficará no meu coração todo o carinho e admiração!! Muito obrigada por toda nossa convivência!!

Aos **Professores Borelli, Kiko e Rogério!**!!! Tenho extrema admiração profissional e pessoal. Aproveito, neste agradecimento, para mostrar minha sincera gratidão por ter convivido com vocês. Tenho grande orgulho em tê-los na minha formação!!! Muito obrigada!

Ao **Prof. Raphael** por ter aceitado ser banca da Tese de Doutorado tão prontamente! Admiro-o como profissional e pessoa!! Muito obrigada!

Aos **Professores Elidiane Cipriano Rangel** e **Nilson Cristino da Cruz!** Tiveram dedicação e atenção fundamentais para que o andamento deste estudo pudesse ser concretizado. E, colocaram à disposição a infraestrutura do Laboratório de Plasmas Tecnológicos (LaPTec) da UNESP, Sorocaba, no qual os filmes de HMDSO foram polimerizados e caracterizados.

Ao meu namorado **Vinicius**, que está sempre ao meu lado em todos os momentos, deixando-os muito mais felizes e maravilhosos. Uma pessoa maravilhosa de um coração grande e bondoso!!! Agradeço a Deus sempre por ter colocado uma pessoa tão especial na minha vida.

O tempo é muito lento para os que esperam, muito rápido para os que têm medo, muito longo para os que lamentam, muito curto para os que festejam. Mas para os que amam, o tempo é eternidade (William Shakespeare).

Meu amor, muito obrigada por tornar meus momentos eternos e por me acompanhar nessa conquista.

Agradecimentos

Aos docentes e funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por permitirem o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Érica.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo apoio.

À Profa. Denise Madalena Palomari Espolidório, que sempre nos cedeu o uso do laboratório.

Aos Funcionários da Pós-Graduação, por toda atenção, auxílio e disponibilidade, em especial à **Mara**.

Aos Funcionários da Biblioteca, pela ajuda prestada em prol deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

A CAPES pela bolsa de doutorado e em especial à **FAPESP**, também pela bolsa de doutorado (processo 2011/22445-9) pelo auxílio à pesquisa concedido para a realização deste trabalho (processo 2012/00122-6).

À Empresa Conexão Sistema de Próteses, pela doação das amostras de titânio.

Aos estimados amigos de Pós-Graduação pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas de Sorocaba por tirar todas as dúvidas e pelo carinho.

Aos meus amigos **André** e **Fer Izumida** que, com muito carinho e paciência, me acompanham em momentos de dificuldade e alegria.

Aos queridos amigos **Ju Godoy, Selma Gaudiosi, Luizinho Borelli, Gisele Esper, Bruna Lopes, Aninha Falone, Thallita Queiroz, Marcelo Del´Acqua** que sempre mostraram gestos de carinho, atenção e delicadeza e me fizeram perceber o quanto vocês são especiais! Obrigada pela amizade!!

Aos familiares, **Tia Cássia, Tio João, Lucas, Tia Lucia, Melissa, Milena, Tio Sergio, Tia Marta e sua família** por darem muito apoio, carinho, atenção nos momentos difíceis!! A presença de vocês em nossas vidas têm sido muito importante. Agradeço a Deus por fazerem parte da minha família!

À técnica **Raissa** que sempre me ajudou com muito carinho e muita atenção.

À minha psicóloga **Tatiana Nagliati**, excelente profissional e amiga, por sempre me orientar nas condutas e decisões. Ao seu marido **Dr. Julio Nagliati** por sempre me atender prontamente e fazer o melhor tratamento necessário.

À **Tia Nadir, ao Tio Marco, à Patrícia e ao César** por sempre acreditarem e torcerem por mim.

À **Nea, Edy e Carol** por ter sempre a paciência de organizar tudo o que preciso e me ajudarem com os cuidados dos meus pais.

Muito obrigado a todos aqueles que, direta ou indiretamente,

fizeram parte desta etapa de minha vida!

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
(Antoine de Saint-Exupéry)

Resumo

Wady AF. Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO. [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de odontologia da Unesp, 2015.

Resumo

Os materiais odontológicos atuam como substrato para a adesão dos microrganismos e, consequentemente, desenvolvimento do biofilme. Tendo em vista que as características de superfície dos materiais podem interferir na adesão inicial, alterações dessas características podem prevenir ou diminuir a adesão de bactérias e fungos, evitando assim, o desenvolvimento da doença. Outro aspecto a ser considerado é que, na cavidade oral, as superfícies são recobertas pela saliva, formando um fino filme denominado película adquirida. Para simular as condições bucais, os estudos in vitro têm utilizado o condicionamento prévio em saliva humana antes da formação do biofilme. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da deposição de filmes polimerizados a plasma a partir do composto organometálico hexametildisiloxano (HMDSO), nas características de superfície de materiais odontológicos (titânio, zircônia e resina acrílica), bem como na formação de biofilmes sobre esses materiais, com e sem armazenamento em saliva humana. Para isso, o HMDSO foi utilizado no processo PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) para a deposição de filmes nas superfícies dos corpos de prova, de maneira que resulte na formação de filmes com características hidrofóbicas ou hidrofílicas. Corpos de prova de cada um dos materiais foram mantidos sem deposição de filmes (grupos controles). A caracterização dos filmes obtidos foi realizada através de espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), medida de ângulos de contato e energia de superfície, espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) e perfilometria. Para avaliação da

formação de biofilmes, metade dos corpos de prova (10 × 2 mm) dos grupos experimentais e controles foram armazenados em saliva humana previamente preparada e, posteriormente, incubados com 1 × 10^7 células/mL tanto para *C. albicans* (para a resina acrílica) como para *P. gingivalis* (para o titânio e a zircônia). Amostras sem armazenamento em saliva também foram incubadas nos respectivos microrganismos. Após os períodos de formação dos biofilmes, esses foram avaliados por meio da contagem de colônias (UFC/mL). Foi possível desenvolver filmes a partir de HMDSO em todos os materiais avaliados. Os valores de formação de biofilme de *Candida albicans* em resina acrílica, sem pré-condicionamento em saliva, foram menores para os filmes com maior valor de ângulo de contato. Houve pequena redução na formação de biofilme de *Porphyromonas gingivalis* nos filmes depositados no titânio e na zircônia. Quando houve pré-condicionamento em saliva, a formação de biofilme de *C. albicans* em resina acrílica foi maior do que quando não houve pré-condicionamento. Nos corpos de prova de titânio e zircônia, o pré-condicionamento proporcionou redução da formação de biofilme de *P. gingivalis*.

Palavras-chave: *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, saliva, biofilmes, Prótese Dentária

Abstract

Wady AF. Evaluation of surface characteristics and biofilm formation on dental materials treated with HMDSO plasmas. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp, 2015.

Abstract

Dental materials act as substrates for the adhesion of microorganisms, and consequently, for biofilm development. Given that the surface characteristics of materials may interfere in the initial adhesion, changes in these characteristics may inhibit or reduce the adhesion of bacteria and fungi, thus preventing the development of diseases. Another aspect to consider is that, in the oral cavity, surfaces are covered with saliva, forming a thin film referred to as acquired salivary pellicle. In order to simulate oral conditions, in vitro studies have used preconditioning in human saliva before biofilm formation. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of plasma polymerized films on the surface characteristics of dental materials (acrylic resin, titanium and zirconia), as well as on the biofilm formation on these materials, with and without preconditioning in human saliva. For this purpose, the monomer hexamethyldisiloxane HMDSO was used as precursor in the PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) process. Deposition parameters were varied to produce a range of films with hydrophobic or hydrophilic characteristics. Specimens of each material without film deposition were used as controls. Characterization of the films was performed by Fourier Transformed infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), contact angle measurements and surface free energy, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and profilometry. To evaluate biofilm formation, half of the test specimens (10 × 2 mm) of the experimental and control groups were stored in previously prepared

human saliva and afterwards incubated with 1 × 10^7 cells/mL of both *Candida albicans* (for acrylic resin) and *Porphyromonas gingivalis* (for titanium and zirconia). Samples without preconditioning in saliva were also incubated in the respective microorganisms. After the periods of biofilm formation, these were evaluated by counting the colony-forming units (CFU/mL). It was possible to develop films from HMDSO on all the materials evaluated. The values of *C. albicans* biofilm formation on acrylic resin, without preconditioning in saliva, were lower for the films with higher contact angle value. There was a small reduction in *P. gingivalis* biofilm formation on the films deposited on titanium and zirconia. *C. albicans* biofilm formation on acrylic resin was higher in the saliva-coated specimens than on the uncoated specimens. For titanium and zirconia, preconditioning of the test specimens in saliva resulted in a reduction of *P. gingivalis* biofilm formation.

Key Words: *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, saliva, biofilms, Dental Prosthesis.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....21

2 REVISÃO DA LITERATURA.....29

2.1 Estudos Sobre Adesão e Formação de Biofilme Microbiano.....29

2.2 Estudos Sobre Filmes de HMDSO Polimerizados a Plasma.....71

2.3 Estudos Sobre Película Salivar.....77

3 PROPOSIÇÃO.....83

4 MATERIAL E MÉTODO.....85

4.1 Confecção dos Corpos de Prova de Resina Acrílica.....85

4.2 Medida da Rugosidade Superficial (Ra).....86

4.3 Deposição e Caracterização de Filmes de HMDSO nos Corpos de Prova.....87

4.4 Pós-tratamento Com O_2.....90

4.5 Limpeza a Plasma.....91

4.6 Testes Microbiológicos.....91

4.6.1 Microrganismos e condições de crescimento.....91

4.6.1.1 Preparo do inóculo de *C. albicans*.....**91**

4.6.1.2 Preparo do inóculo de *P. gingivalis*.....**91**

4.7 Coleta, Preparo e Pré-Condicionamento dos Corpos de Prova com Saliva Humana.....93

4.8 Formação dos Biofilmes.....94

4.8.1 Biofilme de *C. albicans*.....94

4.8.2 Biofilme *P. gingivalis*.....95

4.9 Análises dos Biofilmes.....96

4.10 Determinação da Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC).....97

5 RESULTADO.....99

5.1 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Resina Acrílica.....99

5.1.1 Filmes hidrofóbicos.....99

5.1.1.1 Espessura**.....99**

5.1.1.2 Ângulo de contato**.....100**

5.1.1.3 Energia livre de superfície**.....101**

5.1.1.4 Composição dos filmes (análise de XPS)**.....102**

5.1.1.5 FTIR**.....103**

5.1.1.6 Rugosidade**.....106**

5.1.1.7 Análises de MEV**.....107**

5.1.1.8 Formação de biofilme de *C. albicans***.....109**

*5.1.1.8.1 Sem pré-condicionamento em saliva***.....109**

*5.1.1.8.2 Com pré-condicionamento em saliva***.....110**

5.1.2 Filmes hidrofílicos (pós-tratamento com O_2).....110

5.1.2.1 Espessura**.....110**

5.1.2.2 Ângulo de contato**.....110**

5.1.2.3 Composição dos filmes (Análise de XPS)**.....111**

5.1.2.4 Espectros de infravermelho – FTIR**.....113**

5.1.2.5 Rugosidade**.....114**

5.1.2.6 Análises de MEV**.....115**

5.1.2.7 Formação de biofilme de *C. albicans***.....116**

*5.1.2.7.1 Sem pré-condicionamento em saliva***.....116**

*5.1.2.7.2 Com pré-condicionamento em saliva***.....117**

5.1.2.8 Hidrofobicidade celular**.....118**

5.2 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Titânio.....118

5.2.1 Ângulo de contato.....118

5.2.2 Energia livre de superfície.....120

5.2.3 Composição dos filmes (Análise de XPS).....120

5.2.4 Espectros de infravermelho – FTIR.....123

5.2.5 Rugosidade.....125

5.2.6 MEV.....125

5.2.7 Formação de biofilme de *P. gingivalis*.....127

5.2.7.1 Sem pré-condicionamento em saliva**.....127**

5.2.7.2 Com pré-condicionamento em saliva**.....128**

5.3 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Zircônia.....129

5.3.1 Espessura.....129

5.3.2 Ângulos de contato.....130

5.3.3 Energia livre de superfície.....131

5.3.4 Composição dos filmes (análise de XPS).....131

5.3.5 Espectros de infravermelho – FTIR.....133

5.3.6 Rugosidade.....135

5.3.7 MEV.....135

5.3.8 Formação de biofilme de *P. gingivalis*.....136

5.3.8.1 Sem pré-condicionamento em saliva**.....136**

5.3.8.2 Com pré-condicionamento em saliva**.....137**

5.3.9 Hidrofobicidade celular da *P. gingivalis*.....138

6 DISCUSSÃO.....140

7 CONCLUSÃO.....162

REFERÊNCIA.....165

Anexo.....183

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes têm sido descritos como comunidades diversas de microrganismos, que apresentam estruturas dinâmicas e complexas, envoltas por matriz polimérica extracelular[21, 42, 44, 45, 81, 82, 112]. Esses biofilmes usualmente estão aderidos a substratos sólidos, situados em ambientes úmidos ou líquidos[44, 45, 82, 91]. Especificamente na cavidade oral, várias espécies de microrganismos têm sido identificadas[44, 45, 77, 82] e os biofilmes orais têm sido reconhecidos como fatores etiológicos de diversas doenças[8, 9, 44, 45, 81, 105].

Uma patologia associada à presença de biofilme é a candidíase que comumente afeta as mucosas urogenital, orofaríngea, esofágica e gastrointestinal[48, 82]. A candidíase oral, associada à utilização de próteses removíveis, tem sido denominada de estomatite protética[82, 107]. Um dos fatores que tem sido associado com essa patologia é a presença de *Candida albicans*[40, 109] nas superfícies protéticas[53, 70, 80, 107, 108, 117], que atuam como reservatório de microrganismos[17, 64].

A periodontite é, também, uma das doenças mais comuns da cavidade oral, mediada por processo inflamatório e iniciada pelo biofilme sub-gengival[44, 45]. As áreas subgengivais são banhadas pelo fluido crevicular, rico em compostos nitrogenados, e apresentam pH neutro e ambiente anaeróbio. Essas condições promovem o desenvolvimento de bactérias anaeróbias como *Fusobacterium, Eubacterium, Campylobacter, Prevotella e Porphyromonas*[106].

Os implantes osseointegrados de titânio têm sido utilizados para a reabilitação oral de pacientes total ou parcialmente desdentados e, usualmente, têm apresentado altas taxas de sobrevivência[78]. Entretanto, a inflamação dos tecidos periimplantares, devido à presença de biofilmes bacterianos[21], tem sido apontada

como uma das causas de falhas dos implantes[41, 78]. A peri-implantite pode ser diretamente relacionada à infecção mista de microrganismos anaeróbios, sendo a *Porphyromonas gingivalis* presente em grande quantidade no biofilme supra e sub-gengival em peri-implantites[28, 103].

As porcelanas também têm sido amplamente empregadas na Odontologia e, em função dos avanços dos sistemas de cerâmicas puras[102], houve aumento significativo no número de restaurações denominadas livres de metal ou metal-free. E, devido à demanda dos pacientes por restaurações estéticas, os pilares de cerâmica têm ganhado popularidade[131]. Um material que tem sido amplamente utilizado para a confecção de pilares é a zircônia[32], devido às suas propriedades mecânicas superiores às da alumina[32, 43].

Estudos in vitro e in vivo têm demonstrado a adesão de microrganismos tanto às superfícies do titânio como da zircônia[2, 11, 12, 13, 18, 19, 25, 37, 55, 58, 66, 67, 92, 93, 95, 100, 112, 134]. Embora alguns estudos tenham observado que a zircônia foi menos susceptível à adesão de microrganimos que o titânio[2, 3, 37, 67, 92, 100], outros não encontraram diferenças significativas[13, 25, 55, 58, 67, 93, 95, 112]. Assim, apesar de ter sido sugerido que a zircônia pode reduzir a adesão inicial de bactérias (< 24 horas) quando comparada ao titânio, ainda não está claro se essa característica resulta em benefício clínico[66]. E, enquanto vários pesquisadores avaliaram o titânio, estudos sobre a adesão microbiana à zircônia são recentes e mais informações ainda são necessárias[35, 37.]

A presença de patologias orais como a periodontite pode resultar na infecção de outros órgãos[106]. A contínua deglutição ou aspiração de microrganismos presentes no biofilme formado nas superfícies das próteses também constitui risco de infecções sistêmicas[109]. A presença de *C. albicans* no trato respiratório de pacientes hospitalizados, submetidos à ventilação mecânica, tem papel significativo

no desenvolvimento da pneumonia bacteriana[89]. A candidemia, infecção sanguínea extremamente séria causada, predominantemente, por *C. albicans*, pode levar à mortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos[48, 82]. Da mesma forma, a periodontite tem sido considerada como fator de risco de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e diabetes mellitus com controle glicêmico deficiente[8]. Considerando-se que patógenos periodontais podem contribuir para complicações sistêmicas na presença de periodontite, riscos para a saúde podem também estar associados com a peri-implantite[14].

A formação dos diversos biofilmes inicia-se com o mecanismo de adesão, um processo complexo mediado pela interação entre os microrganismos e as propriedades da superfície dos substratos[105]. Tem sido relatado que a rugosidade pode favorecer a adesão de bactérias e fungos às superfícies dos materiais como titânio[2, 12, 37, 76, 105] zircônia[2, 37] e resina acrílica[53, 70, 80, 108, 117]. Nesse contexto, o valor de 0,2 μm tem sido considerado como o limite de rugosidade média abaixo do qual a adesão microbiana não pode ser reduzida significativamente[10, 27].

Outro fator que tem sido considerado importante no processo de adesão microbiana e formação dos biofilmes é a energia livre da superfície do substrato, que proporciona medida das forças atrativas intermoleculares ou interfaciais[134]. Uma maneira de se estudar as propriedades termodinâmicas de superfície das primeiras monocamadas de um sólido é por meio de experimentos de ângulo de contato, θ, definido como o ângulo na interseção entre um plano tangente à gota e a superfície onde o líquido se encontra depositado[83, 84]. A influência da energia de superfície na adesão microbiana tem sido intensivamente investigada com a conclusão frequente de que a adesão é menor a superfícies com baixa energia, isto é, hidrofóbicas[1, 68, 124]. Outros estudos também têm relatado que materiais, como o titânio, com

superfícies hidrofílicas (alta energia) seriam mais favoráveis à adesão microbiana[105, 110]. Entretanto, resultados contraditórios têm sido obtidos, com maior aderência de microrganismos em superfícies hidrofóbicas[13, 50]. Há autores, ainda, que relataram que não houve relação significativa entre a energia de superfície e a adesão microbiana[35, 36, 61]. Segundo Minagi et al.[64] (1985), quanto mais próxima a energia livre de superfície do substrato e a do microrganismo, maior a probabilidade de aderência. Outros estudos também observaram que a energia do microrganismo pode influir nos resultados[60, 61].

Em função dos aspectos apontados, a modificação da superfície dos materiais tem sido proposta para prevenir a adesão dos microrganismos e formação de biofilmes. Uma técnica altamente efetiva para modificar superfícies, com a vantagem de não alterar as propriedades de camadas profundas (“bulk”) dos materiais, é o plasma[7, 126]. As condições de processamento que incluem potência, pressão e composição química do plasma e a natureza do substrato irão determinar se a modificação da superfície ocorrerá por meio da deposição de um filme, incorporação ou remoção de espécies, ou ainda por alterações estruturais induzidas por modificações químicas[7]. O processo de deposição de filme, denominado polimerização a plasma, ocorre quando um composto orgânico ou organometálico, conhecido como monômero, compõe a atmosfera usada para excitar o plasma. Devido à possibilidade de ocorrer intensa fragmentação molecular do monômero e, então, da estrutura conter ligações cruzadas, esses filmes, geralmente, apresentam forte adesão aos substratos[7, 79] e resultam em superfícies lisas, sem a presença de falhas ou defeitos (pinhole-free homogeneous). Além disso, filmes que possuem elevada estabilidade química, física e mecânica[79] podem ser produzidos por essa técnica. Qualquer composto na fase gasosa, ou que possa ser evaporado pode ser

usado como um precursor do filme. Nesse contexto, o hexametil disiloxano (HMDSO) é um monômero que pode ser polimerizado a plasma por meio do rearranjo de radicais produzidos pela dissociação induzida por impacto de elétrons[126]. O HMDSO é seguro, relativamente barato, de fácil manipulação e obtenção[39, 52, 79].

Há relatos de estudos que produziram superfícies hidrofóbicas por meio do tratamento a plasma com HMDSO[39, 69, 85, 126]. Entretanto, tem sido demonstrado que as propriedades dos filmes depositados a plasma dependem dos parâmetros da descarga, de modo que a escolha correta dos mesmos pode resultar em propriedades adequadas para uma dada aplicação. Variando os parâmetros de processamento (densidade do plasma, velocidade de escoamento do monômero e tempo de deposição, Krasteva et al.[52] (2010) realizaram a deposição de filmes ultrafinos de HDMSO com baixa molhabilidade, que foram rapidamente hidrofilizados por meio de tratamento a plasma de amônia. Michaeli et al.[63] (1993) também realizaram a polimerização a plasma do HDMSO sobre amostras de polimetil metacrilato e observaram que a tensão superficial pode variar, dependendo se o revestimento é preparado a partir do HDMSO puro ou misturado a outros gases. Outros estudos realizaram a polimerização a plasma do HDMSO com subsequente tratamento a plasma de oxigênio e obtiveram filmes com ângulos de contato que variaram de cerca de 0 a 106°[119, 124]. Bayram et al.[6] (2010) e Radeva et al.[79] (2010) mostraram, ainda, que os filmes preparados a partir de plasmas de HMDSO são biocompatíveis e não apresentaram efeito citotóxico na proliferação celular.

A interação entre microrganismos e superfícies modificadas por polimerização a plasma do HDMSO também tem sido investigada[56]. Saulou et al.[98] (2009) avaliaram amostras de aço inoxidável tratadas em plasma de HMDSO e verificaram

aumento na molhabilidade da superfície, manutenção da rugosidade e adesão significativamente reduzida de *Saccharomyces cerevisiae* tendo sido a maioria das células completamente removida com força (shear stress) considerada moderada. Esses resultados foram atribuídos à repulsão hidrofílica e ausência de transferência de carga entre o filme e a superfície fúngica. Resultados semelhantes foram relatados por Guillemot et al.[33] (2008), Mercier-Bonin et al.[62] (2012) e Saulou et al.[99] (2012) que observaram que, para o aço inoxidável sem tratamento, ocorreu forte adesão do fungo *S. cerevisiae*[99] e da bactéria *Escherichia coli*[62] e nenhuma célula foi removida com forças entre 70 a 100 Pa. Já para as superfícies modificadas com deposição do filme de HMDSO, foi observado que apenas aproximadamente 20% das células permaneceram aderidas.

Diante do exposto, os filmes depositados a plasma apresentam potencialidade para a modificação das propriedades de superfície de biomateriais tendo em vista que o processo é seco, limpo, rápido, barato e de fácil execução[87]; proporciona materiais uniformes, homogêneos, livres de defeitos e com propriedades fortemente dependentes dos parâmetros de deposição[87]; ocorre em baixa temperatura (cold plamas), permitindo o processamento de materiais que não resistem ao calor excessivo. De forma geral, o processo utilizado, conhecido como PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition), apresenta vantagens como custo acessível; ecologicamente correto[7], uma vez que não há geração de resíduos nocivos[29]; obtenção de filmes com alto grau de uniformidade, mesmo em substratos com formatos complexos[5], e com ampla gama de propriedades por meio do controle dos parâmetros do processo[115]. Entretanto, apesar de tratamentos a plasma já terem sido realizados na Odontologia[127, 128, 129], ainda há poucos estudos sobre a técnica de PECVD para a polimerização a plasma, utilizando o HDMSO[39, 49, 116].

Outro aspecto a ser considerado é que, na cavidade oral, as superfícies das próteses fixas e removíveis são recobertas pela saliva, formando um fino filme denominado película adquirida[121, 129], que também tem sido apontada como um dos fatores envolvidos no complexo processo de adesão e colonização de microrganismos, tanto às superfícies orgânicas quanto inorgânicas[13, 54, 58, 61, 75, 94]. A película, que é uma camada de bio-polímero com ligações cruzadas de alta tenacidade, com proteínas, enzimas e lipídios em sua composição 88, representa a interface entre o substrato e o meio ambiente oral, desempenhando um papel fundamental na mediação do processo de bio-adesão[47, 88]. Em geral, tem sido relatado que a presença de uma película salivar pode influenciar a quantidade e a qualidade de aderência aos substratos[94], mas permanece controverso se o revestimento salivar reduz ou aumenta a adesão[24, 26, 74]. Assim, para simular as condições bucais, os estudos in vitro[12, 13, 57, 73, 88, 96] têm utilizado o condicionamento prévio em saliva humana antes da formação do biofilme.

A presença de saliva pode alterar as propriedades das superfícies[121]. Por outro lado, as características químicas e físicas da superfície dos biomateriais também influenciam a formação e a composição da película salivar[65, 121, 122] e superfícies com diferenças em suas composições químicas e energia de superfície diferem com relação à adsorção de proteínas salivares[23, 54, 71, 104, 121].

Com base nessas considerações, foi considerado oportuno avaliar filmes de HMDSO polimerizados a plasma sobre materiais utilizados na confecção de próteses fixas e removíveis (resina acrílica, titânio e zircônia) quanto às características superficiais, bem como ao possível efeito na formação de biofilmes microbianos, na presença ou ausência de saliva.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estudos Sobre Adesão e Formação de Biofilme Microbiano

Em 1985, Minagi et al.[64] utilizaram 21 materiais resinosos, a *C. albicans* IFO 1385 e a *C. tropicalis* IFO 1400 com o objetivo de examinar o efeito da hidrofobicidade de superfície dos substratos na aderência microbiana. Entre os materiais resinosos utilizados, 9 eram termopolimerizáveis, 2 autopolimerizáveis, 9 reembasadores de próteses resilientes e 1 polissulfeto. Os corpos-de-prova, com dimensões de 10 × 10 mm e superfícies lisas, foram contaminados por 1 hora a 37 ºC, com suspensões fúngicas em uma concentração de 10^7 células/mL para Candida albicans e 10^5 células/mL para *Candida tropicalis*. Após esse período, os mesmos foram lavados em PBS, fixados com formaldeído e metanol, corados com violeta cristal e analisados em microscopia. A contagem das células aderidas foi realizada em 10 campos para cada uma das amostras (n=7) e a média entre eles obtida. Além disso, foram realizadas medições dos ângulos de contato dos substratos e das células fúngicas. Os autores observaram que o aumento do ângulo de contato dos materiais estudados resultou em um aumento no número de células aderidas para *Candida tropicalis*, enquanto uma diminuição foi observada para *Candida albicans*. Além disso, foi notada uma relação entre a energia livre de superfície da resina, obtida por meio dos valores de ângulos de contato, e a aderência dessas duas espécies, ou seja, o aumento da energia livre da resina resultou em aumento da aderência de *Candida albicans*, por outro lado, uma diminuição da aderência de *Candida tropicalis*. Os autores concluíram que a presença de correlação entre a alteração de energia livre e aderência fúngica sugere

que a interação hidrofóbica é um importante fator na adesão inicial dos fungos às superfícies resinosas.

Verran et al.[117], em 1997, relataram que a adesão de microrganismos às superfícies de próteses removíveis é pré-requisito para a colonização. Este estudo comparou a retenção de Candida albicans sobre resina acrílica e silicone com superfícies lisas e rugosas após procedimento de lavagem para determinar o efeito da rugosidade da superfície sobre a infecção da prótese e a higiene. Amostras de resina acrílica e silicone, lisas e rugosas, foram incubadas em suspensões padronizadas de células de *C. albicans* durante 1 hora a 24 °C. Após lavagem, as células aderidas nas superfícies foram coradas com laranja de acridina e examinadas por microscopia de fluorescência. Para as superfícies lisas, não houve diferença significativa no número de células entre os dois materiais. Números significativamente maiores de células aderidas foram observados em superfícies rugosas (silicone > resina acrílica) quando comparadas com assuperfícies lisas.. Silicones utilizados em próteses foram processados contra gesso. A rugosidade da superfície obtida pode facilitar a retenção microbiana e a infecção, e, dessa forma, deve ser reduzida a um mínimo. Os autores concluíram que o aumento na rugosidade, seja nas superfícies de resina acrílica ou silicone, facilitou a retenção fúngica.

Também em 1997, Bollen et al.[10] reportaram que a rugosidade de superfícies duras intra-orais pode influenciar a adesão bacteriana. Assim, os autores realizaram uma revisão que avaliou a rugosidade inicial da superfície de vários materiais duros intra-orais, bem como as alterações nessa rugosidade, como consequência de

diferentes modalidades de tratamento. Artigos encontrados através de buscas no Medline foram incluídos na revisão, observando os seguintes critérios: 1) apresentou valores limites de rugosidade superficial e considerou as alterações na rugosidade da superfície, devido às diferentes técnicas de manipulação; ou 2) incluiu condições padronizadas de superfície que podem ser comparadas com a superfície tratada. Foi observado que, recentemente, alguns estudos in vivo, sugeriram um limite de rugosidade para a retenção de bactérias de Ra = 0,2 μm, abaixo do qual nenhuma redução adicional no acúmulo de bactérias poderia ser esperada. Aumento da rugosidade da superfície acima desse limite de rugosidade, no entanto, resultou num aumento simultâneo do acúmulo de placa bacteriana, aumentando assim o risco de cárie e doença periodontal. A rugosidade inicial da superfície de diferentes materiais odontológicos (por exemplo, dentes, pilares, ouro, amálgama, resina acrílica, resina composta, ionômero de vidro ou compósitos e cerâmica) e os efeitos de diferentes modalidades de tratamento (por exemplo, polimento, escovação, condensação ou acabamento) nessa rugosidade foram analisados e comparados com o limite máximo de 0,2 μm. Os efeitos microbiológicos dessas modalidades de tratamento, também foram discutidos e comparados com recentes dados in vivo. Com base na revisão realizada, foi observado que diferentes superfícies duras intra-bucais podem apresentar grande faixa de valores, entre máximos e mínimos, de rugosidade superficial, e que o impacto de tratamentos dentários sobre a rugosidade é dependente do material. Algumas técnicas clínicas resultam em superfícies muito lisas (compressão de compósitos contra matrizes), enquanto outras técnicas tornam as superfícies rugosas (aplicação de instrumentos manuais em ouro). Esses resultados indicaram que todos os materiais dentários precisam de uma modalidade

de tratamento específica, a fim de obter e de manter a superfície tão lisa quanto possível.

Radford et al.[80], em 1998, tiveram como objetivos avaliar a aderência in vitro de *Candida albicans*, em materiais para base de prótese rígidos e resilientes com diferentes rugosidades de superfície, e observar o efeito da película salivar sobre aderência de *Candida* a essas superfícies. Foram realizados ensaios de adesão in vitro em resina acrílica (Trevalon), Molloplast B e Novus utilizando a cepa de *C. albicans* NCPF 3153A. As superfícies para os ensaios foram preparadas utilizando-se instrumentos rotatórios. Além disso, para o estudo foi utilizada saliva total não estimulada, clarificada e obtida de cinco doadores. Os resultados mostraram que houve maior adesão de *C. albicans* nas superfícies rugosas que nas lisas, bem como maior adesão aos materiais reembasadores resilientes em comparação com a resina acrílica. O condicionamento em saliva diminuiu a adesão de *C. albicans* em todos os materiais. Dessa forma, este estudo demonstrou que para um determinado material para base de prótese, o aumento da rugosidade da superfície conduz ao aumento da adesão de *Candida*, mas não parece existir relação direta entre a rugosidade da superfície e adesão independentemente do material. A presença da película de saliva reduziu a adesão. Em muitos casos, essa redução foi considerável, diminuindo o efeito das diferenças de rugosidade e de energia livre de superfície entre materiais. Em estudos de adesão é importante a utilização de materiais que sejam adequados à clínica odontológica. Nesses estudos, resinas acrílicas termopolimerizáveis e materiais reembasadores resilientes tem sido utilizados com a intenção de se obter resultados clinicamente relevantes. Em termos clínicos, os resultados indicam que superfícies que podem favorecer o

desenvolvimento de biofilme microbiano devem ser manipuladas no laboratório e na clínica de maneira a produzir superfícies lisas. Isso levará à reduzida aderência e colonização de *C. albicans*, um patógeno oportunista, comumente associado ao uso de prótese.

Ainda em 1998, Taylor et al.[108] avaliaram o efeito do acabamento de superfície de materiais odontológicos sobre a subsequente contaminação por microrganismos. Para isso, foi comparada a adesão de *Streptococcus oralis*, *Actinomyces viscosus* e *Candida albicans* em amostras de liga de cobalto-cromo e de resina acrílica, submetidas a polimento convencional, eletrolítico e jateamento com partículas de óxido de alumínio de granulação fina ou grossa. Suspensões padronizadas de células dos microrganismos foram incubadas com os materiais avaliados, durante 1 hora a 37 °C, e, em seguida, as células aderidas foram contadas por meio de análise de imagem (área percentual de um campo do microscópio coberta por células). A retenção de células bacterianas foi substancial (*S. oralis* 12% a 20% e *A. viscosus* 9% a 16%), independentemente do acabamento da superfície. A retenção máxima foi observada em amostras de liga de cobalto-cromo que tinham sido submetidas ao jateamento com partículas finas e polimento eletrolítico. Para *C. albicans*, aumento da rugosidade da superfície (0,15 a 3,53 μm) resultou em aumento na retenção fúngica (3% a 9%). O tamanho das células e o tipo de rugosidade alteram significativamente a retenção de microrganismos em superfícies. O polimento eletrolítico em ligas de cobalto-cromo não reduziu a rugosidade da superfície ou a subsequente adesão de células.

van der Mei, Bos e Busscher[113], em 1998, relataram que as interações ácido-base formam a origem da hidrofobicidade da superfície das células microbianas e podem ser quantificadas a partir de medidas de ângulo de contato com água, formamida, iodeto de metileno e / ou α-bromonaftaleno. Esta revisão proporciona um guia de referência para a hidrofobicidade celular microbiana baseada em ângulos de contato com os quatro líquidos e envolve *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans, actinomyces, Brevibacterium linens*, várias espécies de *Candida, Capnocytophaga gingivalis, Enterococos, Escherichia coli, lactobacilos, Leuconostoc mesenteroides, peptostreptococos, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, pseudomonas, Serratia marcescens, estafilococos e estreptococos*, somando um total de 142 isolados entre os quais muitas cepas ATCC e NCTC e duas cepas padrão. A comparação dos resultados de uma análise de ácido-base das superfícies de células microbianas, com base nos ângulos de contato para as duas últimas cepas, e os resultados do método que mede a adesão microbiana aos hidrocarbonos, para determinar a hidrofobicidade da superfície celular, demonstraram que somente os ângulos de contato podem proporcionar uma estimativa real de hidrofobicidade celular. Além disso, os dados de ângulo de contato apresentados, torna claro que não podem ser feitas generalizações sobre as propriedades físico-químicas da superfície de microrganismos.

Rimondini et al.[92], em 2002, avaliaram a colonização microbiana de novos materiais cerâmicos desenvolvidos para a confecção de pilares protéticos sobre implantes. Os materiais utilizados foram discos cerâmicos de zircônia tetragonal estabilizada com ítrio (Y-TZP) e titânio comercialmente puro grau 2 (Ti) e seus correspondentes eluatos. Foram realizados testes, in vitro, com as seguintes

bactérias: *Streptococcus mutans, S. sanguis, Actinomyces viscosus, A. naeslundii, e Porphyromonas gingivalis*. A proliferação bacteriana foi avaliada em placas por meio de halos de inibição ao redor dos locais previamente inoculados com os eluatos obtidos a partir dos materiais. Já a adesão bacteriana nos materiais foi quantificada por espectrofotometria, avaliando a produção de “slime” pelas mesmas bactérias. Além disso, a adesão bacteriana inicial foi avaliada em voluntários e observada com MEV. Não foi observada inibição da proliferação bacteriana com a utilização dos eluatos. In vitro, os discos Y-TZP de zircônia sinterizada (“as-fired”) e altamente polida mostraram significativamente mais *S. mutans* aderidos que os discos de Ti, enquanto *S. sanguis* pareceu aderir facilmente nos espécimes de Ti. Não foram observadas diferenças para *Actinomyces spp e P. gingivalis*. In vivo, Y-TZP acumulou menos bactérias do que Ti em termos do número total de bactérias e presença de potenciais agentes patogênicos. Em geral, Y-TZP permitiu menor adesão de bactérias do que Ti, e pode ser considerado como um material promissor para a confecção de pilares protéticos sobre implantes.

Em 2003, Lamfon et al.[53] avaliaram a formação de biofilmes de *C. albicans* em superfícies de esmalte, dentina e resina acrílica, com diferentes rugosidades. Para isso, um isolado clínico de *C. albicans* (genótipo A) foi utilizado para o preparo do inóculo. Os substratos utilizados foram submetidos ao polimento com lixas, tendo sido utilizadas para a resina acrílica as granulações de n° 1000 (rugosidade superficial resultante de 2,5 Ra), 500 (3,5 Ra) e 80 (9,3 Ra), enquanto para o esmalte e a dentina, a rugosidade obtida com o polimento foi de 2,5 Ra. Os discos foram colocados em sistema que permite obter filmes com espessura constante (“constant depth film fermenter” – CDFF) que foi estabelecida para este estudo em

300 μm. O inóculo (10 ml da cultura + 500 ml de saliva artificial) foi bombeado no sistema por 6 horas. A fonte de nutrientes utilizada foi saliva artificial com conteúdo de mucina (fluxo de 0,72 L/dia). Em vários intervalos, até o período total de 96 horas, os biofilmes foram removidos do CDFF, agitados e diluídos em solução de PBS. Com o auxílio de hemocitômetro e microscópio de luz, com aumento de 40 vezes, o número de leveduras e hifas foi contado. Os biofilmes também foram analisados por meio de microscopia confocal à laser (3 amostras eram avaliadas em cada intervalo). Os resultados obtidos revelaram que o número de leveduras presentes no esmalte foi maior que nos demais substratos e que o número de leveduras foi maior que o número de hifas em todas as superfícies, em todos os períodos avaliados. Os números mais elevados de leveduras foram observados nas superfícies rugosas, no período de 6h; entretanto, números maiores de hifas foram encontrados no esmalte nos períodos de 6 e 24h. Além disso, foi relatado que a maturação dos biofilmes de *C. albicans* depende, possivelmente, de microrganismos em forma de hifas, tendo sido observado maior número de leveduras e hifas nas superfícies mais rugosas que nas superfícies polidas. A estrutura dos biofilmes também foi influenciada pela rugosidade superficial: nas superfícies mais rugosas, a formação do biofilme pareceu estar alinhada com os sulcos da superfície deixados pelas lixas, enquanto nas superfícies mais polidas, o biofilme formou-se em discretos aglomerados, com larga área da superfície não colonizada. Com isso, tanto o tipo de substrato quanto a rugosidade superficial influenciaram a formação inicial e consequente desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*. De acordo com o que foi observado na microscopia confocal a laser, os autores concluíram que a organização do biofilme depende da rugosidade superficial e sua maturação está relacionada com os microrganismos em forma de hifas.

No ano seguinte, Scarano et al.[100] relataram que há pouco conhecimento sobre os mecanismos de interação bacteriana com materiais de implante na cavidade oral. Tem sido relatada correlação entre o acúmulo de placa e perda óssea progressiva ao redor de implantes. A adesão bacteriana mostra correlação direta positiva com a rugosidade da superfície. Outras características de superfície também parecem ser extremamente importantes no que diz respeito à formação de placa. Diferentes afinidades de adesão de bactérias têm sido relatadas para os diferentes materiais. Com base nesses aspectos, os autores realizaram este estudo com o objetivo de caracterizar a percentagem de superfície coberta por bactérias em discos de titânio comercialmente puro e de óxido de zircônia. Dez pacientes participaram do estudo. Um dispositivo removível de resina acrílica foi adaptado na região de pré-molares e molares, e discos de titânio comercialmente puro (controle) e de óxido de zircônia (experimentais) foram fixados na parte vestibular de cada dispositivo que foram utilizados pelos participantes durante 24 horas. A rugosidade de todos os discos era similar, com valor médio de 0,73 ± 0,05 µm para o titânio e de 0,76 ± 0,06 µm para os de zircônia. Após esse período, os discos foram removidos e processados para análise em microscopia eletrônica de varredura, e avaliados em relação à área de superfície coberta por bactérias. Nas amostras controle, a área coberta por bactérias foi de 19,3% (± 2,9), enquanto nas experimentais, a área foi de 12,1% (± 1,96). A área do disco coberta por bactérias nas amostras esperimentais foi significativamente menor do que nas amostras controle (P = 0,0001). Assim, os resultados demonstraram que o óxido de zircônia pode ser um material adequado para a fabricação de pilares de implantes com baixo potencial de colonização.

De acordo com Yildirim et al.[121], em 2005, um fator etiológico importante na patogênese de estomatite induzida por prótese, é a presença de numerosas leveduras, *Candida albicans*, usualmente sobre as superfícies internas da prótese. No presente estudo, foi avaliado o efeito de tratamento a plasma, técnica aplicada para aumentar a molhabilidade da superfície de resinas acrílicas, sobre a adesão de *Candida*. A durabilidade da modificação de superfície obtida com o tratamento a plasma com o condicionamento em saliva também foi estudada. As amostras, incluindo o controle e os grupos experimentais, foram preparadas utilizando a técnica convencional de inclusão e prensagem e polimerização por calor. Para obter superfícies com diferentes hidrofobicidades, os grupos experimentais foram expostos ao tratamento a plasma, excitado com radiofrequência em atmosfera de O_2 com diferentes potências (50 W e 100 W). Para caracterizar as propriedades de molhabilidade, foram realizadas mensurações de ângulo de contato pelo método da gota séssil. O microrganismo utilizado foi *C. albicans* (ATTC10321). Amostras de resina acrílica foram revestidas com saliva total coletadas de um doador do sexo masculino e saudável. A suspensão fúngica foi vertida nas amostras condicionadas em saliva e incubada a 37 º C, durante 2 h. As amostras foram, então, fixadas com glutaraldeído e as células aderidas foram examinadas por microscopia de luz. Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho com transformada de Fourier (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy - DRIFT) e análises em microscópio eletrônico de varredura, também foram realizados para avaliar a composição da superfície e a rugosidade dos grupos testados. Foi verificado que o tratamento a plasma foi eficaz em aumentar a molhabilidade da superfície, mesmo com a película salivar. O efeito foi dependente da potência utilizada durante o tratamento. Os valores de ângulo de contato, mensurados com água em amostras

de resina sem pré-condicionamento em saliva, foram de 78,65° para o grupo controle, 23,30° para as amostras tratadas com plasma de oxigênio e 50 W e de 15,35° para aquelas submetidas ao plasma de O^2 e 100 W. As quantidades de células de *Candida* aderidas foram significativamente maiores em todas as superfícies tratadas a plasma que no grupo controle (não modificado - P <0,001). Dessa forma, os autores concluíram que a melhoria da molhabilidade da superfície de resinas acrílicas com o tratamento a plasma em atmosfera de O_2 aumentou a adesão de *C. albicans*.

Conforme relatado por Pier-Francesco et al.[76], em 2006, os implantes dentários de titânio são uma opção de tratamento importante na substituição de dentes perdidos. Falhas de implante podem, no entanto, ocorrer e podem ser causadas pela perda de tecido como resultado de infecção bacteriana local (peri-implantite). Além disso, a adesão bacteriana nas superfícies de implantes pode ser influenciada pela rugosidade da superfície e parâmetros de energia livre de superfície do material. Assim, o objetivo deste estudo foi o de modificar essas propriedades do titânio e avaliar o efeito dessas modificações na adesão bacteriana. Para isso, 16 amostras de titânio com diferentes rugosidades (Ra 34,57 - 449,42 nm) foram preparadas utilizando procedimentos de polimento específicos. Seis amostras adicionais foram quimicamente alteradas por tratamento a plasma de argônio e imersão em soluções de silano para produzir diferentes hidrofobicidades de superfície. Um ensaio de adesão in vitro utilizando *Porphyromonas gingivalis* foi utilizado para avaliar o efeito das modificações na adesão bacteriana. Houve redução significativa na adesão aos materiais classificados como "muito lisos" (Ra 34,57 ± 5,79 nm). Essa redução não ocorreu nas superfícies classificadas como

“lisas” (Ra 155,00 ± 33,36 nm), "rugosas" (Ra 223,24 ± 9,86 nm) ou "muito rugosas" (Ra 449,42 ± 32,97 nm). Alterando-se a hidrofobicidade do material também não foi observado efeito na adesão bacteriana. Dessa forma, a adesão de *P. gingivalis* no titânio foi inibida em níveis de rugosidade superficial inferiores aos geralmente encontrados para as cintas dos implantes e pilares (Ra 350 nm). Esses resultados podem ser benéficos para a produção de implantes de titânio, a fim de reduzir a colonização bacteriana.

No mesmo ano, He et al.[40] reportaram que a adesão de espécies de *Candida* em resinas acrílicas é um primeiro passo essencial na patogênese da estomatite protética. Informações sobre a adesão relativa de espécies patogênicas de *Candida* não-albicans em diferentes materiais para base de prótese são escassas. Assim, o objetivo do estudo foi investigar a adesão, in vitro, de *C. albicans, C. glabrata, C. krusei e C. dubliniensis* em quatro diferentes materiais para base de prótese. Amostras de resinas termopolimerizáveis (Vertex e ProBase Hot) e de resinas autopolimerizáveis (Paladur A e Paladur B) foram preparadas utilizando um novo método e a adesão das diferentes espécies de *Candida* foi avaliada microscopicamente utilizando um sistema de imagem. Houve diferença significativa na aderência das leveduras entre a resina Vertex e os outros materiais avaliados. Apenas *C. glabrata* aderiu na resina Vertex, enquanto as demais espécies aderiram a todas as outras resinas testadas, exceto ProBase que não permitiu a adesão de *C. krusei*. Houve diferença significativa na adesão de *Candida* entre as resinas avaliadas (*C. albicans*, p = 0,039; *C. glabrata*, P = 0,002 e *C. krusei*, P = 0,000). O tipo de material base de prótese e como eles são polimerizados tem papel importante na adesão de *Candida*.

A aderência de bactérias nas superfícies de dispositivos médicos, equipamentos de processamento alimentar, trocadores de calor e cascos de navios tem sido reconhecida como um problema generalizado. O mecanismo de adesão bacteriana é complexo e muitos fatores afetam a adesão celular. Nesse contexto, Zhao et al.[134], em 2007, investigaram o efeito da energia livre de superfície de revestimentos na aderência bacteriana. Os revestimentos compósitos, metal-polímero, com várias energias livres de superfície foram desenvolvidos por uma técnica de revestimento sem eletrodos. Para isso, foi utilizado o politetrafluoroetileno (PTFE) que é conhecido por suas propriedades anti-aderentes e é biocompatível. Esse polímero foi utilizado para se obter os revestimentos compósitos contendo prata (Ag-PTFE), para aplicações na área médica e de implantes, ou níquel e cobre (Ni-Cu-PTFE), para utilização em equipamentos industriais. Os materiais utilizados como substratos foram placas de aço inoxidável e de titânio e cateteres de poliuretano. A aderência bacteriana nesses revestimentos foi, então, avaliada utilizando a bactéria *Escherichia coli* BL21. Ângulos de contato foram obtidos utilizando o método da gota séssil com um analisador de ângulo de contato Dataphysics OCA-20. Com base nos valores de ângulo de contato, as energias de superfície das amostras e os seus componentes dispersivo e polar, foram calculados usando o modelo de van Oss. Os resultados experimentais mostraram que a energia livre de superfície dos revestimentos teve influência significativa sobre a adesão bacteriana. A aderência bacteriana nas superfícies foi explicada utilizando a teoria DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) estendida. Os autores relataram que, em geral, existe uma energia livre de superfície ótima dos substratos para a qual a adesão bacteriana é mínima. Foi observado que, quando a energia livre dos das

superfícies revestidas com Ag-PTFE ou Ni-Cu-PTFE era de, aproximadamente, 20-30 mJ/m2, a adesão de *E. coli* foi mínima.

Em 2008, Elter et al.[27] realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer um método não invasivo para a análise quantitativa da formação de biofilme supra e sub-gengival em implantes dentários, considerando diferentes modificações de superfície. Foram avaliados pacientes de ambos os sexos, saudáveis, parcialmente edêntulos, e com pelo menos um implante parafusado com pilar apresentando áreas supra e sub-gengivais. Os pilares cicatrizadores foram inseridos e mantidos por 14 dias. As superfícies dos cicatrizadores foram divididas em quadrantes, tendo cada um deles recebido um tipo de tratamento: jateamento, desgaste, ataque ácido e sem tratamento (controle). A formação de biofilme sobre os pilares de cicatrização foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura, incluindo métodos de elétrons secundários e de detecção de retro-espalhamento Rutherford. Cálculo das superfícies cobertas pelos biofilmes foi realizado dependendo dos valores obtidos nas imagens, considerando áreas supra e subgengivais. Depois de calcular valores absolutos e relativos das superfícies cobertas por biofilmes, dependendo da localização, foi analisada a influência da modificação da superfície sobre a formação de biofilme. No total, quinze pilares de cicatrização foram inseridos em 11 pacientes. Em todas as superfícies a adesão de placa em áreas supra-gengival foi significativamente maior (17,3% ± 23,1%) que nas sub-gengivais (0,8% ±- 1,0%). As medidas de rugosidade mostraram que as superfícies jateadas apresentaram rugosidade média (Ra) de 0,9 µm, as desgastadas de 0,4 µm, as que receberam ataque ácido 0,3 µm enquanto para as superfícies sem tratamento (controle) o valor médio de Ra foi de 0,2 µm. O acúmulo de biofilme em áreas supra-gengivais foi

aumentando, significativamente, em superfícies com maior rugosidade, enquanto que essa influência não foi detectada em áreas sub-gengivais. Os autores concluíram que o método descrito é válido para investigar a adesão de biofilme supra e subgengival sobre pilares de implantes com superfícies modificadas. Houve influência significativa da localização da superfície (supra e sub-gengival), bem como da modificação de superfície sobre a formação dos biofilmes. Nas superfícies jateadas, a formação de biofilme ocorreu em 47,4% das áreas supra-gengivais e em 1,3% das áreas sub-gengivais. Para os quadrantes desgastados, os biofilmes foram observados em 18,6% das superfícies supra-gengivais e em 0,6% das sub-gengivais. Os biofilmes estavam presentes em 15,6% das áreas supra-gengivais e em 0,6% das sub-gengivais para os quadrantes que receberam ataque ácido, enquanto para aqueles sem tratamento (controles) foi observada a formação de biofilmes em somente 5,7% das superfícies supra-gengivais e em 0,6% das sub-gengivais. Os autores também verificaram que os resultados de formação de biofilmes em todas as áreas supra-gengivais exibiram altos valores de desvios padrão.

Ainda em 2008, Lima et al.[58] tiveram como objetivo determinar o padrão de proteínas salivares presente no soro da película de saliva formada na superfície de titânio (Ti) e cerâmica zircônia (ZrO_2), bem como a capacidade de células bacterianas aderirem às películas experimentais. Além disso, os perfis de proteínas e propriedades de ligação de películas bacterianas em Ti e ZrO_2 foram comparados com os que se formam em superfície de hidroxiapatita (HA). As películas foram formadas, in vitro, por incubação dos materiais com a saliva, soro ou saliva + soro. Composição de proteína em cada uma das películas foi investigada por SDS-PAGE

e imunodetecção. A aderência de *Streptococcus mutans e Actinomyces naeslundii* em superfícies não revestidas e com películas experimentais foi determinada por meio de contagem de cintilação. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de análise de variância e teste de Tukey em nível de significância de P <0,05. Em geral, a análise eletroforética das películas formadas em HA, Ti e ZrO_2 revelou poucas diferenças qualitativas da composição de proteínas das películas formadas nessas superfícies. Componentes identificados das películas incluíram amilase, IgA, IgG, albumina, fibronectina e fibrinogênio. O número de células aderidas de *S. mutans* em Ti e ZrO_2 não revestido foi significativamente mais elevado que aquele aderido na HA (P <0,05). Entretanto, foi observado menor número de células aderidas de *A. naeslund*ii em Ti e ZrO_2 não revestido que em HA (P <0,05). Na presença de saliva e de saliva + soro houve maior redução no número de células de *S. mutans* com relação a cada uma das superfícies. Os dados mostraram que Ti e ZrO_2 mostraram similaridade na composição da película e adesão bacteriana; no entanto, não foram observadas diferenças significativas em ambos os materiais quando comparados com HA.

Shibli et al.[103], também em 2008, compararam a composição microbiana do biofilme supra e sub-gengival em indivíduos com e sem peri-implantite. Quarenta e quatro indivíduos (média de idade de 48,9 +/- 13,51 anos) com pelo menos um implante reabilitado e funcional a pelo menos dois anos, foram divididos em dois grupos: um grupo de peri-implantite (n = 22), constituído por indivíduos apresentando defeitos radiográficos maiores que 3 mm, sangramento à sondagem e/ou supuração; e um grupo de controle (n = 22), constituído por indivíduos com implantes saudáveis. Os parâmetros clínicos avaliados foram índice de placa,

sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração, profundidade e nível de inserção clínica à sondagem. Amostras de biofilme supra e sub-gengivais foram retiradas dos locais mais profundos de cada implante e analisadas para a presença de 36 microrganismos pela técnica de hibridização DNA-DNA (Checkerboard). Maior número de *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola e Tannerella forsythia* foram observadas no grupo de peri-implantite, tanto supra como sub-gengivalmente (P <0,05). As proporções dos patógenos do complexo vermelho foram elevadas, enquanto complexos microbianos benéficos compatíveis com o hospedeiro foram reduzidos nos casos de peri-implantite em comparação com os implantes saudáveis. Os perfis microbiológicos dos ambientes supra e sub-gengivais não diferiram substancialmente dentro de cada grupo. Assim, foram observadas diferenças acentuadas na composição de biofilme supra e sub-gengival entre implantes saudáveis e com peri-implantite. A microbiota associada à peri-implantite foi composta por espécies de bactérias periodontais mais patogênicas, incluindo o biofilme supra-gengival.

No mesmo ano, Karaagaclioglu et al.[46] relataram que um fator etiológico importante na patogênese da candidíase atrófica crônica é a presença de *Candida albicans* na superfície interna das próteses. Nos casos de próteses removíveis reforçadas com fibras, essas podem entrar em contato com a mucosa oral durante os procedimentos de acabamento de resinas acrílicas. As fibras expostas podem proporcionar retenção mecânica para células de leveduras. Os efeitos de dois tipos de fibras de vidro e de dois ambientes foram avaliados em relação à adesão de *Candida albicans* à superfície da resina acrílica. Metade das amostras de resina, reforçadas com duas fibras diferentes (Sticknet e Eversticknet) foi pré-tratada com

solução salina tamponada com fosfato (PBS) e a outra metade com saliva não estimulada. As amostras foram colocadas em suspensão fúngica e as células aderidas foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura. A quantidade de células aderidas por mm^2 em PBS foi menor para Eversticknet, mas a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). O número de células fúngicas diminuiu na presença da saliva para ambos os tipos de fibras, tendo sido a diferença estatisticamente significativa para as amostras reforçadas com Eversticknet ($p < 0,01$). A utilização de Sticknet ou Eversticknet como material de reforço para o polimetilmetacrilato não teve efeito sobre a topografia da superfície, tendo em vista os resultados de adesão de *Candida albicans*, que foram similares para os dois tipos de fibras. A presença da película obtida a partir de saliva não estimulada reduziu a adesão de *Candida albicans*.

Subramani et al.[105], em 2009, realizaram uma revisão da literatura em relação à formação de biofilmes em implantes dentários e a influência das características de superfície (química, energia livre de superfície e rugosidade) dos materiais de implante e pilares protéticos bem como seu desenho e formato sobre a formação de biofilme e suas consequências. Foi realizada busca eletrônica no MEDLINE de estudos publicados entre 1966 e junho de 2007. As seguintes palavras-chave foram utilizadas: biofilme e implantes dentários, formação de biofilme/adesão bacteriana e implantes, placa/biofilme e características de superfície/rugosidade/energia livre de superfície de implantes dentários de titânio, interface implante-pilar e placa/biofilme, biofilme e microbiologia da placa supragengival/subgengival, biofilme/placa e infecção de implante, titânio antibacteriano/bacteriostático, titânio nanorevestimento/nanoestruturado, drogas/implante de titânio antimicrobianos.

Estudos in vitro e in vivo foram incluídos na revisão. Cinquenta e três artigos foram identificados nesse processo de revisão. Os artigos foram classificados em relação ao seu contexto na formação de biofilmes em superfícies de dentes e implantes dentários e no que diz respeito à influência das características de superfície dos biomateriais dos implantes (especialmente titânio) e características de desenho e formato do implante e componentes protéticos sobre a formação de biofilme. O estado atual da literatura é mais descritivo, em vez de fornecer dados que poderiam ser analisados através de meta-análise. Artigos de investigação sobre a modificação da superfície de titânio também foram incluídos na análise para avaliar as aplicações de tais estudos sobre a confecção de superfícies de implante que poderiam diminuir a colonização bacteriana inicial e a formação de biofilme. Foi possível concluir que o aumento da rugosidade e da energia livre de superfície facilita a formação de biofilmes em superfícies de implantes dentários e em componentes protéticos, embora essa conclusão seja derivada da literatura em grande parte descritiva. A composição química da superfície e as características de desenho da configuração implante-pilar também desempenham um papel significativo na formação de biofilmes.

No mesmo ano, ten Cate et al.[109] relataram que as infecções fúngicas na cavidade oral são causadas, principalmente, por *C. albicans*, mas outras espécies de *Candida* também são frequentemente identificadas. Elas estão aumentando em prevalência, especialmente em usuários de próteses removíveis e idosos, e podem levar a infecções invasivas, que têm alta taxa de mortalidade. Adesão aos tecidos da mucosa e às superfícies abióticas e a formação de biofilmes são passos fundamentais para a sobrevivência e a proliferação de *Candida* na cavidade oral.

Espécies de *Candida* possuem um vasto arsenal de glicoproteínas localizadas no lado externo da parede da célula, muitas das quais desempenham papel determinante nesses processos. Além disso, *C. albicans* segrega moléculas de sinalização que inibem a formação de biofilme e a transição de levedura para hifa. In vivo, espécies de *Candida* são membros de biofilmes mistos, e estão sujeitas a várias interações antagônicas e sinérgicas, que estão começando a ser exploradas. Os autores acreditam que esses novos conhecimentos permitirão tratamentos mais eficazes de infecções fúngicas bucais. Por exemplo, a utilização de moléculas de sinalização que inibem a formação de biofilme deve ser considerada. Além disso, as enzimas biossintéticas da parede celular, enzimas de reticulação da parede, e proteínas de parede, que incluem adesinas, proteínas envolvidas na formação de biofilme, interações com bactérias, e competição por locais de colonização da superfície, podem oferecer ampla gama de alvos potenciais para intervenções terapêuticas. Nesta revisão de literatura, os autores tiveram como foco principal as reações de superfície relevantes para a formação do biofilme, em particular as proteínas da parede celular das espécies de Candida e nas interações entre bactérias e fungos nos biofilmes mistos. Foram abordados a morfologia e o relacionamento evolutivo das espécies de *Candida*, a arquitetura molecular da parece celular da *Candida albicans*, o amplo arsenal de proteínas presentes na parede celular, que determinam as relações da *Candida albicans* com o meio externo, as propriedades dos substratos sobre os quais as espécies de *Candida* de aderem, os biofilmes de *Candida* e as interações *Candida*-bactérias.

A formação de biofilme em implantes de titânio e zircônia foi avaliada, in vivo, por Al-Ahmad et al.[2] em 2010. Os materiais avaliados foram: titânio usinado (Ti-m),

titânio modificado (TiUnite), zircônia modificada (ZiUnite), compósito alumina-zircônia usinado (ATZ-m), compósito alumina - zircônia jateado (ATZ-s), e zircônia usinada (TZP-Am). Blocos de esmalte bovino foram utilizados como controle. As morfologias de superfície foram avaliadas por microscopia de força atômica (AFM) e eletrônica de varredura (MEV). A molhabilidade da superfície também foi determinada. Doze voluntários saudáveis utilizaram um sistema de “splint” com os materiais testados. Após 3 e 5 dias, os materiais foram avaliados por hibridação in situ por fluorescência (FISH) e microscopia confocal a laser (MCL). Os níveis de *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp., Fusobacteriaum nucleatum e Actinomyces* foram quantificados. A espessura do biofilme foi entre 19,78 e 36,73 µm, após 3 dias e entre 26,11 e 32,43 µm depois de 5 dias. Com exceção de Ti-m, a espessura do biofilme após 3 dias foi correlacionada com a rugosidade da superfície. Além do microrganismo *Streptococcus spp*., que foi o principal componente do biofilme (11,23 a 25, 30%), *F. nucleatum, A. naeslundii, e Veillonella spp* também foram isolados. Não foram observadas diferenças significativas na composição dos biofilmes formados nas superfícies dos implantes. Os resultados deste estudo in vivo mostram que a influência da rugosidade da superfície e do tipo de material sobre a aderência de microrganismos é compensada pelo processo de maturação do biofilme oral. Devido a isso, a composição química do material de implante não parece ter influência no comportamento bacteriano, sobretudo em biofilmes maduros. Os materiais de zircônia utilizados não somente são comparáveis ao material clássico de implante (titânio), como também permitem menor formação de biofilme inicial. Além disso, a composição do biofilme presente nos diferentes materiais de implante parece ser semelhante ao do esmalte dental. Este estudo aumenta a atenção sobre a zircônia como material alternativo para os implantes orais.

Em 2010, Bürgers et al.[12] realizaram estudo in vitro e in vivo com os seguintes objetivos: 1) avaliar a formação inicial de biofilme sobre diferentes superfícies de implantes de titânio por meio de duas técnicas de fluorescência, altamente sensíveis; 2) correlacionar os resultados obtidos com as diferentes propriedades da superfície. Na formação de biofilme in vivo foram utilizados amostras de implantes de titânio usinado (Pt) ou submetido ao jateamento seguido de condicionamento ácido (Prom), que foram montadas na região vestibular em “splints” individuais que foram utilizados por seis participantes por 12 h. A adesão bacteriana in vitro foi também avaliada após incubação das amostras em suspensão de *Streptococcus sanguinis* (37 °C, 2 h). As bactérias aderidas foram quantificadas pelas técnicas de fluorescência: coloração com Resazurina em combinação com leitor de fluorescência ou marcação de células vivas/mortas e microscopia de fluorescência. A rugosidade superficial (Ra) foi determinada com um perfilômetro e a energia livre de superfície (SFE) foi medida utilizando um goniômetro. As amostras de Prom mostraram mediana de Ra significativamente maior (0,95 µm) e mediana de SFE significativamente menor (18,3 mJ/m^2) que as amostras de Pt (Ra 0,15 µm; SFE = 39,6 mJ/m^2). Os testes in vitro e in vivo mostraram adesão bacteriana significativamente mais elevada para Prom que para Pt, e a formação de biofilme inicial sobre Pt foi correlacionada com as modificações circulares de superfície resultantes do processo de usinagem. Ambas as observações podem ser atribuídas à influência predominante da rugosidade da superfície sobre a adesão bacteriana. Não foram encontradas diferenças significativas na percentagem de células mortas entre todas as bactérias aderidas entre Prom (23,7%) e Pt (29,1%). Células ectópicas epiteliais da mucosa oral - que aderem fortemente ao substrato - foram observadas em todas as amostras de Prom, mas não nas amostras de Pt. Assim, os

autores concluíram que a adesão inicial bacteriana às superfícies de titânio com diferentes superfícies foi influenciada principalmente pela Ra, enquanto a influência de SFE parece ter menor importância. Dessa forma, as partes micro-estruturadas de um implante, que são expostas à cavidade oral, devem ser altamente polidas para impedir o acúmulo de microrganismos. Ambas as técnicas fluorimétricas utilizadas mostraram-se altamente sensíveis e reprodutíveis na quantificação da formação de biofilmes em superfícies de implantes de titânio.

Ainda em 2010, Zamperini et al.[128] relataram que a adesão de *Candida albicans* às superfícies é o pré-requisito para a ocorrência da estomatite protética. Assim, este estudo investigou se modificações de superfície com tratamentos a plasma poderiam reduzir a adesão de *C. albicans* a uma resina para base de prótese. Amostras (n = 180) com superfícies rugosas e lisas foram confeccionadas e divididas em cinco grupos: controle - sem tratamento; experimentais – as amostras foram submetidas aos tratamentos a plasma para obter superfícies com diferentes hidrofobicidades (Ar/50W; ArO_2/70W; AAT/130W) ou incorporação de flúor ($ArSF_6$/70W). Medidas de ângulo de contato foram realizadas imediatamente após os tratamentos e após imersão em água durante 48h. Para cada grupo, metade das amostras foi incubada com saliva, antes do ensaio de adesão. O número de células aderidas foi avaliado pelo método de redução de XTT. Para os grupos experimentais, houve alteração significativa no ângulo de contato médio após 48 h de imersão em água. Grupos ArO_2/70W e $ArSF_6$/70W mostraram leituras de absorbância significativamente mais baixas do que as dos outros grupos, independente da presença ou ausência de saliva e rugosidade superficial. Os resultados demonstraram que os tratamentos de plasma ArO_2/70W e $ArSF_6$/70W

apresentaram potencial promissor para reduzir a adesão de *C. albicans* em resinas para base de prótese.

De acordo com Bürgers et al.[13], em 2010, os implantes dentais podem ser considerados como potenciais reservatórios para a (re)infecção com *Candida albicans*. Assim, os autores realizaram estudo in vitro para avaliar a adesão de *C. albicans* em três superfícies de titânio e uma superfície de implante cerâmica: titânio usinado (MT), titânio jateado (SBT), titânio jateado, seguido de tratamento com ácido (SBAET) e zircônia (ZC). Além disso, os autores procuraram correlacionar os resultados obtidos com as características superficiais de rugosidade, energia livre e morfologia. Também foi avaliada a influência de proteínas salivares e de filmes de mucina e albumina na aderência fúngica inicial. Para o estudo foram utilizadas amostras com 5,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura. Foi determinada a rugosidade superficial (Ra) de 5 amostras de cada superfície estudada (MT, SBT, SBAET e ZC). A energia livre de superfície total (ELS), e seus componentes dispersivos e polares, foram calculados a partir das medidas do ângulo de contato com água deionizada, diiodometano e etileno glicol. Antes dos testes de adesão, as amostras foram pré-condicionadas com saliva humana, PBS, solução de mucina e de albumina. Para os testes de adesão, foi utilizado o isolado clínico de *C. albicans* 1386. A adesão foi avaliada por meio da intensidade de luminescência. Os resultados mostraram que a ZC não apresentou nenhuma tendência em reduzir a aderência de *C. albicans*, em comparação com os três substratos de titânio (MT, SBT e SBAET). De forma geral, a adesão de *C. albicans* foi menor para SBT, independentemente do tipo do pré-condicionamento. Os valores maiores de rugosidade foram observados para SBT e SBAET (1,18 μm). No presente estudo, a

rugosidade não influenciou a adesão de *C. albicans* e a ELS parece ter mostrado maior influência na adesão dos microrganismos que a rugosidade. Foi observada menor adesão de *C. albicans* para SBT, enquanto ZC não demonstrou potencial de reduzir a adesão de *C. albicans*. Não houve diferença estatística entre a adesão de *C. albicans* para as superfícies ZC, MT e SBAET. A influência da ELS na formação inicial de biofilme de *C. albicans* parece ser mais relevante que a da rugosidade. Além disso, os resultados desse estudo reforçam a relevância da película salivar e seus elementos constituintes para a adesão inicial de *C. albicans*. A mucina pode servir como receptor para a adesão de *C. albicans*, ao passo que a albumina pode atuar como agente bloqueador no complexo processo de aderência de *C. albicans*.

Yoshijima et al.[123], ainda em 2010, relaram que a aderência dos microrganismos às superfícies das próteses é um importante passo na etiologia da estomatite protética. Assim, a inibição desse processo poderia ser uma maneira efetiva para prevenir a ocorrência dessa patologia. Interações hidrofóbicas estão envolvidas na aderência de *Candida* à resina acrílica, sugerindo que superfícies hidrofílicas poderiam inibir a aderência fúngica. Dessa forma, este estudo investigou o efeito de revestimentos hidrofílicos sobre a resina acrílica com relação à aderência de *Candida*, especialmente de hifas de *C. albicans*. Para isso, amostras de resina acrílica recobertas com carragenana (“carrageenan”) e hidrocolóide foram utilizadas como substratos hidrofílicos e comparadas com amostras controles. As medidas de hidrofilicidade superficial dessas amostras foram determinadas por meio do ângulo de contato entre a água destilada e a superfície acrílica. Suspensões fúngicas (2×10^7 ufc/mL) de isolados clínicos de *Candida* foram colocadas sobre as amostras acrílicas e incubadas por 30 minutos. Após esse período, todas as amostras foram

lavadas com PBS e as células aderidas às superfícies acrílicas foram coletadas por meio do tratamento com tripsina a 0,25%. A hidrofobicidade de superfície celular foi estimada utilizando modificação da técnica do hidrocarbono. Os resultados obtidos demonstraram que quando as amostras acrílicas foram recobertas pelo revestimento hidrofílico, a aderência dos isolados hidrofóbicos de *Candida* e hifas hidrofóbicas de *C. albicans* diminuiu, enquanto a aderência de *Candida* não hidrofóbica não foi afetada ou aumentou. Os autores sugeriram que revestimentos hidrofílicos de superfícies protéticas apresentam potencial para redução da aderência de células fúngicas relativamente hidrofóbicas, particularmente, hifas de *C. albicans*.

No ano seguinte, Zamperini et al.[129] relataram que há tendência para a adesão de fungos no polimetilmetacrilato, material utilizado para a confecção de bases de próteses. Dessa forma, os autores investigaram se modificações de superfície com tratamentos a plasma poderiam reduzir a adesão de *Candida albicans* a uma resina para base de prótese. As amostras (n = 180) com superfícies lisas e rugosas foram confeccionadas e divididas em cinco grupos: controle - não tratados; - grupos experimentais submetidos a tratamentos com plasma para se obter superfícies com diferentes hidrofobicidades (Ar/50 W; ArO_2/70 W; AAT/130 W) ou com incorporação de flúor ($ArSF_6$/70 W). Ângulos de contato foram medidos imediatamente após os tratamentos e depois que as amostras foram imersas em água durante 48 h. Para cada grupo, metade das amostras foi incubada com saliva antes do teste de adesão. O número de *C. albicans* aderidas foi avaliado por contagem após coloração com cristal de violeta. Os tratamentos a plasma foram eficazes em modificar a superfície do polimetilmetacrilato. No entanto, houve alteração significativa no ângulo de contato após a imersão em água. Não foram

observadas diferenças estatisticamente significativas na adesão de *C. albicans* entre os grupos experimentais e controle, independentemente da presença ou ausência de saliva, e a rugosidade da superfície.

Lee et al.[55], também em 2011, realizaram um estudo in vitro para investigar a adesão do colonizador inicial, *Streptococcus sanguis*, em resina, titânio e zircônia, nas mesmas condições de polimento superficial. As amostras foram preparadas a partir de Z-250, CP-Ti e 3Y-TZP e polidas com pasta de diamante de granulação de 1 µm. Após o condicionamento em saliva, cada espécime foi incubado com *Streptococcus sanguis*. Microscópio eletrônico de varredura, coloração cristal violeta e mensuração da intensidade de fluorescência resultante da redução da resazurina foram utilizados para quantificar a adesão bacteriana. A superfície de resina composta foi significativamente mais rugosa (Ra = 0,179 µm) que a do titânio (Ra = 0,059 µm) e a da zircônia (Ra = 0,064 µm), apesar de todas as amostras avaliadas terem sido classificadas como lisas. Os corpos de prova de resina apresentaram menor valor de ângulo de contato (54,2°) em comparação com os de titânio (75,1°) e de zircônia (71,6°), e apresentaram superfícies hidrofílicas. As análises em microscopia eletrônica de varredura demonstraram que as bactérias foram mais abundantes na resina, em comparação com o titânio e a zircônia. Quando a massa total do biofilme foi determinada pelo método de coloração com cristal violeta, o valor de absorbância observado para a resina foi significativamente mais elevado que os do titânio ou da zircônia. Os resultados das intensidades relativas de fluorescência também demonstraram que a maior intensidade foi verificada para a superfície de resina. O valor de absorbância e a intensidade de fluorescência para o titânio não foram significativamente diferentes daqueles obtidos com a zircônia. Assim, as

amostras de resina apresentaram superfície mais rugosa e susceptibilidade significativamente maior para a adesão de *Streptococcus sanguis* que o titânio e a zircônia, quando as superfícies de cada espécime foram polidas nas mesmas condições. Não houve diferença significativa na adesão de bactérias entre o titânio e a zircônia, in vitro.

O objetivo do estudo de Li et al.[57], em 2012, foi obter informações sobre as características de superfície de vários materiais utilizados em próteses do tipo "overdenture" e a capacidade da *C. albicans* de aderir e formar biofilme nesses materiais. Foi avaliado também o papel da mucina salivar no processo de formação do biofilme de *C. albicans*. Sete diferentes materiais utilizados para próteses do tipo "overdenture" foram utilizados: zircônia - ZrO_2, liga metálica ouro-prata-paládio - Au–Ag–Pd; titânio comercialmente puro - Ti; liga metálica de cobalto-cromo - Co-Cr; resina acrílica; politereftalato de etileno - PET; hidroxiapatita - HA. Poliestireno tratado com colágeno tipo I foi utilizado com controle. Para cada material, foram confeccionadas amostras de 13 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, sendo n=12. Foram avaliados a rugosidade média (Ra), o ângulo de contato e a absorção de mucina bovina nas superfícies dos materiais. Amostras pré-condicionadas em saliva e não condicionadas foram incubadas com 1 mL de suspensão de *C. albicans* durante 90 min (fase de adesão) à 37 °C. Após esse período, as amostras foram lavadas cuidadosamente em PBS duas vezes. Então, as amostras foram incubadas em meio de cultura por mais 2 dias à 37 °C (fase de formação de biofilme). A adesão e a formação de biofilme foram avaliadas por meio da contagem do número de colônias que foi expresso em UFC/disco. As características morfológicas da adesão inicial e da formação de biofilme de *C. albicans* foram observadas por microscropia

eletrônica de varredura (MEV). A rugosidade dos materiais situou-se entre 0,07 e 0,10 µm. Foi verificado que os ângulos de contato dos materiais e o índice de hidrofobicidade correlacionaram positivamente com a adesão inicial e a formação de biofilme de *C. albicans*. Correlação negativa entre absorção de mucina e a remoção do biofilme de *C. albicans* indicou que a mucina apresenta papel importante na formação do biofilme e na sua rigidez. As análises em MEV também revelaram menor número de células de *C. albicans* nas amostras de Ti condicionadas em saliva que nas de HA ou de resina acrílica. Os autores confirmaram os efeitos da hidrofilicidade da superfície de materiais para próteses do tipo “overdenture” e da película de saliva na adesão e formação de biofilme, bem como na porcentagem de remoção de biofilme de *C. albicans*. O estudo sugere também que os materiais hidrofóbicos promoveriam maior adesão inicial, resultando, posteriormente, na formação de biofilme ativo, e que a mucina atua como receptor e desempenha um papel importante na imobilização de *C. albicans* e desenvolvimento do biofilme sobre os materiais avaliados.

Papaioannou et al.[73], também em 2012, examinaram a interação entre o periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* e brackets ortodônticos in vitro bem como o efeito da película salivar recém formada e outras bactérias na formação do biofilme. Para isso, biofilmes mono e multi-espécies de *P. gingivalis* foram formados em 3 diferentes materiais de brackets ortodônticos: aço inoxidável, plástico (policarbonato) e cerâmica (alumina policristalina), com ou sem película salivar. Para os biofilmes multi-especies, além da bactéria *P. gingivalis* (DSM 20709), foram utilizadas cepas padrão de *Fusobacterium nucleatum* (DSM 15643) e *Streptococcus oralis* (DSM 20627), assim como isolados clínicos de *Actinomyces spp*. da Clínica de

Periodontia da Faculdade de Odontologia - Universidade de Atenas. As bactérias foram incubadas, individualmente, em placas de ágar sangue suplementado com hemina (5 µg/ml), menadiona (1 µg/ml) e 5% de sangue estéril de cavalo. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (5% de CO_2, 10% de H_2 e 85% de N_2) a 37◦ C, durante 5 dias. Para a formação da película de saliva, metade das amostras foram incubadas com 1 mL de saliva preparada em placas de cultura de 24 poços, durante 2 horas a 37 ˚C. Após esse período, as amostras foram removidas e colocadas em novas placas de cultura para a formação dos biofilmes. Após 5 dias de incubação em jarras de anaerobiose a 37 ˚C, foi realizada a contagem de colônias. Os resultados mostraram que a película salivar afetou significantemente (P <0,001) a formação de biofilme de *P. gingivalis* nos diferentes tipos de materiais, com número de bactérias estatisticamente maior nas amostras pré-condicionadas em saliva. O material por si só não é um fator significativo, embora algumas diferenças tenham sido evidentes na interação entre o material e a película salivar, que teve alto nível de significância (P = 0,009), no qual a película salivar seria responsável por esses resultados. Em relação ao tipo de biofilme, de *P. gingivalis* ou de múltiplas espécies, não houve efeito significativo, independentemente do material, embora para os brackets de aço inoxidável e de policarbonato tenha sido observada tendência de maior número do patógeno *P. gingivalis* nos biofilmes multi-espécies. Os autores concluíram que a película de saliva parece facilitar a adesão de *P. gingivalis* e a formação de biofilme em brackets ortodônticos, enquanto o material dos brackets não tem impacto significativo no número de bactérias.

Ainda em 2012, Wady et al.[118] avaliaram, inicialmente, a atividade de uma solução de nanopartículas de prata (AGNPS) contra *Candida albicans*. Em seguida,

os efeitos da incorporação de AGNPS em uma resina acrílica base da prótese sobre a hidrofobicidade do material, adesão de *C. albicans* e formação de biofilmes foram investigados. A solução de AGNPS foi sintetizada por redução química e caracterizada. As Concentrações Inibitória Mínima (CMI) e Fungicida Mínima (CFM) para células planctônicas e células sésseis (MFCs) da solução de AGNPS contra *C. albicans* foram determinadas. As amostras (n = 360) de resina acrílica com prata incorporada em concentrações de 1000, 750, 500, 250 e 30 ppm foram preparadas e armazenadas em PBS durante 0, 7, 90 e 180 dias. Amostras controle - sem AGNPS (0 ppm) foram também confeccionadas. Após os períodos de armazenamento, os ângulos de contato foram medidos e as amostras foram utilizadas para a adesão de *C. albicans* (37 ° C; 90 min; n = 9) e a formação de biofilme (37 ° C; 48 h; n = 9) através do ensaio de XTT. Os valores de MIC, MFC e MFCs foram 3,98, 15,63 e 1.000 ppm, respectivamente. A incorporação de AGNPS reduziu a hidrofobicidade da resina. Não foram observados efeitos sobre a adesão e a formação de biofilme. Aos 90 e 180 dias de armazenamento, houve aumento significativo na adesão e na formação de biofilme. Embora a solução de AGNPS tenha apresentado atividade antifúngica, nenhum efeito sobre a adesão e a formação de biofilme de *C. albicans* foi observado após sua incorporação em uma resina para base de prótese. A solução de AGNPS sintetizada é um agente antifúngico promissor, e merece investigações de métodos mais eficientes para sua incorporação em resinas de base de prótese.

Os implantes dentários são propensos à colonização bacteriana, que pode resultar na destruição do tecido ósseo e na perda dos implantes. O tratamento da doença peri-implantar tem como objetivo reduzir a aderência bacteriana, deixando a

superfície do implante intacta para fixação de células hospedeiras, e assim possibilitar a regeneração óssea. Com base nesses aspectos, os objetivos do estudo de Hauser-Gerspach et al.[38], também em 2012, foram avaliar a eficácia antimicrobiana de ozônio gasoso em bactérias aderidas a diferentes superfícies de titânio e zircônia, bem como avaliar a adesão de osteoblastos MG-63 em superfícies tratadas com ozônio. Discos de titânio condicionados em saliva (jateamento com granulação grossa, seguido de ataque ácido - JGA e polido) e zircônia (com ataque ácido e polida) foram utilizados como substrato para a adesão de *Streptococcus sanguinis* DSM20068 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277. Os corpos de prova foram tratados com ozônio gasoso (140 ppm; 33 mL/s) utilizando 6 e 24 s. As bactérias foram ressuspensas utilizando ultra-som, submetidas à diluição seriada e semeadas. A adesão dos osteoblastos MG-63 foi analisada com relação à fixação celular, morfologia, espalhamento e proliferação. A topografia de superfície, bem como a morfologia das células nos corpos de prova foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A maior aderência bacteriana foi observada no titânio JGA enquanto as outras superfícies apresentaram 50-75% menos bactérias aderidas. *P. gingivalis* foi eliminada de todas as superfícies pelo tratamento com ozônio dentro de 24 s para níveis abaixo do limite de detecção (redução ≥99.94%). *S. sanguinis* foi mais resistente e apresentou a maior redução em substratos de zircônia (> 90% de redução). O tratamento com ozônio não afetou as estruturas de superfície dos corpos de prova e não influenciou negativamente a adesão e a proliferação dos osteoblastos. Titânio (polido) e zircônia (com ataque ácido e polida) apresentaram menor colonização e podem ser materiais adequados para pilares de implantes. Ozônio gasoso mostrou eficácia seletiva para reduzir bactérias aderidas ao titânio e à zircônia, sem afetar a adesão e proliferação de células osteoblásticas.

Assim, os autores concluíram que este estudo in vitro pode proporcionar base sólida para estudos clínicos sobre o tratamento com ozônio gasoso em peri-implantite e revelou condições essenciais para suficiente regeneração dos tecidos.

No mesmo ano, Odagiri et al.[70] avaliaram os efeitos de determinados desinfetantes sobre a estabilidade de uma resina para base de prótese (polimetilmetacrilato), incluindo os de um método de desinfecção com espécies reativas de oxigênio (ROS). A rugosidade da superfície e a resistência à flexão foram avaliadas para testar os efeitos dos seguintes desinfetantes: hipoclorito de sódio a 5%, álcool 70% e ROS. Além disso, a adesão de *Candida albicans* na superfície da resina foi investigada. Para isso, as amostras em forma de discos foram incubadas com 1,0 mL de suspensão fúngica em placas de 24 orifícios a 37°C por períodos de 2, 4 e 6 horas. Em seguida, as células foram ressupensas, submetidas à diluição seriada e incubadas por 24 horas, quando, então, o número de unidades formadoras de colônias foi contado. O método de desinfecção utilizando o hipoclorito de sódio aumentou, significativamente, a rugosidade da superfície e diminui a resistência à flexão. As análises em microscopia eletrônica de varredura das superfícies revelaram que as amostras controle, tratadas com álcool ou ROS apresentaram superfícies lisas e similares. Os valores de Ra para essas amostras variaram de 0,36 a 0,38 µm. Por outro lado, para as amostras tratadas com hipoclorito de sódio, superfícies rugosas foram observadas, confirmando os resultados de rugosidade (Ra – 1,04 µm). Foi verificado, também, que a adesão de *C. albicans* foi maior nessas amostras, nos três períodos avaliados. A rugosidade superficial e a resistência à flexão das amostras tratadas com ROS não diferiram significativamente daqueles das amostras controle, e os espécimes tratados com

ROS apresentaram diminuição da adesão de *Candida*. Esses resultados demonstram que o método de desinfecção ROS preserva níveis aceitáveis de estabilidade de resinas à base de polimetilmetacrilato.

Ainda em 2012, Al-Radha et al.[3] avaliaram as seguintes hipóteses: (a) diferentes materiais de implantes proporcionam diferenças na adesão bacteriana e (b) modificação da superfície do titânio com dióxido de zircônia possui propriedades semelhantes à zircônia pura. Um estudo piloto foi realizado para selecionar o procedimento mais adequado para se obter a rugosidade da superfície necessária para a pesquisa (abaixo de 0,2 µm). Paras as amostras avaliadas no estudo foram dadas as seguintes siglas: PZ - discos de zircônia de 6 mm de diâmetro desgastados e polidos; PT - discos de titânio polido com 5 mm de diâmetro, que foram considerados como amostras controle; TPZ - discos de titânio polidos que foram posteriormente jateados com pó de óxido de zircônio (ZrO_2); TBAZ - discos de titânio, jateados com zircônia e subsequentemente submetidos a ataque ácido com ácido fluorídrico a 0,2 % durante 1,5 min. Um rugosímetro óptico foi utilizado para fazer as medidas de rugosidade e, para avaliar a topografia, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para avaliar a molhabilidade de superfície, medidas de ângulo de contato com água foram realizadas utilizando a técnica da gota séssil. A energia livre de superfície (ELS) foi obtida utilizando três líquidos: água, etileno glicol, diiodometano. Testes de dureza de superfície e espectroscopia de Raios X (XPS) também foram realizados. Além disso, considerando-se que a partir do momento em que o implante dentário é exposto à cavidade oral, inicia-se a formação da película adquirida que atua como interface entre as bactérias e a superfície do implante, metade das amostras foi pré-

condicionada em saliva humana, antes dos testes microbiológicos. Para a utilização da saliva humana, esta foi coletada de 9 doadores saudáveis. Foi realizada a centrifugação com 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi diluído a 50% e, em seguida, esterilizado por filtração utilizando membrana de 0,22 µm. Após a esterilização, a saliva foi armazenada a - 20 °C e descongelada imediatamente antes da utilização. Os discos foram incubados com saliva durante 2 h a 37 °C e, em seguida, lavados para remover o excesso de saliva. *Streptococcus mitis* e *Prevotella nigrescens* foram utilizados no estudo, utilizando 75×10^7 células/mL. Foram realizados dois experimentos, em duplicata, com cada bactéria, sendo um com pré-condicionamento das amostras em saliva e outro sem. As amostras foram incubadas com os microrganismos por 6 horas e as áreas recobertas pelas bactérias foram calculadas em imagens de microscopia de fluorescência. Os resultados revelaram que os menores valores de rugosidade (Ra) foram obtidos para as superfícies TBZ e TBZA. A topografia das diferentes superfícies, analisada por microscopia electrônica de varredura, mostrou que, tanto o titânio polido como as superfícies polidas de zircônia, apresentaram superfícies relativamente lisas, quando avaliadas com pequeno aumento. Com o objetivo de avaliar outras características superficiais, a rugosidade das superfícies foi mantida abaixo de 0,2 µm, uma vez que foi demonstrado anteriormente que essa rugosidade não tem influência sobre a adesão bacteriana, visto que a maioria das bactérias são maiores em tamanho. Neste estudo, a película de saliva proporcionou redução significativa da adesão bacteriana. Aparentemente, a proteína salivar adsorvida pelas superfícies resultou num efeito protetor às superfícies. A ELS, diretamente ou através película de saliva, pode ter efeito na aderência microbiana. Indiretamente pode influenciar o tipo de proteínas adsorvidas pelo substrato, bem como as bactérias com afinidades diferentes para

cada tipo de proteínas. Neste estudo, as amostras PZ e TBZ exibiram menores valores de energia livre de superfície e menor molhabilidade que as amostras PT. E, as superfícies PZ e TBZ também mostraram menores porcentagens de adesão bacteriana comparadas com a superfície controle PT. Em conclusão, a zircônia e o titânio com superfície tratada com zircônia (superfície TBZ) mostraram efeito superior ao titânio na redução da aderência de bactérias, principalmente após o revestimento com película de saliva. A energia livre de superfície parece ser o fator mais importante em determinar a adesão bacteriana inicial, in vitro, em superfícies lisas.

No ano seguinte, Zamperini et al.[127] avaliaram o potencial de tratamentos a plasma para alterar a química da superfície e a hidrofobicidade de uma resina acrílica para base de prótese e reduzir a adesão de *Candida glabrata*. Amostras (n = 54) com superfícies lisas foram confeccionadas e divididas em três grupos (n = 18): controle - não tratados; grupos experimentais - submetidos a tratamento com plasma de argônio e potência de 50 W (Ar/50 W) e ar atmosférico e potência de 130 W (AAT/130 W). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos na composição química e na topografia da superfície da resina acrílica. Medidas de energia livre de superfície (ELS) das amostras foram realizadas após os tratamentos e após 48 horas de imersão em água. Para cada grupo, a metade (n = 9) dos espécimes foi pré-condicionada com saliva antes dos testes de adesão. O número de *C. glabrata* aderida foi avaliado por contagem de células após coloração com cristal de violeta. Os tratamentos Ar/50 W e AAT/130 W alteraram a composição química, hidrofobicidade e topografia da superfície da resina acrílica. O grupo Ar/50 W mostrou significativamente menor adesão de *C. glabrata* que o grupo controle, na

ausência de saliva. Após o pré-condicionamento com saliva, a adesão de *C. glabrata* entre os grupos experimentais e o controle não apresentou diferenças significativas. Houve mudanças significativas na SFE após a imersão em água. Além disso, o pré-condicionamento em saliva alterou a molhabilidade de todas as amostras e, após 48 h de imersão em água, não foram mais detectadas diferenças entre todos os grupos (experimentais e controle), com valores médios em torno de 75 Dyn/cm. Os resultados demonstraram que as superfícies tratadas com Ar/50 W tiveram potencial para reduzir a aderência *C. glabrata* em resinas de base de prótese e esse tipo de tratamento merece uma investigação mais aprofundada, especialmente para adequar os parâmetros para prolongar a durabilidade do aumento de molhabilidade obtido.

Ainda em 2013, Koch et al.[51] tiveram como objetivo avaliar a adesão e a proliferação de *Candida albicans* em materiais de base da prótese. Amostras foram preparadas a partir de diferentes materiais para base de prótese (Palapress vario, Paladon 65, Castdon, Sherapress, Eclipse e Mucopren) e submetidas a ciclos térmicos para simular processo de envelhecimento. Após a determinação da rugosidade e energia livre de superfície, a adesão e a proliferação de *Candida albicans* sobre as superfícies dos materiais foram avaliadas por incubação subsequente com *Candida albicans* ATCC 10231 (24 ou 196 h) com e sem prévia formação de película salivar. Independentemente da presença de uma película salivar ou o tempo de incubação, os resultados indicam que a proliferação de *Candida albicans* é significativamente dependente do material que é utilizado para a fabricação de bases de próteses ($p < 0,001$). Maior proliferação de *Candida albicans* foi observada na superfície dos materiais para base de prótese com a maior

contribuição de energia polar à energia livre de superfície (Eclipse e Mucopren), e este resultado sustenta a hipótese de que pode haver uma relação entre a contribuição para a superfície polar do material e a proliferação de *Candida albicans*. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a proliferação de *Candida albicans*, em particular, não é necessariamente aumentada em materiais de base para próteses dentárias que são submetidos a ciclos térmicos.

No mesmo ano, Santana et al.[96] investigaram se os carboidratos presentes na dieta alimentar podem modular o desenvolvimento de biofilmes de *Candida albicans* na superfície do material de prótese. Discos de resina acrílica foram confeccionados e a rugosidade superficial deles foi medida. Os biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028) foram desenvolvidos nas amostras pré-condicionadas com saliva e meio de cultura sem (controle) ou com suplementação de carboidratos por amido, amido + sacarose, glicose, ou sacarose durante 72 h. A contagem de células, a atividade metabólica, o biovolume, a espessura média, e o coeficiente de rugosidade foram avaliados na fase de aderência (1,5 h) e após 24, 48, e 72 h. A secreção de proteases e fosfolipases, a energia da superfície da célula, e a produção de polissacarídeos extra/intracelulares foram analisados após 72 h de desenvolvimento de biofilme. Os dados foram analisados pelos testes estatísticos ANOVA seguido pelo teste de Tukey a 5% de significância. Nas fases iniciais de colonização (adesão e 24 h), o grupo de glicose apresentou as maiores contagem de células e atividade metabólica entre os grupos ($p < 0,05$). Os biofilmes desenvolvidos em amido ou sem suplementação de carboidratos apresentaram células com comportamento mais hidrofóbico, em comparação com os outros grupos. Além disso, após a maturação (48 e 72 h), os biofilmes expostos à glucose, à sacarose, ou ao amido + sacarose

apresentaram contagem de células e atividade metabólica mais elevadas que os grupos controle e com suplementação com amido (p <0,001). Os autores associaram esses resultados à presença da película de saliva sobre a superfície da resina a qual apresenta muitas proteínas hidrofílicas. Dessa forma, os autores consideraram que as alterações nas proteínas da parede celular, em condições limitadas de nutrientes, devem ter contribuído para a maior hidrofobicidade celular e, consequentemente, redução na formação de biofilme. Em comparação com o grupo controle, os biofilmes desenvolvidos em amido ou amido + sacarose apresentaram maior atividade proteinase (p <0,001), enquanto os biofilmes desenvolvidos em glicose ou sacarose tiveram maior atividade fosfolipase (p <0,05). A exposição ao amido + sacarose aumentou a produção de polissacarídeos extracelulares e intracelulares (p <0,05). Imagens de microscopia confocal mostraram hifas nos biofilmes expostos ao amido ou ao amido + sacarose. Nas condições estudadas, pode-se concluir que os carboidratos da dieta podem modular o desenvolvimento de biofilmes na superfície das próteses, por afetarem fatores de virulência e características estruturais.

Em 2014, Sánchez et al.[95] relataram que a influência das superfícies dos implantes na formação do biofilme dental é ainda desconhecida. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, in vitro, o desenvolvimento de um modelo complexo de biofilme em superfícies de titânio e de zircônia para implantes, e compará-lo com o mesmo biofilme formado na superfície de hidroxiapatita. Os discos de hidroxiapatita apresentavam 7 mm de diâmetro por 1,8 mm de espessura, enquanto os de titânio tinham 5 mm de diâmetro e superfície tratada (jateamento com granulação grossa seguido de ataque ácido) e os de zircônia tinham também 5 mm de diâmetro e

superfície com estrutura micro estruturada obtida por meio de tratamento com solução aquecida de ácido fluorídrico. Esses tratamentos resultaram em topografia de superfície com 0,55 µm para a zircônia e com 1,17 µm para o titânio. Seis cepas padrão foram utilizadas para desenvolver o biofilme in vitro sobre discos de titânio, de zircônia e de hidroxiapatita estéreis, revestidos com saliva dentro dos poços de placas de poliestireno de cultura pré-esterilizadas. As espécies selecionadas representam os colonizadores iniciais (*Streptococcus oralis e Actinomyces naeslundii*), primários (*Veillonella parvula*), secundários (*Fusobacterium nucleatum*) e finais (*Porphyromonas gingivalis e Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Os biofilmes desenvolvidos (tempo de crescimento de 1 a 120 h) foram estudados com microscopia confocal, utilizando técnica de fluorescência e com microscopia eletrônica de varredura de baixa temperatura. O número de unidades formadoras de colónias/biofilme e cinética das bactérias dentro do biofilme foram estudados por PCR quantitativa (qPCR). A espessura do biofilme, o percentual de vitalidade celular e o número de bactérias foram comparados por meio da análise de variância. As bactérias aderiram e se desenvolveram dentro do biofilme, nas três superfícies avaliadas, com dinâmica similar. Superfícies diferentes, no entanto, demonstraram diferenças tanto na espessura e deposição da matriz extracelular, bem como na organização das células bacterianas. Enquanto a formação e a dinâmica de um modelo de biofilme in vitro foram semelhantes, independentemente da superfície de inoculação (hidroxiapatita, titânio ou de zircônia), houve diferenças significativas no que diz respeito à espessura do biofilme e à estrutura tridimensional.

Segundo Nascimento et al.[67], ainda em 2014, os microrganismos que colonizam a cavidade oral, principalmente aqueles relacionados a doenças

periodontais, são o fator etiológico de maior potencial na falha, em longo prazo, de tratamentos com implantes. O material utilizado nos componentes protéticos pode influenciar a adesão e a colonização de espécies microbianas. Dessa forma, o objetivo desta investigação in vivo foi avaliar a formação de biofilme em pilares de titânio puro usinado (MPT), de titânio fundido e polido (CPT) e de zircônia (Zc). Seis indivíduos saudáveis foram incluídos neste estudo clínico randomizado, que foi realizado em três fases de acordo com a superfície dos pilares avaliados. Cada voluntário participante utilizou, por período de 24 h, um dispositivo na cavidade oral contendo quatro discos do mesmo substrato testado, dois localizados na região anterior e dois na posterior, totalizando 12 amostras. A técnica de hibridização DNA Checkerboard foi utilizada para identificar e quantificar 38 espécies de bactérias que colonizavam os biofilmes formados sobre os substratos. Patógenos e espécies não-patógenas foram encontrados colonizando as três superfícies: *Fusobacterium nucleatum, Neisseria mucosa, Porphyromonas aeruginosa; Peptostreptococcos anaeróbios, Staphylococcus aureus, Streptococcus gordonii, Streptococcus parasanguinis e Tanerella forsythia* foram as únicas espécies sem diferenças significativas sobre os materiais testados (P> 0,05). Todas as outras espécies apresentaram diferenças significativas determinadas pelo teste de Friedman (P <0,0001). Os autores verificaram que houve diferença significativa na contagem total de bactérias entre os três grupos. As amostras de CPT apresentaram as contagens médias mais elevadas, seguidas pelas de MPT e Zc. Incidência média mais elevada de espécies também foi observada para as amostras de CPT quando comparadas com as de MPT e de Zc. Não houve diferenças significativas entre a região anterior ou posterior em relação à adesão bacteriana.

Figuero et al.[28], também em 2014, definiram as doenças peri-implantares como lesões inflamatórias dos tecidos localizados ao redor dos implantes e incluem mucosite peri-implantar (lesão inflamatória limitada à mucosa ao redor do implante) e peri-implantite (lesão inflamatória da mucosa que afeta o suporte ósseo com perda da osseointegração). A revisão de literatura realizada pelos autores teve como objetivo descrever as diferentes abordagens para tratar essas lesões e para avaliar, de maneira crítica, as evidências disponíveis sobre a eficácia desses tratamentos. Os tratamentos de mucosite peri-implantar geralmente envolvem debridamento mecânico da superfície do implante utilizando curetas, aparelhos de ultra-som, aparelhos de ar-abrasivo ou lasers, com ou sem o uso concomitante de antibióticos ou anti-sépticos locais. Também incluem técnicas de higiene oral realizadas pelos pacientes. Tem sido observado que os tratamentos mecânicos feitos pelos profissionais, com ou sem o uso de agentes antimicrobianos, resultam em redução significativa da inflamação peri-implantar (avaliada pela redução do sangramento durante a sondagem). No caso dos procedimentos realizados pelos pacientes, o controle mecânico do biofilme associado ao uso de antisséptico pode proporcionar benefícios em termos de redução do sangramento durante a sondagem e, em algumas situações, redução no índice de placa. Para a peri-implantite, os resultados obtidos com os tratamentos realizados pelos profissionais tem sido limitados, especialmente em termos de redução de bolsa e profundidade de sondagem, entretanto, os efeitos sobre o sangramento durante a sondagem tem sido mais significativos. O tratamento cirúrgico da peri-implantite é indicado quando o tratamento não cirúrgico não consegue controlar as alterações inflamatórias. A seleção da técnica cirúrgica deve basear-se nas características das lesões peri-implantares. Na presença de defeitos circunferenciais profundos e intra-ósseos,

intervenções cirúrgicas devem procurar disponibilizar debridamento completo, descontaminação do implante da superfície e da reconstrução do defeito. Na presença de defeitos ósseos sem paredes claras ou com um componente supra-ósseo predominante, o objetivo da intervenção cirúrgica deve ser o debridamento completo e o reposicionamento da mucosa marginal para permitir que o paciente possa realizar as práticas de higiene oral eficazes, embora esse objetivo pode comprometer o resultado estético da restauração implanto-suportada.

2.2 Estudos Sobre Filmes de HMDSO Polimerizados a Plasma

Segundo d'Agostino, em 1990, a estrutura e a composição de filmes organosilicones polimerizados a plasma podem ser modificadas, de forma controlada, por meio da seleção criteriosa de certos parâmetros utilizados no processo. Os efeitos mais substanciais são obtidos pela variação da potência da descarga, a temperatura do substrato e a concentraçãoo do gás reativo ou co-monômero introduzidos no vapor do monômero. Em geral, a variação aceitável desses parâmetros permite o controle da concentração de grupos orgânicos no filme polimérico polimerizado a plasma; em casos extremos, um material quase completamente inorgânico (ou seja, com praticamente nenhum conteúdo de carbono) pode ser formado. A potência da descarga e a temperatura do substrato parecem ter influência similar sobre a estrutura de um dado filme polimérico, embora os mecanismos envolvidos sejam diferentes. Quando a potência é variada, a estrutura do filme polimérico é afetada, principalmente, pela fragmentação do monômero, enquanto o aumento na temperatura do substrato leva à pirólise do filme em formação e a mobilidade superficial das espécies precursoras no substrato são

os fatores que influenciam a estrutura do filme obtido. Medidas de ângulos de contato com água e outros líquidos com diferentes polaridades têm revelado que os filmes organosilicones polimerizados a plasma possuem pouca molhabilidade apresentando baixa energia livre de superfície. Em algumas situações, os ângulos de contato para filmes de HMDSO polimerizados a plasma em condições de alta potência apresentam valores entre 120° e 180°, indicando característica hidrofóbica.

Em 1997, Alexander et al.[4] realizaram experimentos com o objetivo de melhorar a compreensão das reações que ocorrem em plasmas com rádio-frequência (RF) de hexametildisiloxano (HMDSO). Foram utilizadas espectrometria de massa (MS) e medições da taxa de deposição. Os filmes finos de HMDSO foram depositados sobre substratos de silício e analisados por espectroscopia de fotoelectróns de raios-X (XPS). Em plasmas de baixa potência, os dados íon-positivos de MS revelaram que extensiva oligomerização molecular ocorre dentro da fase gasosa do plasma. No entanto, nenhuma formação significativa de espécies oligoméricas neutras foi detectada. A análise por XPS revelou que a estequiometria do filme depositado foi mais próxima daquela dos oligômeros detectados por MS que a do composto de partida (monômero). No plasma de potência mais elevada, foi observado aumento de fragmentação do monômero, com concomitante perda de massa de espécies com massa mais alta e carregadas positivamente. Novamente, nenhuma formação significativa de espécies de massa neutra maior que a do monômero foi detectada. A taxa de deposição aumentou de cerca de 6,5-15 ng s^{-1} sobre a faixa de potência avaliada. Conclui-se que em plasma de baixa potência, as reações íon-molécula são responsáveis pela formação dos depósitos. Os autores

propuseram que em alta potência, o componente iônico desses plasmas ainda é importante, em termos de deposição.

Gengenbach et al.[30], em 1999, monitoraram filmes de hexametildisiloxano (HMDSO) e de hexametildisilazano (HMDSA) polimerizados a plasma por meio de análises de XPS, FTIR e medidas de ângulo de contato, à medida que esses filmes eram armazenados a seco (envelhecimento). De particular interesse, foi a influência da estrutura do monômero nas propriedades em longo prazo dos filmes depositados: em materiais convencionalmente sintetizados de organosilicone, a unidade siloxano proporciona estabilidade muito boa em longo prazo, enquanto a estrutura silazano é mais susceptível ao ataque hidrolítico. Durante a deposição a plasma de ambos os filmes, a remoção de grupos metílicos foi o maior mecanismo de ativação e a estrutura do monômero foi mantida em magnitude substancial. No caso do filme de HMDSA polimerizado a plasma, entretanto, outras reações como a clivagem das ligações Si–N resultaram em diversidade estrutural consideravelmente maior. Durante o armazenamento em ar, o filme de HMDSO polimerizado a plasma sofreu pequenas alterações químicas como incorporação de ligações adicionais de siloxano e perda também pequena de grupos metílicos. As estruturas químicas dos filmes de HMDSO, tanto logo após a deposição como após o envelhecimento, foram homogêneas, comparadas com a grande variação de estruturas químicas tipicamente encontradas na maioria dos polímeros depositados a plasma. A estrutura do filme de HMDSA polimerizados a plasma, por outro lado, mudou drasticamente no envelhecimento: quase todos os “moieties” silazanos foram perdidos após 1 ano e quantidades substanciais de oxigênio foram incorporadas, principalmente na forma de ligações siloxano. Apesar das diferenças químicas

iniciais, os dois tipos de filmes tornaram-se mais similares com o tempo, com estruturas finais após o envelhecimento baseadas em siloxano com ligações cruzadas. A molhabilidade refletiu as diferenças estruturais entre os dois filmes. Entretanto, correlações entre as estruturas e as propriedades de superfície não foram previsíveis. Em geral, a molhabilidade dessas superfícies foi determinada por um balanço complexo de vários fatores como estrutura química, topografia e mobilidade.

Vautrin-Ul et al.[114], em 2000, utilizaram um reator de plasma de micro-ondas para a deposição do filme polimerizado a plasma a partir de misturas de hexametildisiloxano (HMDSO) e oxigênio (O_2) em amostras de ferro. O plasma foi caracterizado por espectroscopia de emissão óptica em função da proporção HMDSO/O_2. Espectroscopia de infravermelho foi utilizada para investigar a estrutura do filme. A variação no conteúdo do HMDSO no plasma proporciona grande variedade de filmes, desde sílica (conteúdo de HMDSO: 20%) até polímero (conteúdo de HMDSO > 80%). A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para predizer as propriedades protetoras do filme em relação à corrosão. Diferentes proporções de HMDSO/O_2 na mistura de gases proporcionaram vários graus de proteção contra a corrosão e a melhor proteção foi obtida para o filme polimerizado a plasma, utilizando conteúdo de 80% do precursor HMDSO. Os autores observaram que a composição da fase gasosa e a da estrutura do filme são claramente correlacionadas. Ambos dependem da percentagem de HMDSO na mistura gasosa. Em alta percentagem de HMDSO, o filme é polimérico e a fase gasosa é rica em espécies contendo carbono (C_2, CH). Por outro lado, em baixa percentagem de HMDSO, o filme é similar à sílica, com pouca quantidade de

carbono, e a fase gasosa é composta, principalmente, de espécies contendo oxigênio (OH, CO). A avaliação da densidade do filme confirmou esse resultado. Em baixa proporção HMDSO/O_2, a densidade é próxima da sílica térmica (2,22 g cm^{-3}), e, em alta proporção, a densidade é muito menor (1,4 g cm^{-3}). Proteção eficiente das amostras de ferro contra a corrosão foi obtida por meio do filme polimerizado a plasma em reator de micro-ondas. No entanto, a qualidade da proteção depende do teor de HMDSO no gás do plasma. A melhor proteção é alcançada para o filme polimerizado a plasma com 80% de HMDSO na mistura com uma espessura entre 1 e 4 µm. Além disso, os resultados sugerem que essa composição de gás no plasma conduz à elevada taxa de deposição (100 nm min^{-1}).

Choudhury et al.[15], em 2010, prepararam filmes de hexametildisiloxano (HMDSO) com espessura variando de 282 a 929 nm por meio do método de deposição química a vapor assistida por plasma com radio frequência (RF-PACVD), utilizando mistura de Ar/HMDSO/O_2. O processo de deposição foi realizado em um reator de radio frequência com pressão de trabalho de $1,2 \times 10^{-1}$ mbar e potência variando de 20 a 100 W. Os filmes foram depositados sobre substrato de liga de cobre (78%) e ferro (22%). A partir dos estudos das características das descargas de Ar/O_2 e Ar/HMDSO/O_2 utilizando sonda emissiva foi observado que os elétrons apresentam papel importante na polimerização a plasma de monômeros de HMDSO. A temperatura eletrônica do plasma de Ar/O_2 aumenta (de 5,25 para 5,85 eV) enquanto para o plasma de Ar/HMDSO/O_2, ela diminui (de 5 para 3,5 eV) com o aumento da potência de radio frequência. Na polimerização a plasma do monômero HMDSO, os elétrons perdem sua energia de 0,25 para 2,35 eV quando a potência de radio frequência aumenta de 20 para 100 W. Esse resultado possivelmente indica

que os elétrons utilizam sua energia principalmente na ionização e na dissociação do HMDSO através de colisões inelásticas e, dessa forma, possuem papel importante no processo de polimerização a plasma. A espectroscopia óptica de emissão e a espectroscopia infravermelha transformada de Fourier mostraram que os filmes de HMDSO depositados a plasma apresentaram tendência de serem mais inorgânicos em natureza em altas potências de radio frequência. Um filme preparado com radio frequência de 100 W exibiu mais estabilidade térmica e resistência à corrosão quando comparado com filmes depositados com potências mais baixas (20 a 80 W).

No mesmo ano, Guruvenket et al.[34], relataram que os filmes amorfos hidrogenados à base de carbeto de silicone (a-SiC:H) parecem ser muito atrativos devido às suas propriedades mecânicas e ópticas e por serem quimicamente inertes. Neste estudo, filmes de a-SiC:H foram preparados pelo método PECVD sobre substratos de aço inoxidável 301 (SS301) e Ti–6Al–4V (TiAlV) na temperatura de 300 °C, utilizando diferentes proporções dos precursores SiH_4/CH_4. As propriedades mecânicas como dureza, módulo de Young e recuperação elástica foram sistematicamente avaliados por meio de identação, e as características tribológicas como coeficiente de fricção e de desgaste utilizando o método “pin-on-disc”, assim como o comportamento de corrosão e tribo-corrosão. Os filmes a-SiC:H films (~3 µm de espessura) preparados sobre SS301 e TiAlV em condições ótimas de deposição exibiram dureza de 23,5 GPa, módulo de Young de 160 GPa e recuperação elástica de 73%. Os filmes mostraram coeficiente de fricção de ~0,35, e velocidade de desgaste de 10×10^{-6} mm^3/Nm. Esses valores são baixos comparados a ~0,85 e ~0,5, 240×10^{-6} mm^3/Nm e 700×10^{-6} mm^3/Nm para SS301 e TiAlV,

respectivamente. Os filmes exibiram, ainda, alta resistência à corrosão e tribo-corrosão nos dois substratos metálicos. O comportamento do filme é correlacionado com a microestrutura e a composição, determinadas pela caracterização complementar realizada com técnicas de detecção de recuperação elástica, FTIR e Raman.

Em 2011, Ricci et al.[90] utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier estudaram a formação de partículas de pó em plasmas de hexadimetilsiloxano/O_2. Os espectros demonstraram que o oxigênio tem papel importante no início do processo. Grande quantidade de oxigênio é responsável por formação intensa de pó. A mistura de gases inertes ou não reagentes, como Ar e N_2, no plasma promove a polimerização do monômero. A formação de particulados, a evolução do tamanho das partículas e suas características químicas proporcionaram evidência de um processo de crescimento que ocorre em múltiplas fases. O tamanho, bem como a velocidade de produção, apresentou redução quando o conteúdo de Ar ou N_2 foi aumentado na mistura do plasma.

2.3 Estudos Sobre Película Salivar

Em 2001, Sipahi et al.[104] avaliaram o efeito da película de saliva na molhabilidade e na energia livre de superfície de diferentes materiais para base de prótese. Foram avaliadas cinco diferentes resinas acrílicas (QC-20, termopolimerizável; Palapress – autopolimerizável e técnica por injeção; Acron MC – polimerizada por micro-ondas; Triad – fotopolimerizável; Takilon – autopolimerizável) e dois materiais metálicos (liga de cobalto-cromo e titânio puro) para base de

prótese. Dez amostras de cada material (20 × 15 × 1,5 mm) foram confeccionadas e polidas utilizando um método padronizado. Saliva total não estimulada foi coletada de um único doador saudável. As propriedades de molhabilidade dos materiais foram avaliadas, antes e após a formação da camada orgânica. As forças de molhabilidade foram determinadas de acordo com a técnica de placa de Wilhelmy. Diiodometano, etileno-glicol e formamida foram utilizados. Os ângulos de contato, componentes de energia de superfície Lifshitz-van der Waals, componentes de energia de superfície ácido-base de Lewis e energias de superfície total foram calculados usando diversas equações. A significância das diferenças nas energias superficiais determinadas experimentalmente nos diferentes materiais dentários foi calculada utilizando métodos estatísticos. A resina acrílica fotopolimerizável foi o material com maior molhabilidade com caráter básico significativo. As camadas orgânicas diminuíram as energias livres de superfície total de todos os materiais e, ao mesmo tempo, proporcionaram carácter mais básico. As películas salivares formadas tiveram efeito homogeneizador em termos dos componentes de energia livre de superfície dos materiais para base de prótese; no entanto, suas propriedades adesivas ainda foram influenciadas pelo substrato utilizado.

Segundo Göcke et al.[31], em 2002 a formação de uma película salivar é um mecanismo de defesa do corpo para todas as superfícies da cavidade oral. A natureza do substrato pode influenciar a composição da película. Assim, os autores investigaram a composição quantitativa e a variação individual da película salivar formada em material para base da prótese (PMMA). Amostras cilíndricas de PMMA foram confeccionadas e inseridas na cavidade oral e, em seguida, colocadas em solução de cloreto de sódio a 0,5-M. A solução foi analisada com relação às

seguintes substâncias: proteína total, alfa-amilase, proteases, inibidores de protease, imunoglobulina A, imunoglobulina G, peroxidases, tiocianato, lisozima, e cálcio. Todos os componentes salivares investigados puderam ser encontrados inequivocamente na solução em que foram colocadas as amostras, indicando a formação da película salivar sobre a superfície do PMMA. Altos coeficientes de variação indicaram grandes variações individuais nas quantidades adsorvidas. Os dados também mostraram grandes variações intra-individuais para os componentes salivares adsorbidos. Apenas os inibidores da protease revelaram forte correlação positiva com a atividade salivar. Foi sugerido que as diferenças nos valores de componentes antimicrobianos adsorvidos podem influenciar a colonização microbiana em resinas acrílicas para bases de próteses e que os inibidores de protease podem ser significativos para a disseminação do fungo *Candida albicans* a partir desse material para a mucosa oral. Esses aspectos poderiam explicar as diferentes suscetibilidades dos indivíduos à estomatite induzida por prótese.

Em 2006, Yildirim et al.[122] sugeriram que a alteração das propriedades de superfície da resina acrílica pode alterar a natureza da película adsorvida e, assim, a aderência microbiana. Em função disso, realizaram um estudo para avaliar a adsorção de mucinas salivares sobre superfícies de resina acrílica, modificadas. Amostras de polimetilmetacrilato foram tratadas pela técnica de plasma, utilizando o monômero hidrofílico 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) ou o gás oxigênio (O_2) e o monômero hidrofóbico hexametildisiloxano (HMDSO), em diferentes potências (50 W e 100W). Esses tratamentos foram selecionados para permitir diferentes graus de hidrofobicidade das superfícies. As amostras de resina acrílica foram incubadas com mucina, de elevado peso molecular, MG1, purificada a partir da saliva, as frações

adsorvidas foram transferidas para membranas de nitrocelulose pela técnica de slot-blot, coradas com ácido periódico de Schiff, e as intensidades de cor foram analisadas por um densitômetro de cor. Maiores quantidades de mucinas foram adsorvidas em todas as superfícies modificadas por tratamento a plasma, quando comparadas com o controle. Os ângulos de contato mensurados com água destilada foram: controle (sem tratamento) - 78,65°; amostras tratadas com o monômero HEMA nas potências de 50 W e 100 W - 22,30° e 46,00°, respectivamente; amostras submetidas ao plasma de oxigênio - 22,30° e 15,35° para as potências de 50 e 100W, respectivamente; 89,20° para as tratadas com HMDSO e 50 W e 78,80° para as tratadas com HMDSO e 100W. Dentro das limitações do presente estudo, concluiu-se que o tratamento a plasma alterou as superfícies de materiais para base de prótese e aumentou significativamente a adsorção de mucinas com elevado peso molecular em níveis diferentes dependendo dos parâmetros do plasma. As amostras tratadas com o monômero hidrofílico HEMA apresentaram os maiores valores de adsorção de MG1.

A primeira etapa para a adesão de microrganismos sobre superfícies dentais é a formação da película adquirida. Essa camada, principalmente acelular, é formada instantaneamente em todas as superfícies sólidas expostas aos fluidos orais. É composta de proteínas, glicoproteínas e lipídeos. Entretanto, informação sobre a composição lipídica é escassa. Dessa forma, o objetivo do estudo de Reich et al.[88], em 2013, foi avaliar o perfil de ácidos graxos (AG) de uma camada de película formada in-situ pela primeira vez. AG são os constituintes básicos da maioria dos componentes que são classificados como lipídios. Portanto, os AG são considerados, em grande parte, responsável pelas características definidoras

desses lipídios. Um conhecimento mais amplo da composição lipídica do biofilme oral inicial ajudará a entender melhor os processos de bio-adesão oral e o fenômeno da bio-adesão em geral. Neste estudo, películas foram formadas in situ em blocos de esmalte bovino posicionados em aparelhos individuais em arcos superiores. Os aparelhos foram utilizados por períodos variando de 3 a 240 min. Após a preparação completa da amostra, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foi utilizada para caracterizar quantitativa e qualitativamente vasta gama de AG (C12-C24). Os perfis de AG das amostras de películas obtidas de diferentes indivíduos foram muito similares, enquanto a quantidade de AG mostrou variabilidade significante inter-individual. Aumento de AG na película foi observado ao longo do tempo. A formação de película é um processo altamente seletivo, que não se correlaciona diretamente com a composição salivar, como demonstrado para os AG. Conhecimento abrangente do perfil de ácidos graxos da película pode contribuir com informações importantes sobre a seletividade e a dinâmica da formação de biofilme, bem como trazer informações mais detalhadas sobre a adesão bacteriana. Acúmulo constante de AG foi observado após 60 min de exposição oral, que pode ser explicado, principalmente, pelo aumento da quantidade total de componentes da película adsorvida associado com o aumento da espessura da película, em geral. Os AG são componentes lipofílicos fundamentais da película in-situ e apresentam perfil característico em adultos saudáveis. A formação altamente seletiva da camada de película é apenas um exemplo no processo de bio-adesão. Compreender os biofilmes condicionantes continua sendo um grande desafio. Os métodos descritos neste estudo são úteis para a caracterização dos AG em lipídios em qualquer biofilme aderente.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto nos capítulos anteriores, os objetivos deste estudo foram:

1) Depositar filmes de HMDSO polimerizados a plasma sobre resina acrílica, titânio e zircônia, variando-se a proporção de argônio (Ar) na mistura de gases.

2) Avaliar as propriedades e as características de superfície dos filmes obtidos.

3) Avaliar o efeito dos filmes depositados na formação de biofilmes microbianos sobre os três materiais (resina acrílica, titânio e zircônia), pré-condicionados ou não em saliva humana.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Confecção dos Corpos de Prova de Resina Acrílica

Os corpos de prova de resina acrílica Vipi Wave (VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda., Pirassununga, SP, Brasil) foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas, com cavidades de 10 mm de diâmetro por 2 mm de profundidade que foram isoladas previamente à inclusão[118]. Inicialmente, a parte inferior da mufla específica para micro-ondas foi isolada e preenchida com gesso pedra tipo III sobre o qual foi, então, posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz. Após a presa do gesso, a matriz metálica foi fixada sobre a placa de vidro e silicone foi posicionado ao redor da mesma, para facilitar sua remoção na fase de desinclusão. Outra placa de vidro foi, então, fixada sobre a matriz, a contra-mufla foi posicionada e preenchida com gesso de maneira convencional. Após a presa do gesso, a mufla foi aberta e a matriz foi preenchida com a resina, proporcionada conforme recomendação do fabricante (14 g de pó e 6,5 mL de líquido). Em seguida, a mufla foi fechada e o processo de polimerização em forno de micro-ondas foi realizado como recomendado pelo fabricante (Forno de 500 W – 20 minutos com 20/30% de Potência + 5 minutos com 80/100% de Potência). Após o resfriamento da mufla, essa foi aberta, os corpos de prova foram retirados e os excessos laterais removidos com fresas para acabamento.

Os corpos de prova (8 mm de diâmetro × 2 mm de espessura) de titânio foram obtidos da empresa Conexão Sistemas de Próteses, São Paulo, Brasil, e os corpos de prova de zircônia foram obtidos a partir do sistema CAD/CAM Ceramill (Amann Girrbach Brasil LTDA).

Figura 1- Matriz metálica isolada com vaselina

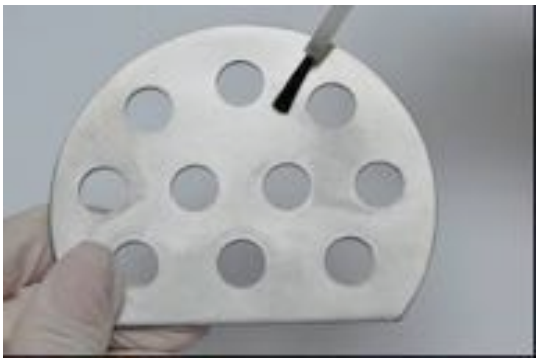


Figura 2 – Matriz metálica incluída em mufla sobre lâmina de vidro

Figura 3 – Matriz metálica envolta por silicone

Figura 4 – Lâmina de vidro colada sobre matriz metálica

4.2 Medida da Rugosidade Superficial (Ra)

Tendo em vista a possível influência da rugosidade na adesão microbiana, a rugosidade dos corpos de prova foi medida. Para isso, foi utilizado um rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japão), com precisão de leitura de 0,01 µm, comprimento de leitura de 2,5 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o

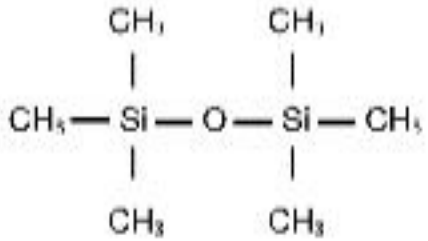
raio da ponta ativa de 5 µm. Quatro medidas para cada corpo de prova foram realizadas e o valor médio entre elas foi considerado o valor da rugosidade (Ra-µm). As medidas foram realizadas por um único operador. Os corpos de prova de resina acrílica com rugosidade média de, aproximadamente, 0,2 µm [3, 10] foram selecionados para a deposição dos filmes. A rugosidade dos corpos de prova de titânio (n=6), fornecidos por sistema Conexão Sistemas de Próteses Ltda., SP, Brasil, bem como dos corpos de prova de zircônia (n=6), obtidos pelo sistema CAD/CAM Ceramil, também foi mensurada previamente aos experimentos.

4.3 Deposição e Caracterização de Filmes de HMDSO nos Corpos de Prova

Os corpos de prova de resina acrílica e de zircônia foram inicialmente limpos em banho ultrasônico de solução de água de detergente para remoção de compostos, intensamente enxaguados em água corrente e subsequentemente secos sob fluxo de ar quente. Os corpos de prova de titânio foram obtidos da empresa esterilizados e embalados individualmente. O sistema de plasma, descrito em detalhes em outro trabalho[85], consiste essencialmente de um reator de vidro com vedações de alumínio evacuado por uma bomba de palhetas rotativas. Para o estabelecimento do plasma existem dois eletrodos de aço inoxidável dentro do reator, capacitivamente acoplados a uma fonte de radiofrequência. Os corpos de prova limpos foram acomodados no eletrodo inferior do sistema de plasmas empregado neste trabalho. A pressão do sistema foi reduzida para cerca de 12 Pa, hexametildisiloxano (HMDSO), composto precursor para a deposição do filme, foi admitido até a pressão preestabelecida e argônio foi incorporado até atingir a pressão de trabalho. A estrutura química deste composto é apresentada na Figura 5. O plasma foi estabelecido pela aplicação de radiofrequência (13,56 MHz, 50 W) ao eletrodo

inferior. O eletrodo superior e as flanges metálicas do sistema foram aterradas. Variou-se a proporção de argônio na mistura de gases de 15 a 70%. O tempo de deposição foi mantido constante em todos os experimentos em 1800 segundos. Dessa forma foram depositados filmes com 0, 15, 30, 50 e 70% Ar em resina acrílica; 0 e 15% Ar em superfície de titânio e 15% Ar em superfície de zircônia.

Figura 5 – Molécula de HMDSO



A espessura da camada depositada foi determinada por perfilometria, utilizando-se corpos de prova de cada material contendo um degrau. Para isso, o corpo de prova foi parcialmente coberto com uma fita adesiva resistente ao plasma (Kapton) protegendo essa região. Após a deposição, a fita foi removida revelando o degrau entre a região exposta ao plasma e aquela protegida. A altura do degrau, que corresponde à espessura de cada um dos filmes depositados (n=6), foi medida em 10 diferentes posições com o auxílio de um perfilômetro Veeco Dektak 150 (Figuras 6 e 7). Com esse mesmo equipamento, também foi avaliado a rugosidade de cada um dos filmes obtidos (n=6) sobre os três materiais avaliados, fazendo 10 medidas em diferentes posições sobre a superfície do corpo de prova tratado.

A receptividade de cada um dos filmes obtidos (n=6) à água e ao diiodometano foi determinada pelo método da gota séssil em ambiente com temperatura e umidade controladas. Gotas foram depositadas em dois diferentes pontos de cada corpo de prova, sendo realizadas 10 medidas em cada lado da gota, totalizando 20

valores para cada superfície. A energia de superfície foi determinada a partir dos valores de θ obtidos com o diiodometano e a água (Figura 8) utilizando o programa disponibilizado no próprio equipamento. A receptividade de cada um dos filmes à água (hidrofobicidade/hidrofilicidade) foi também avaliada 7 dias após a deposição, tendo sido os corpos de prova armazenados a seco e em temperatura ambiente durante esse período. para avaliar a hidrofobicidade e a energia de superfície dos filmes depositados em cada material.

Figura 6 – Perfilômetro

Figura 7 – Ponta que realiza a leitura

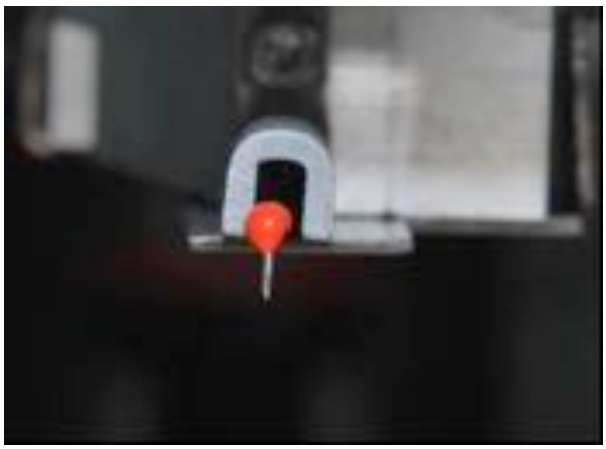
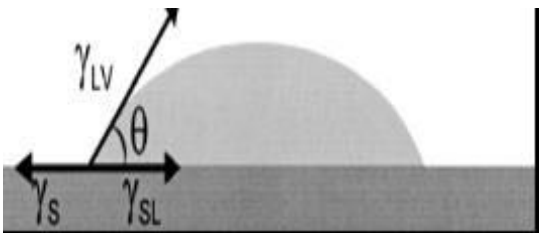


Figura 8 – Representação esquemática de uma gota de um líquido depositada na superfície de um sólido e das tensões superficiais nas fases sólido-vapor (γ_{SV}), sólido-líquido (γ_{SL}) e líquido-vapor (γ_{LV}).



Para cada um dos filmes depositados (n = 3) sobre substratos refletores (titânio) foram submetidos a análises por espectroscopia no infravermelho usando o método IRRAS (Infrared Reflectance Absorbance Spectroscopy) utilizando um equipamento da Jasco FTIR 410. Os espectros resultantes correspondem à média entre 128 varreduras obtidas em cada corpo de prova com resolução de 4 cm^{-1}. As análises foram realizadas após a deposição dos filmesOs filmes preparados foram, ainda, submetidos à Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS), 7 dias após a deposição (n = 1 para cada um dos filmes obtidos). Essa técnica permite a análise elementar quantitativa dos elementos na superfície e a identificação de grupos funcionais. Foi utilizado um espectrômetro VG Microtech - ESCA 3000 com 9 channeltrons e um analisador semi-hemisférico de 250 mm com uma pressão de base de 2×10^{-8} Pa, utilizando radiação de Al Kalfa. A resolução do aparelho é de cerca de 0,8 eV. A morfologia dos corpos de prova foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, SEM, em um equipamento da Jeol Modelo 6010LA. Para evitar carregamento da superfície durante as inspeções, os corpos de prova foram, inicialmente, recobertos com uma fina camada condutora (~16 nm) produzida a partir do sputtering de uma liga de Au-Pd (40 mA, 60 s). As micrografias foram adquiridas com o detector de elétrons secundários com tensões de aceleração de 6 kV e com diferentes ampliações. Para cada filme depositado nos três materiais avaliados, 2 corpos de prova foram utilizados para as análises em MEV.

4.4- Pós-tratamento Com O_2

Alguns dos filmes obtidos a partir da deposição de plasmas de HMDSO e Ar foram, posteriormente, tratados em plasmas de oxigênio (O_2) visando-se obter filmes hidrofílicos. A proposta desse pós-tratamento foi remover, através do processo de

ablação química, carbono da superfície do filme, resultando em algumas monocamadas de SiOx, material que resiste ao ataque do oxigênio e é hidrofílico. Os parâmetros desse plasma de O_2 foram de 1,3 Pa, 50 W e 30 minutos. Para a obtenção de filmes hidrofílicos, os filmes hidrofóbicos em resina acrílica (0% Ar, 15% Ar e 30% Ar), em titânio (0% Ar e 15% Ar) e em zircônia (15% Ar) foram submetidos ao pós-tratamento com O_2.

4.5 Limpeza a Plasma

O tratamento de limpeza a plasma nos corpos de prova de titânio e de zircônia previamente aos procedimentos de deposição foi realizado utilizando o mesmo reator de vidro. O objetivo desse tratamento foi obter melhor adesão dos filmes de HMDSO às superfícies dos corpos de prova, evitando, assim, seu descolamento. Foram utilizados hidrogênio (H) e argônio (Ar), com 0,5 Pa para cada gás. A potência e o tempo utilizados foram de 150W e 10 minutos, respectivamente[85].

4.6 Testes Microbiológicos

4.6.1 Microrganismos e condições de crescimento

Para a formação dos biofilmes nos corpos de prova de resina acrílica, foi utilizada *Candida albicans* (ATCC 90028) e nos de titânio e de zircônia foi utilizada *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

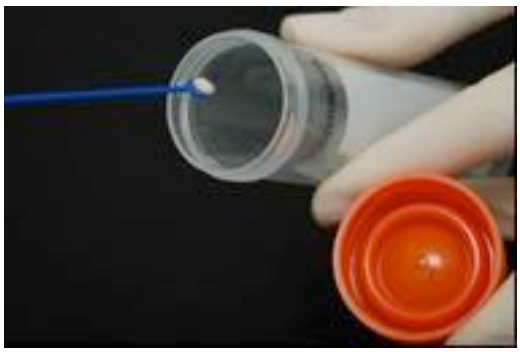
4.6.1.2 Preparo do inóculo de *C. albicans*

C. albicans foi semeada em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 37 °C por 48 h (Figura 9). A seguir, uma alçada da levedura foi transferida para 20 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) (Figura 10) adicionado de glicose 50 mM. Após a incubação a

37 ºC por 24 h, sob agitação, as células foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS estéril (NaCl 100 mM, NaH_2PO_4 100 mM-, pH 7,2). As células foram ressuspensas em 20 mL de YNB estéril adicionado de 100 mM de glicose. A densidade óptica da suspensão foi padronizada utilizando-se espectrofotômetro, com filtro de 520 nm, a um valor de 1×10^7 células/mL (da Silva et al.[18], 2010).

Figura 9 – *C. albicans* semeada em SDA após 48h

Figura 10 - Alçada da levedura sendo transferida para YNB



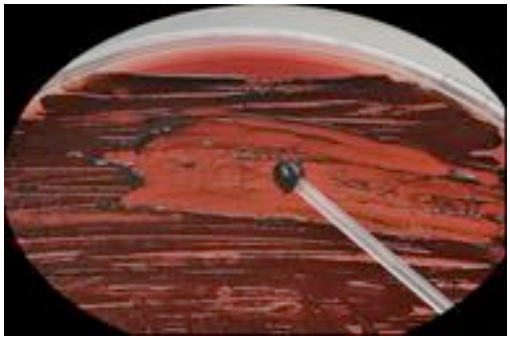
4.8.2 Preparo do inóculo de *P. gingivalis*

P. gingivalis foi semeada em Agar sangue com hemina e menadiona, por 15 dias a 37 °C, em câmara de anaerobiose (Don Whitley) (Figura 11). Uma alçada dessa cultura foi, então, semeada em uma nova placa de Agar sangue com hemina e menadiona foi semeada e deixada por 48 horas a 37 °C, em câmara de anaerobiose. A seguir 6 alçadas (Figura 12), foram transferidas para 15 ml de caldo de brain heart infusion (BHI), acrescido de hemina e menadiona. Então, o microrganismo foi deixado em câmara de anaerobiose 37 °C durante 48 horas. Após esse período, 900 µL deste caldo foram adicionados em 7,9 mL de caldo de BHI, acrescido de hemina e menadiona e, incubados durante 35 horas em câmara de

anaerobiose a 37 °C. Todos esses períodos foram determinados a partir de vários testes pilotos. Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e lavadas 2 vezes com PBS estéril. Em seguida, a densidade óptica da suspensão foi padronizada utilizando-se espectrofotômetro, com filtro de 520 nm, a um valor de 1×10^7 células/mL.

Figura 11 - Câmara de anaerobiose com placas de *P. gingivalis*

Figura 12 – *P. gingivalis* semeada em ágar sangue após 48 horas em câmara de anaerobiose



4.7 Coleta, Preparo e Pré-Condicionamento dos Corpos de Prova Com Saliva Humana

Para simular a condição bucal e avaliar os possíveis efeitos da saliva na formação dos biofilmes, metade dos corpos de prova foi pré-condicionada com saliva. Para a execução da metodologia com saliva humana, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética (CEP/CONEP – número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE - 23957113.1.0000.5416), tendo sido aprovado. A saliva foi coletada de 15 voluntários saudáveis, de ambos os sexos, adultos, com ausência de cárie ativa e doença periodontal [12, 13, 55]. Os voluntários não fizeram uso de antibiótico nos últimos 3 meses, para evitar interferências com a

composição e a fluidez da saliva [65]. As coletas foram realizadas no período da manhã, com os participantes em jejum e previamente à higienização. Os participantes expectoraram 20 ml de saliva não estimulada em um tubo Falcon esterilizado e refrigerado em gelo [128]. A saliva coletada foi misturada e submetida à centrifugação de 10.000 *g* por 5 min a 4°C [65, 128]. A saliva sobrenadante foi esterilizada utilizando filtro de membrana com 0,22 µm de diâmetro dos poros [55, 97], distribuída em alíquotas no volume pré-estabelecido para cada momento do experimento, em tubos Falcon.

Na sequência, os tubos falcons foram, imediatamente, armazenados a -20°C até a utilização[3, 37]. Os corpos de prova foram colocados em placas de 24 orifícios com 2 mL de saliva previamente preparada e incubados durante 1 hora[96] a 37°C, sob agitação. Após o pré-condicionamento em saliva humana, foi realizada a sequência de formação de biofilme para cada material com os respectivos microrganismos (resina acrílica - *C. albicans;* titânio e zircônia - *P. gingivalis*).

4.8 Formação dos Biofilmes

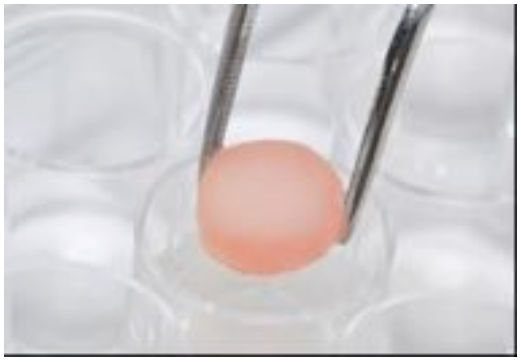
4.8.1 Biofilme de *C. albicans*

Dois mL da suspensão padronizada de *C. albicans* foram aplicados sobre os corpos de prova com e sem armazenamento de saliva, para a primeira fase de formação dos biofilmes – fase de adesão. Nessa fase, os corpos de prova foram posicionados, individualmente, nos compartimentos de uma placa de cultura estéril de 24 orifícios e mantidos durante 90 min (adesão), a 37 °C, sob agitação. Posteriormente, os corpos de prova foram lavados duas vezes, cuidadosamente, com 2 mL de PBS estéril (Figura 13). Então, YNB estéril contendo 100 mM de glicose, foi adicionado em cada orifício para a fase seguinte de formação do biofilme

[18]. As placas de cultura foram, então, mantidas a 37 °C, sob agitação, por 24 h. Decorrido esse período, 1 mL do meio de cultura foi removido de cada orifício da placa e 1 mL do YNB com 100 mM de glicose foi adicionado. As placas foram, então, mantidas a 37 °C, sob agitação, até completar 48 h de formação dos biofilmes (Figura 14).

Figura 13 – Lavagem dos corpos de prova

Figura 14 – Formação de biofilme após 48 horas



4.8.2 Biofilme *P. gingivalis*

Dois mL da suspensão padronizada de *P. gingivalis* foram aplicados sobre os corpos de prova de titânio e zircônia, com e sem armazenamento de saliva. A placa foi incubada em anaerobiose, a 37 °C, para a adesão dos microrganismos aos corpos de prova. Após a adesão (24 horas), os corpos de prova foram lavados com PBS estéril (duas vezes) (Figura 15) para a remoção dos microrganismos não aderidos. Posteriormente, 2 mL de BHI, acrescido de hemina e menadiona, foram adicionados para promover o crescimento do biofilme. As placas foram incubadas em anaerobiose, a 37 ºC, por 6 dias (Figura 16). Durante esse período, a cada 48 horas, 1 mL do meio de cultura foi removido de cada orifício da placa e 1 mL de

meio novo foi adicionado. Os períodos para adesão e formação de biofilme da *P. gingivalis* foram determinados após vários testes microbiológicos.

Figura 15 – Lavagem dos corpos de prova

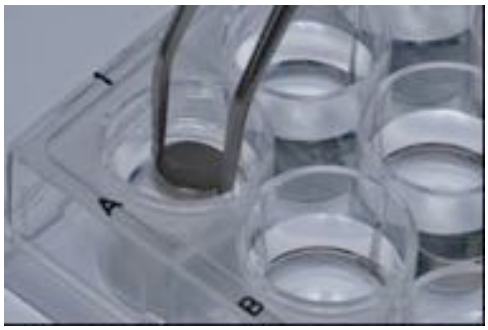


Figura 16 – Formação de biofilme após 7 dias.

Controles negativos (*C. albicans* e *P. gingivalis*) foram constituídos de corpos de prova em meio de cultura sem suspensão celular padronizada. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões distintas. Dessa forma, 9 corpos de prova foram testados para cada condição experimental e respectivos controles, perfazendo um total de 180 corpos de prova para a resina acrílica, 90 para o titânio e 54 para a zircônia.

4.9 Análises dos Biofilmes

Os biofilmes obtidos foram analisados por meio da quantificação de colônias (UFC/mL). Após a formação dos biofilmes, os corpos de prova foram lavados (duas vezes), cuidadosamente, com PBS estéril para a remoção de microrganismos não aderidos. Então, foram colocados, individualmente, em tubos Falcon, contendo 10 mL de PBS. Em seguida, esses tubos foram imersos em aparelho ultrassom por 20 minutos para remoção do biofilme. A partir dos 10 ml da suspensão microbiana,

foram realizadas diluições seriadas que foram, então, plaqueadas, em duplicata. Após os períodos de incubação e crescimento celular, 48 horas para *C. albicans* e 15 dias para *P. gingivalis*, foi realizada a contagem de colônias (Figuras 17 e 18) e obtidos os valores de UFC/mL.

Figura 17 – Fotografia ilustrando as colônias da *P. gingivalis*

Figura 18 – Fotografia ilustrando as colônias da *C. albicans*

4.10 Determinação da Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC)

A suspensão celular de *C. albicans* foi incubada, overnight, a 37 °C e 120 rpm. As células foram, então, centrifugadas (9000 *g*, a 4 °C, por 5 min), lavadas com PBS (duas vezes) e ressuspensas em PBS, a uma concentração de 1×10^9 cels/mL. Em seguida, 2 mL dessa suspensão foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (0,45 µm), previamente umedecida com 10 ml de água destilada, para obtenção de uma camada celular. O filtro foi, então, fixado em uma lâmina de vidro e mantido em placa de Petri contendo ágar 1% (p/v) com (v/v) glicerol 10% por 3,5 h [118], quando, então, as medidas de HSC foram determinadas em goniômetro (Ramé-Hart, 100-00).

Resultado

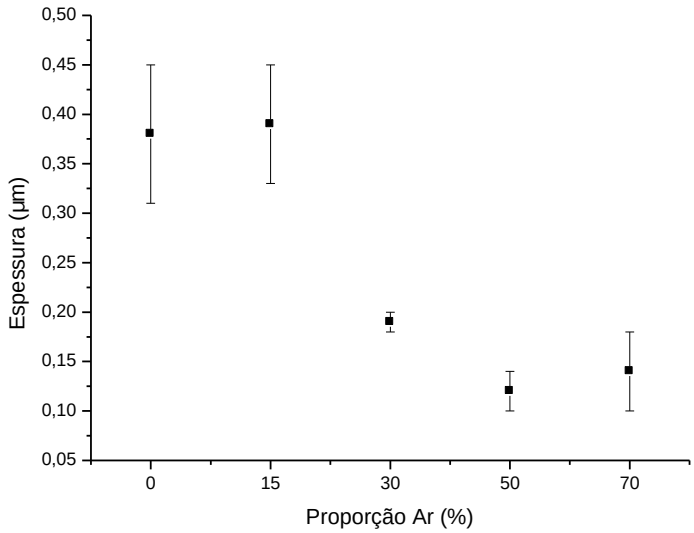
5 RESULTADO

5.1 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Resina Acrílica

5.1.1 Filmes hidrofóbicos

5.1.1.1 Espessura

Figura 19- Espessura (μm) dos filmes depositados em função da proporção de argônio (P_{Ar}) na mistura de gases.

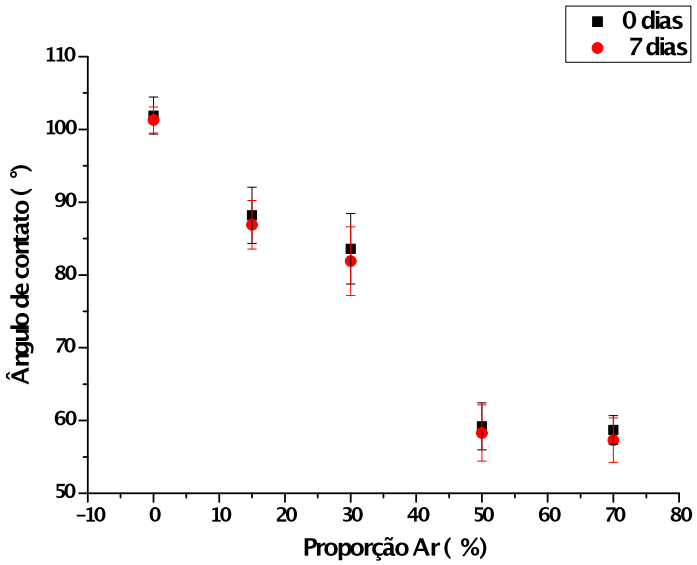


Na Figura 19 são apresentados os resultados de espessura dos filmes em função da proporção de argônio no plasma, P_{Ar}. Os filmes depositados nos corpos de prova de resina acrílica tiveram menor espessura quando a proporção de Ar foi aumentada a partir de 30% (valores em média, 30% Ar - 0,19 μm ± 0,01; 50% Ar - 0,12 μm ± 0,02 e 70% Ar - 0,14 μm ± 0,04). Enquanto para os filmes 0 e 15% Ar os valores foram, em média, 0,38 μm ± 0,07 e 0,39 μm ± 0,06, respectivamente.

5.1.1.2 Ângulo de Contato

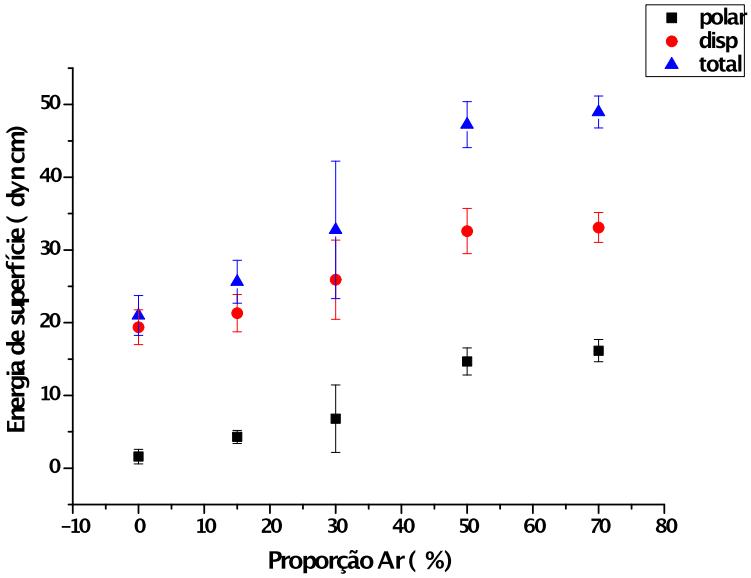
Os resultados de ângulo de contato, obtidos após a deposição (0 dias) e após 7 dias são ilustrados na Figura 20. Considerando-se os resultados obtidos no mesmo dia do tratamento, é possível observar que o filme depositado com 0% Ar no plasma apresentou característica hidrofóbica (101,9° ± 2,54). Houve maior tendência de redução dos valores de ângulo de contato a partir de 50% Ar (50% Ar – 59,2 ° ± 3,22 e 70% Ar – 58,70 ° ± 1,96). Nota-se que, após 7 dias, os valores de ângulo de contato permaneceram praticamente inalterados.

Figura 20 – Ângulo de contato dos filmes em função da proporção de argônio (P_{Ar}) na mistura de gases.



5.1.1.3 Energia Livre de Superfície

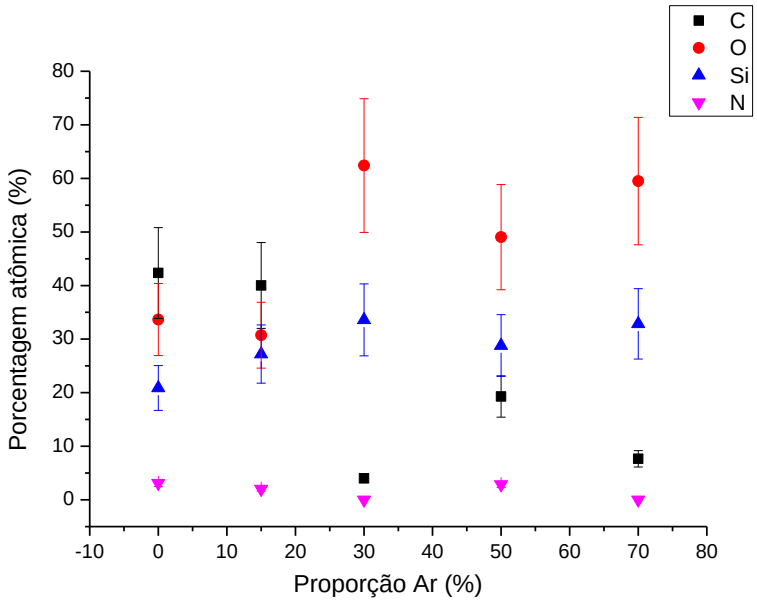
Figura 21 – Componentes polar, $E_{P,}$ e dispersiva, E_D, bem como a total, E_T, da energia de superfície dos filmes depositados em função da proporção de argônio no plasma.



Os resultados de energia livre de superfície são apresentados na Figura 21 em função de P_{Ar}. Considerando-se os valores de energia total (E_T), nota-se aumento em E_T quando a proporção de argônio é aumentada até 50% Ar. Para os valores maiores que 50% da proporção de argônio há estabilidade em E_T.

5.1.1.4 Composição dos filmes (análise de XPS)

Figura 22 – Porcentagem atômica de espécies constituintes dos filmes em função da proporção de argônio (P_{Ar}) na fase plasma.



A Figura 22 mostra as proporções atômicas das espécies que compõem o filme como uma função de P_{Ar}. Como tais resultados foram obtidos por XPS, hidrogênio não foi contabilizado nos cálculos. Muito embora nitrogênio não seja deliberadamente introduzido no reator, ele aparece como um contaminante em baixas proporções, exceto para os filmes depositados com P_{Ar} de 30 e 70%. Nota-se que a proporção de C, [C], é de cerca de 40% nos filmes depositados com P_{Ar} de 0 e 15% sofrendo queda acentuada quando a proporção de Ar é ainda mais aumentada. Valores substancialmente reduzidos para as proporções de orgânicos foram obtidos para P_{Ar} de 30 e 70%. Quando se avalia o comportamento da curva relacionada à proporção de oxigênio, [O], nota-se um comportamento quase exatamente oposto ao

da curva de [C]. Além disto, há aumento progressivo na proporção de Si, [Si], com P_{Ar} até 30% contribuindo com a tendência em [C].

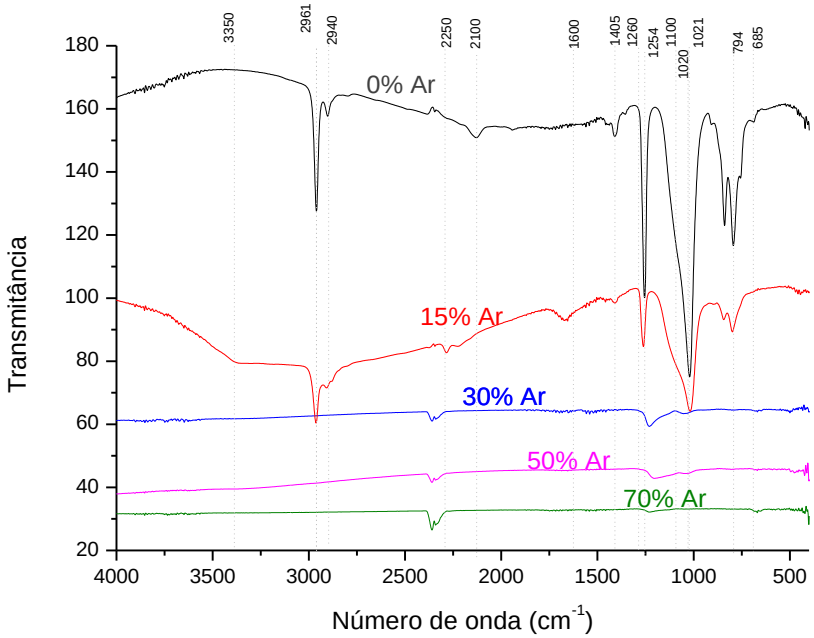
A partir destes resultados e, sem considerar o hidrogênio que certamente está presente, principalmente quando menores proporções de Ar são utilizadas, determinou-se a fórmula química de cada uma das diferentes estruturas. Os resultados são apresentados na Tabela 1, mostrando a redução do carbono e aumento do oxigênio.

Tabela 1- Estrutura molecular dos filmes depositados em resina acrílica.

Filme	**Estrutura molecular**
0% Ar	$Si_1O_{1,61}C_{2,03}$
15%Ar	$Si_1O_{1,13}C_{1,47}$
30%Ar	$Si_1O_{1,86}C_{0,12}$
50%Ar	$Si_1O_{1,7}C_{0,67}$
70%Ar	$Si_1O_{1,81}C_{0,23}$

5.1.1.5 FTIR

Figura 23 – Espectros de infravermelho de filmes depositados a partir de plasmas de HMDSO contendo diferentes proporções de argônio no plasma.



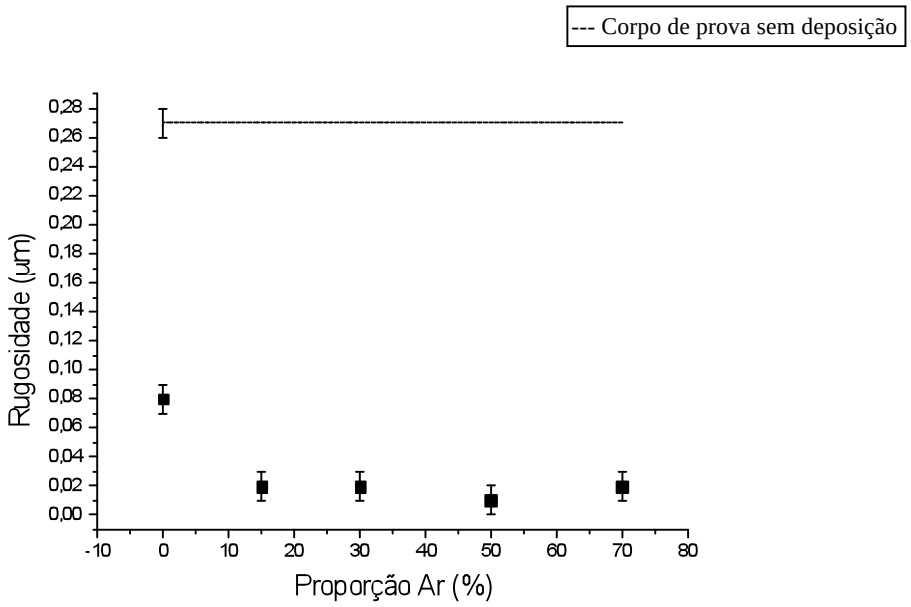
Considerando-se o espectro do filme preparado com 0% de Ar, notam-se bandas características de materiais depositados a partir de plasmas de HMDSO [Vautrin-Ul et al.[114], 2000; Rangel et al.[85], 2012; Lopes et al.[59], 2012]. Essas incluem as absorções relacionadas ao movimento de estiramento (2961 e 2940 cm^{-1}) e de deformação (1405 cm^{-1}) de grupos C-H alifáticos, de deformação de CH_x em grupos metilsilil (1254, 1021, 794 cm^{-1}), de estiramento simétrico (1100 cm^{-1}) e assimétrico (1020 cm^{-1}) de ligações Si-O em Si-O-Si e de estiramento (2100-2250 cm^{-1}) e deformação (685 cm^{-1}) de ligações Si-H. Quando argônio foi introduzido no plasma (observando a curva 15% Ar), nota-se maior incorporação de grupos hidroxilas (~ 1600 e 3350 cm^{-1}). Grupos metil alifáticos, normalmente revelados pela banda em torno de 3000 cm^{-1}, não são mais evidentes quando proporções de argônio maiores que 15% são empregadas. Também não são mais tão evidentes grupos metilsilil (~1260 cm^{-1}), confirmando a depleção de C-H da estrutura. O funcional Si-H, caracterizado pela banda em torno de 2100 cm^{-1} não é mais incorporado na estrutura.

Tabela 2- Números de ondas, atribuições e grupos de filmes depositados a partir de plasmas de HMDSO.

Número de ondas (cm^{-1})	Atribuições	Grupos	
685	Si-H_n		Guruvenket et al.[34], 2010
794	ν Si-C	$Si(CH_3)_2$	Guruvenket et al.[34], 2010
1020, 1021, 1100	ν Si-O	Si-O-Si	Gengenbach et al.[30], 1999
			Choudhury et al.[15], 2010
1254, 1260	∂ C-H_3	$Si(CH_3)_x$	Rao et al.[86], 2010
			Vautrin-Ul et al.[114], 2000
1405	∂ C-H	$Si(CH_3)_x$	Rao et al.[86], 2010
1600	O-H	Free Water	Vautrin-Ul et al.[114], 2000
2100, 2250	νSi-H		Gengenbach et al.[30], 1999
			Scheinmann et al.[101], 1970
2961, 2940	ν C-H	CH_3 e CH_2	Ricci et al.[90], 2011
3350	νO-H	Si-OH	Choudhurry et al.[15], 2010

5.1.1.6 Rugosidade

Figura 24 – Rugosidade dos filmes em função da proporção de argônio (P_{Ar}) na mistura de gases.

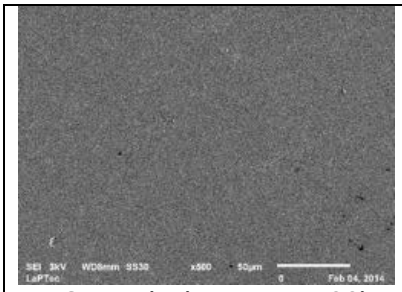
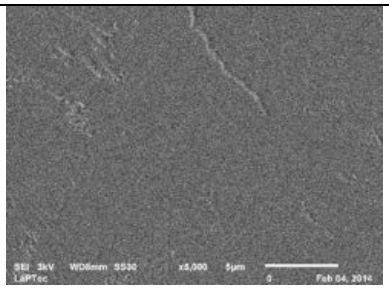
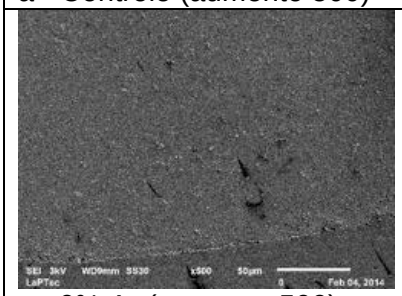
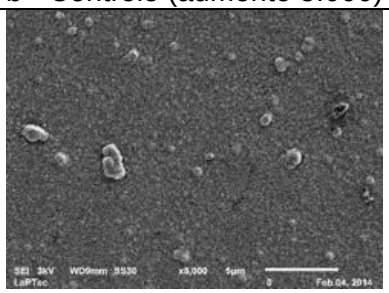
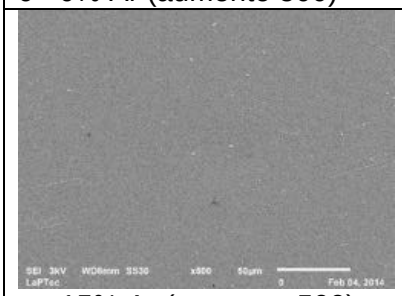
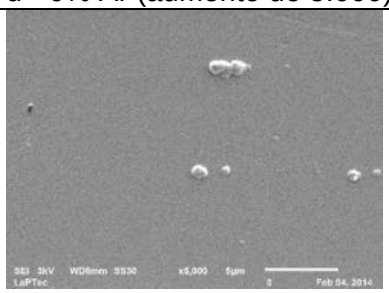
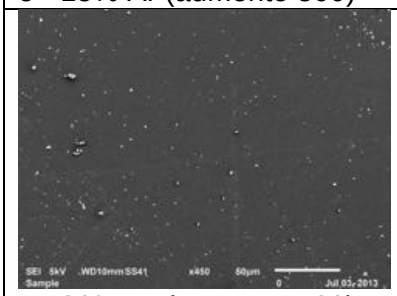
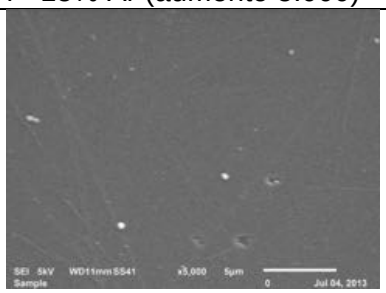
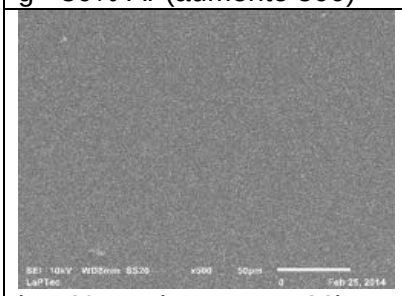
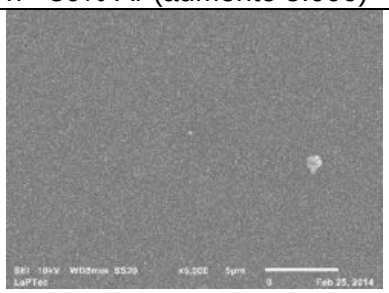
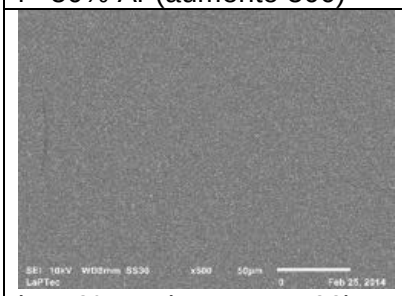
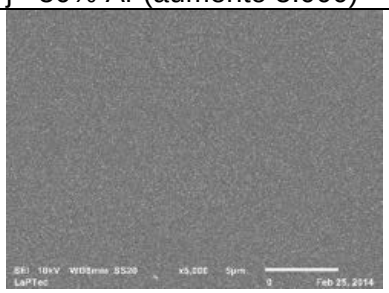


De acordo com os dados da Figura 24, nota-se que o tratamento a plasma diminuiu, em qualquer uma das condições empregadas, a rugosidade da superfície da resina acrílica (0,27 ± 0,01 µm). Para o filme depositado sem a incorporação de Ar no plasma, a rugosidade foi substancialmente maior (aproximadamente quatro vezes) que a obtida quando Ar estava presente na atmosfera de tratamento.

5.1.1.7 Análises de MEV

Na Figura 25, pode-se observar uma camada dos filmes depositados em toda a superfície nos corpos de prova de resina acrílica tratados a plasma, com a presença de pequenos grânulos, principalmente na estrutura do filme 0% Ar (Fig 25c e 25d). Pode-se observar, ainda, que conforme a proporção de Ar aumenta, há menor formação de grânulos (Figuras 25c a 25l). De forma geral, os filmes promoveram recobrimento de toda a superfície dos corpos de prova de resina acrílica.

Figura 25 – Micrografias das superfícies de resina acrílica sem filme (controle) e com deposição dos filmes de HMDSO e Ar, avaliados no estudo.

 a - Controle (aumento 500)	 b - Controle (aumento 5.000)
 c - 0% Ar (aumento 500)	 d - 0% Ar (aumento de 5.000)
 e - 15% Ar (aumento 500)	 f - 15% Ar (aumento 5.000)
 g - 30% Ar (aumento 500)	 h - 30% Ar (aumento 5.000)
 i - 50% Ar (aumento 500)	 j - 50% Ar (aumento 5.000)
 k - 70% Ar (aumento 500)	 l- 70% Ar (aumento 5.000)

5.1.1.8 Formação de Biofilme de *C. albicans*

5.1.1.8.1 Sem pré-condicionamento em saliva

Tabela 3 – Valores em UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *C. albicans* em filmes depositados em superfície de resina acrílica.

		Filmes									
Corpo de prova	**controle**	**0% Ar**		**15% Ar**		**30% Ar**		**50% Ar**		**70% Ar**	
	UFC/mL	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**
1	4,7 x10^6	1,6 x10^6	36	1,7 x10^6	38	1,1 x10^6	24	3,5 x10^6	81	3,9 x10^6	90
2	4,1 x10^6	1,4 x10^6	32	1,9 x10^6	43	1,1 x10^6	26	4,0 x10^6	92	3,7 x10^6	86
3	4,2 x10^6	1,3 x10^6	29	1,4 x10^6	31	1,4 x10^6	31	4,3 x10^6	99	4,3 x10^6	100
4	4,4 x10^6	1,4 x10^6	33	1,8 x10^6	41	1,5 x10^6	34	4,0 x10^6	94	4,2 x10^6	98
5	4,3 x10^6	1,9 x10^6	45	1,2 x10^6	28	1,1 x10^6	26	4,3 x10^6	100	4,1 x10^6	95
6	4,1 x10^6	1,1 x10^6	26	2,0 x10^6	46	1,5 x10^6	35	4,5 x10^6	106	4,3 x10^6	100
7	4,0 x10^6	1,5 x10^6	37	1,8 x10^6	43	1,4 x10^6	34	4,0 x10^6	99	4,5 x10^6	112
8	4,3 x10^6	1,5 x10^6	37	1,7 x10^6	42	1,2 x10^6	30	4,1 x10^6	102	3,9 x10^6	97
9	3,9 x10^6	2,0 x10^6	50	1,9 x10^6	47	1,7 x10^6	42	4,4 x10^6	109	4,2 x10^6	104
Média	4,2 x10^6	1,5 x10^6	36	1,7 x10^6	40	1,3 x10^6	31	4,1 x10^6	98	4,1 x10^6	98
DP	0,2 x10^6	0,3 x10^6	7	0,3 x10^6	6	0,2 x10^6	6	0,3 x10^6	8	0,2 x10^6	8

A Tabela 3 ilustra os resultados de UFC/mL e em porcentagem [20, 22, 72, 132]. Os valores de UFC/mL dos corpos de prova controle (sem deposição de filmes) foram considerados como 100%. Os resultados mostram que para os filmes 0% Ar, 15% Ar e 30% Ar, a formação de biofilme de *C. albicans* foi menor que o controle (100%), com médias de 36%, 40% e de 31%, respectivamente. Já para os filmes 50% Ar e 70% Ar, não foi detectada redução na formação do biofilme.

5.1.1.8.2 Com Pré-Condicionamento em Saliva

Na tabela 4, pode-se observar que, para os filmes 0% Ar, 15% Ar e 30% Ar os valores foram similares (em média, 96%, 86% e 91%, respectivamente) e próximos ao do controle (considerado como 100%). Os valores obtidos com os filmes 50% Ar e 70% Ar (em média, 79% e 77, respectivamente) foram menores que os dos demais.

Tabela 4 – Valores em UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *C. albicans* em filmes depositados em superfície de resina acrílica, após o armazenamento em saliva.

	Filme										
Corpo	**Controle**	**0% Ar**		**15% Ar**		**30% Ar**		**50% Ar**		**70% Ar**	
prova	**UFC/mL**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**
1	1,1 x10^{7}	1,5 x10^{7}	109	1,3 x10^{7}	94	1,4 x10^{7}	101	1,1 x10^{7}	79	1,0 x10^{7}	75
2	1,5 x10^{7}	1,4 x10^{7}	105	1,1 x10^{7}	83	1,5 x10^{7}	109	1,2 x10^{7}	86	1,1 x10^{7}	79
3	1,5 x10^{7}	1,5 x10^{7}	109	1,3 x10^{7}	94	1,3 x10^{7}	96	1,2 x10^{7}	86	1,1 x10^{7}	79
4	1,6 x10^{7}	1,3 x10^{7}	93	1,2 x10^{7}	82	1,4 x10^{7}	96	1,1 x10^{7}	75	1,2 x10^{7}	82
5	1,4 x10^{7}	1,3 x10^{7}	89	1,2 x10^{7}	82	1,2 x10^{7}	86	1,0 x10^{7}	71	1,1 x10^{7}	75
6	1,3 x10^{7}	1,4 x10^{7}	96	1,1 x10^{7}	75	1,1 x10^{7}	79	1,3 x10^{7}	89	1,0 x10^{7}	71
7	1,3 x10^{7}	1,3 x10^{7}	87	1,3 x10^{7}	87	1,2 x10^{7}	80	1,1 x10^{7}	77	1,1 x10^{7}	77
8	1,4 x10^{7}	1,2 x10^{7}	84	1,3 x10^{7}	87	1,3 x10^{7}	87	1,0 x10^{7}	70	1,1 x10^{7}	73
9	1,7 x10^{7}	1,3 x10^{7}	91	1,3 x10^{7}	87	1,2 x10^{7}	80	1,1 x10^{7}	73	1,2 x10^{7}	80
Média	1,4 x10^{7}	1,3 x10^{7}	96	1,2 x10^{7}	86	1,3 x10^{7}	91	1,1 x10^{7}	79	1,1 x10^{7}	77
DP	0,2 x10^{7}	0,1 x10^{7}	9	0,1 x10^{7}	6	0,1x10^{7}	11	0,8 x10^{7}	7	0,6 x10^{7}	4

5.1.2 Filmes hidrofílicos (pós-tratamento com O_2)

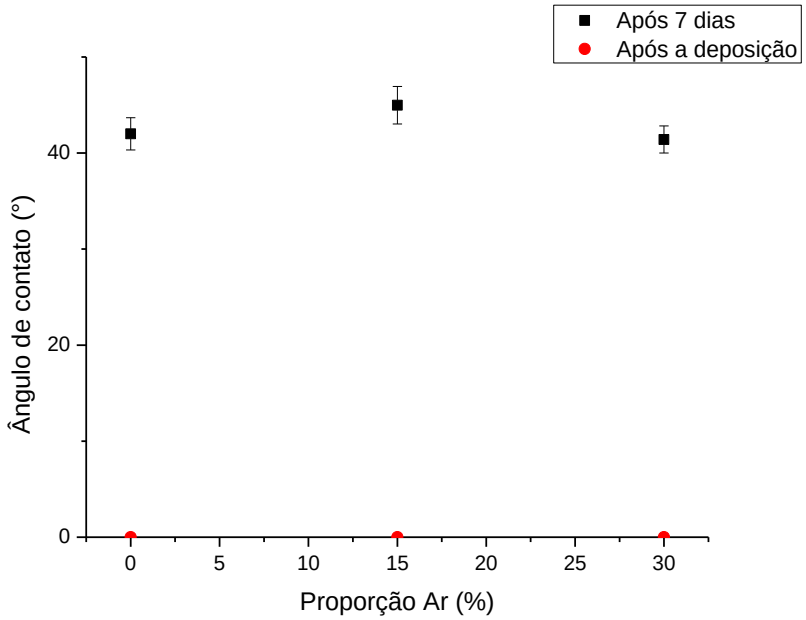
5.1.2.1 Espessura

Os resultados da medida de espessura demonstraram que, após o tratamento com o plasma de oxigênio, não houve alteração do filme anteriormente depositado e, dessa forma, a espessura inicial foi mantida.

5.1.2.2 Ângulo de Contato

Da mesma forma que para os filmes sem pós-tratamento depositados sobre os corpos de prova de resina acrílica, para os filmes hidrofílicos também foram realizadas mensurações dos ângulos de contato após a deposição (0 dias) e após 7 dias, anteriormente aos testes microbiológicos. Os resultados estão apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Ângulo de contato dos filmes hidrofílicos em função da proporção de Argônio na mistura de gases após deposição e após 7 dias.



5.1.2.3 Composição dos filmes (análise de XPS)

Figura 27 – Porcentagem atômica (%) para os filmes estudados (0% Ar, 15% Ar e 30% Ar) após tratamento com plasma de O_2.

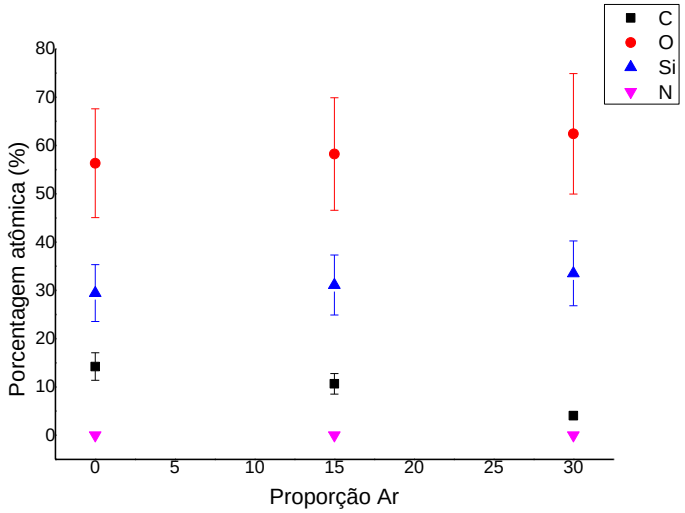


Tabela 5- Estrutura molecular dos filmes estudados, submetidos ou não aos pós-tratamento com O_2.

Filme	**Estrutura molecular**
0% Ar	$Si_1O_{1,61}C_{2,03}$
15%Ar	$Si_1O_{1,13}C_{1,47}$
30%Ar	$Si_1O_{1,86}C_{0,12}$
0% Ar/O_2	$Si_1O_{1,91}C_{0,48}$
15%Ar/O_2	$Si_1O_{1,87}C_{0,34}$
30%Ar/O_2	$Si_1O_{1,86}C_{0,12}$

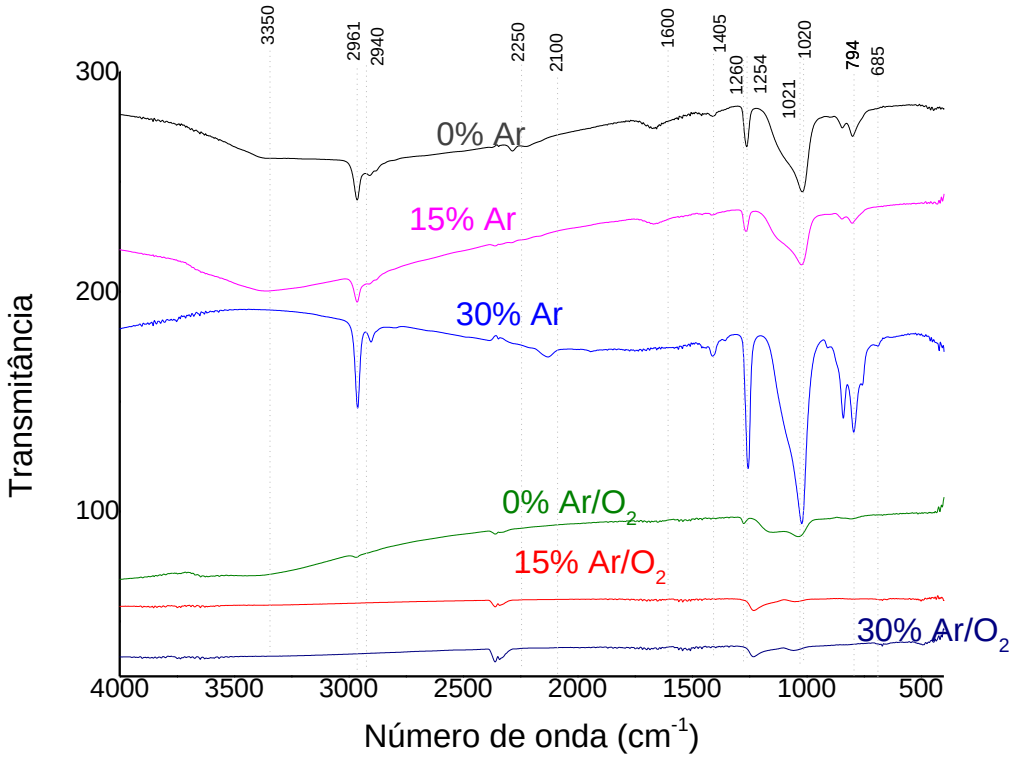
A Figura 27 mostra as proporções atômicas das espécies que compõem o filme como uma função de P_{Ar}. Como tais resultados foram obtidos por XPS, hidrogênio não é contabilizado nos cálculos. Da mesma forma, o nitrogênio pode aparecer como um contaminante, porém para todos os filmes com pós-tratamento de O_2 a proporção foi zero. Nota-se que a proporção de C, [C], é de cerca de 15% nos filmes depositados com P_{Ar} de 0% e de 15%, sofrendo queda quando a proporção de Ar é 30%. Quando se avalia o comportamento da curva relacionada à proporção de oxigênio, [O], nota-se um comportamento quase oposto ao da curva de [C]. Além disso, a proporção de Si, [Si], é por volta de 30% para os três filmes avaliados.

A partir desses resultados determinou-se a fórmula química de cada uma das diferentes estruturas. Os resultados são apresentados na Tabela 5 mostrando o aumento do oxigênio e a redução do carbono.

5.1.2.4 Espectros de infravermelho - FTIR

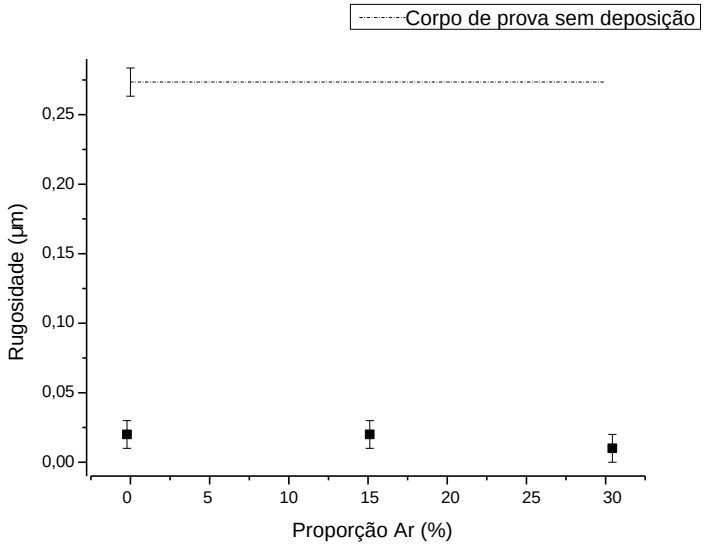
A Figura 28 apresenta os espectros obtidos nas análises em FTIR. Nota-se que as alterações produzidas pelo tratamento em plasmas de oxigênio não foram percebidas nos espectros de infravermelho dos filmes, uma vez que esses não apresentam alterações substanciais.

Figura 28 – Espectros de infravermelho de filmes depositados sobre resina a partir de HMDSO contendo diferentes proporções de argônio no plasma e com pós tratamento de oxigênio.



5.1.2.5 Rugosidade

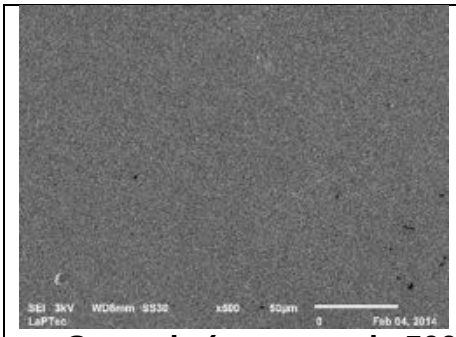
Figura 29 – Médias e desvios padrão (DP) dos valores de rugosidade (µm) dos filmes hidrofílicos em superfície de resina acrílica.



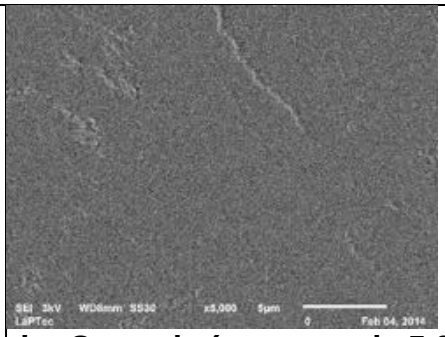
Observando a Figura 29 pode-se verificar que as médias de rugosidade das superfícies dos corpos de prova de resina acrílica, após a deposição dos filmes hidrofílicos, foram baixas (0% Ar/O_2 – 0,02 µm ± 0,01; 15% Ar/O_2 – 0,02 µm ± 0,01 e 30% Ar/O_2 – 0,01 µm ± 0,01) e menores que a dos corpos de prova sem tratamento.

5.1.2.6 Análises de MEV

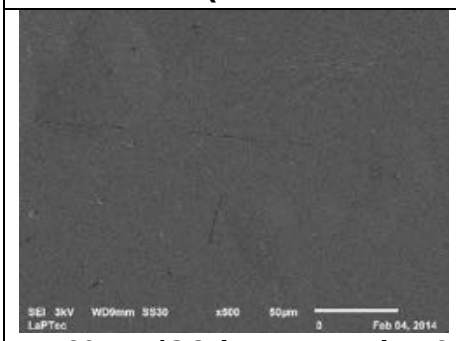
Figura 30 – Micrografias das superfícies de resina acrílica com deposição dos filmes de HMDSO/Ar e pós-tratamento com O_2 avaliados no estudo.



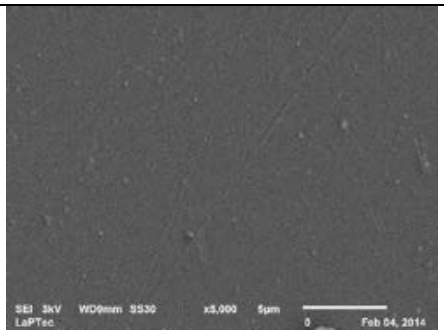
a - Controle (aumento de 500)



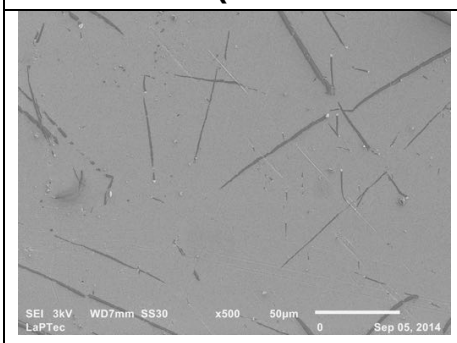
b - Controle (aumento de 5.000)



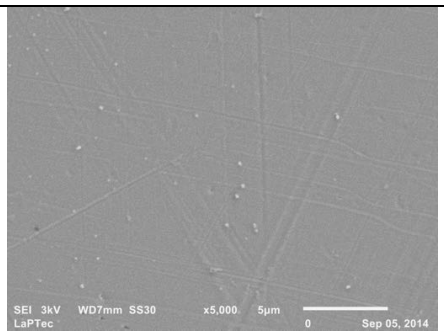
c - 0% Ar/O2 (aumento de 500)



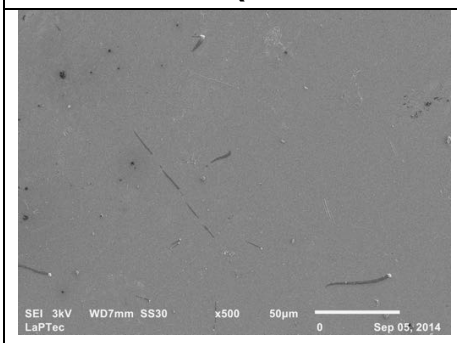
d - 0% Ar/O2 (aumento de 5.000)



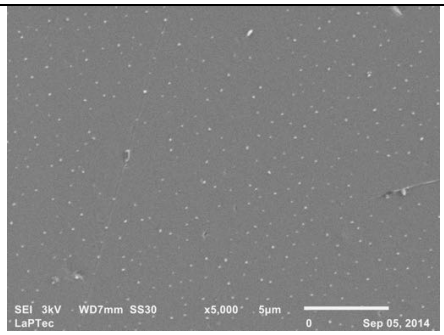
e - 15% Ar/O2 (aumento de 500)



f - 15% Ar/O2 (aumento de 5.000)



g - 30% Ar/O2 (aumento de 500)



h - 30% Ar/O2 (aumento de 5.000)

Na Figura 30, pode-se observar a presença de pequenos grânulos (característicos do filme de HMDSO) para o filme 0% Ar/O_2 (Fig 30c e 30d). A

quantidade de grânulos para todos os filmes foi menor, quando comparada àquela dos filmes depositados nas mesmas condições e não submetidos ao pós-tratamento (Figura 25).

5.1.2.7 Formação de Biofilme de *C. albicans*

5.1.2.7.1 Sem pré-condicionamento em saliva

Da mesma forma que para os filmes hidrofóbicos, os resultados estão apresentados em UFC/mL e em % de crescimento na Tabela 6. Para esses últimos resultados, os valores de UFC/mL dos corpos de prova controle (sem tratamento) foram considerados como 100% de crescimento.

Tabela 6 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *C. albicans* em filmes depositados em superfície de resina acrílica e submetidos ao pós-tratamento com O_2.

		Filme					
Corpo de	**Controle**	**0% Ar/O_2**		**15% Ar/O_2**		**30% Ar/O_2**	
prova	**UFC/mL**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**
1	4,7 x10^6	5,0 x10^6	116	6,4 x10^6	148	5,7 x10^6	131
2	4,1 x10^6	5,7 x10^6	132	5,7 x10^6	131	5,6 x10^6	130
3	4,2 x10^6	5,8 x10^6	133	6,0 x10^6	138	6,3 x10^6	146
4	4,4 x10^6	5,2 x10^6	122	5,7 x10^6	134	5,7 x10^6	134
5	4,3 x10^6	5,9 x10^6	139	5,0 x10^6	117	5,5 x10^6	129
6	4,1 x10^6	6,1 x10^6	144	6,1 x10^6	144	6,5 x10^6	153
7	4,0 x10^6	5,6 x10^6	139	6,0 x10^6	149	5,8 x10^6	144
8	4,3 x10^6	5,1 x10^6	127	5,0 x10^6	123	5,8 x10^6	144
9	3,9 x10^6	6,1 x10^6	150	6,1 x10^6	151	6,4 x10^6	157
Média	4,2 x10^6	5,6 x10^6	134	5,8 x10^6	137	5,9 x10^6	141
DP	0,2 x10^6	0,4 x10^6	11	0,5 x10^6	12	0,4 x10^6	10

É possível observar que não houve redução na formação de biofilme de *C. albicans* para todos os filmes hidrofílicos avaliados (HMDSO+O_2, Ar 15%+O_2 e Ar 30%+ O_2).

5.1.2.7.2 Com Pré-condicionamento em Saliva

Os resultados obtidos de formação de biofilme para os filmes de HMDSO submetidos ao pós-tratamento com O_2 e pré-condicionados em saliva estão apresentados na Tabela 7, tanto em UFC/mL como em % de crescimento. Os valores de UFC/mL dos corpos de prova controle (sem tratamento) foram considerados como 100% de crescimento.

Tabela 7 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *C. albicans* em filmes depositados em superfície de resina acrílica e submetidos ao pós-tratamento com O_2, após o armazenamento em saliva.

Corpo de prova	Controle	Filme					
		0% Ar/O_2		15% Ar/O_2		30% Ar/O_2	
	UFC/mL	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.
1	1,1 x10^7	1,1 x10^7	83	1,2 x10^7	90	1,2 x10^7	90
2	1,5 x10^7	1,2 x10^7	86	1,3 x10^7	94	1,3 x10^7	94
3	1,5 x10^7	1,3 x10^7	94	1,1 x10^7	83	1,3 x10^7	96
4	1,6 x10^7	1,1 x10^7	75	1,3 x10^7	89	1,1 x10^7	75
5	1,4 x10^7	1,0 x10^7	68	1,1 x10^7	75	1,0 x10^7	71
6	1,3 x10^7	1,3 x10^7	93	1,2 x10^7	82	1,1 x10^7	79
7	1,3 x10^7	1,3 x10^7	91	1,3 x10^7	91	1,1 x10^7	77
8	1,4 x10^7	1,1 x10^7	73	1,2 x10^7	84	1,1 x10^7	77
9	1,7 x10^7	1,3 x10^7	87	1,4 x10^7	94	1,1 x10^7	73
Média	1,4 x10^7	1,2 x10^7	83	1,2 x10^7	87	1,1 x10^7	81
DP	0,2 x10^7	0,1 x10^7	9	1,0 x10^7	6	0,1 x10^7	10

A Tabela 7 mostra que houve pouca redução no crescimento de *C. albicans* para todos os filmes hidrofílicos estudados (HMDSO/O_2 - 83%, Ar 15%/O_2 - 87% e Ar 30%/O_2 - 81%, em média).

5.1.2.8 Hidrofobicidade celular

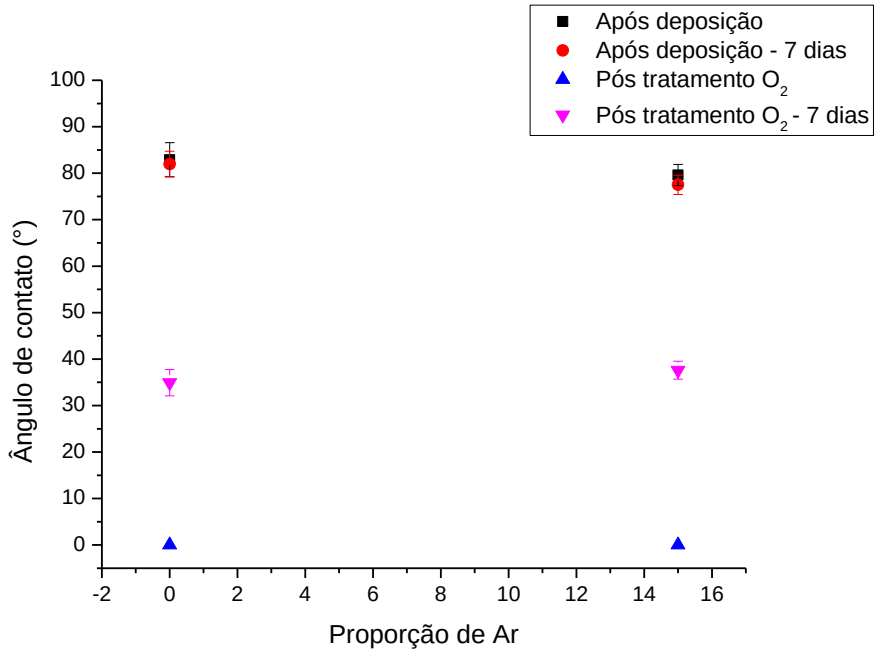
O valor médio do ângulo de contato da *C. albicans* foi 42,17° (± 2,70), indicando superfície celular hidrofílica.

5.2 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Titânio

5.2.1 Ângulo de Contato

Da mesma forma que para os filmes depositados na superfície de resina acrílica também foram realizadas mensurações dos ângulos de contato logo após a deposição e 7 dias após, anteriormente aos testes microbiológicos. Os valores dos ângulos de contato obtidos, tanto para os filmes hidrofóbicos como para os hidrofílicos, estão apresentados na Figura 30.

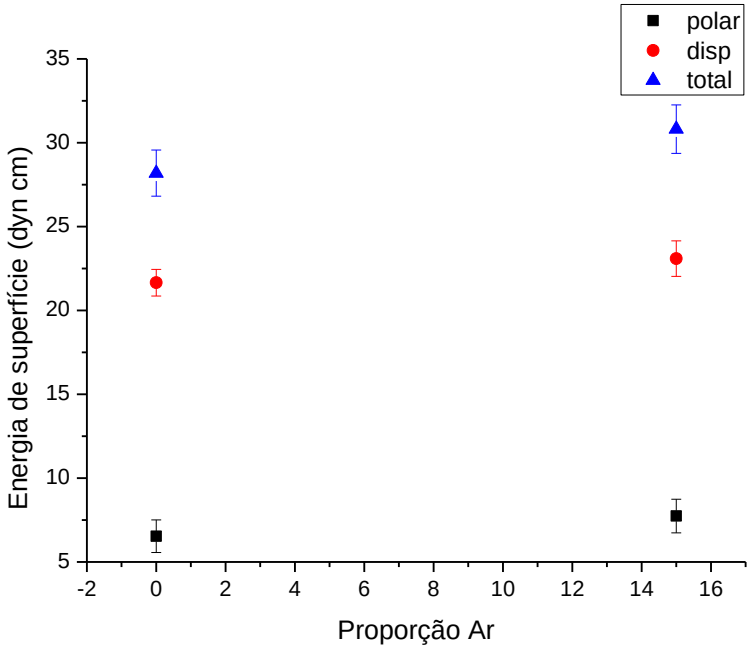
Figura 30 – Médias e desvios padrão (DP) dos valores de ângulos de contato dos filmes depositados na superfície do titânio.



Os resultados da Figura 30 evidenciam que os ângulos de contato, mensurados após a deposição dos filmes de HMDSO puro (0% Ar) e o de Ar 15% apresentaram, em média, valores de 82,90˚± 3,66 e 79,60˚± 2,28, respectivamente, tendo sido maiores que aqueles observados após o tratamento com plasma de O_2, que foram iguais a zero. Após 7 dias, não houve alteração nos ângulos de contato dos filmes 0% Ar (81,96 ˚ ± 2,76) e 15% Ar (77,51˚ ± 2,08), enquanto aqueles submetidos ao pós-tratamento apresentaram aumento nos valores (médias de 34,92˚± 2,83 para o filme 0% Ar/O_2 e de 37,61˚± 1,94 para o filme 15% Ar/O_2). Para todos os filmes avaliados, não houve diferenças entre os ângulos de contato em função da variação na proporção de Ar.

5.2.2 Energia livre de superfície

Figura 31 – Componentes polar, E_P, e dispersiva, E_D, bem como a total, E_T, da energia de superfície dos filmes depositados em função da proporção de argônio no plasma.



Os resultados de energia livre de superfície para os filmes 0% Ar e 15% Ar depositados sobre o titânio são apresentados na Figura 31 em função de P_{Ar}. Considerando-se os valores de energia total (E_T), componente polar (E_P) e dispersiva (E_D), não há aumento quando a proporção de Ar é aumentada.

5.2.3- Composição dos filmes (análise de XPS)

A Figura 32 mostra as proporções atômicas das espécies que compõem o filme como uma função de P_{Ar}. Considerando-se que os resultados foram obtidos por XPS, o hidrogênio não é contabilizado nos cálculos. Pode-se observar que a proporção de C, [C], é de cerca de 40% nos filmes depositados com P_{Ar} de 0 e 15%. Quando se avalia o comportamento da curva relacionada à proporção de oxigênio,

[O], nota-se que não houve diferença para as diferentes P_{Ar} avaliadas. Além disso, a proporção de Si, [Si], é praticamente igual à do [O] e também não teve variação entre a P_{Ar} de 0 e 15%.

Figura 32 – Gráfico da porcentagem atômica (%) para os filmes estudados (0 e 15% Ar).

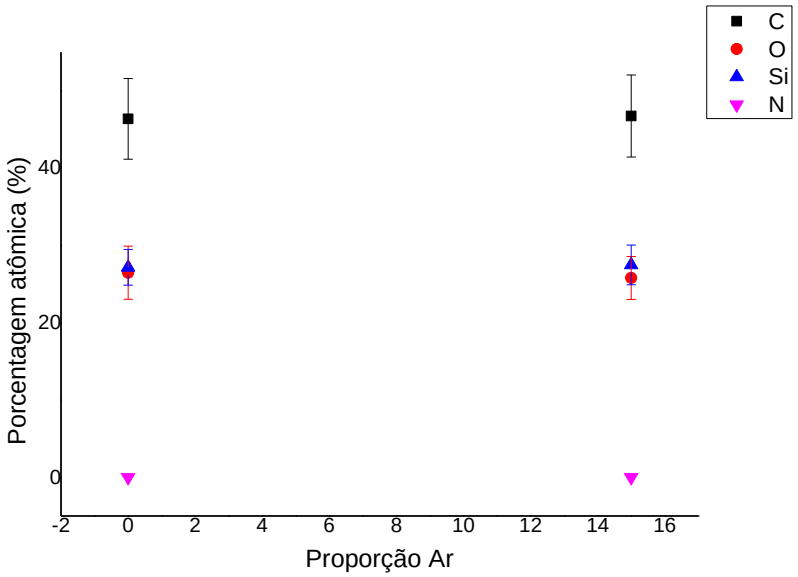
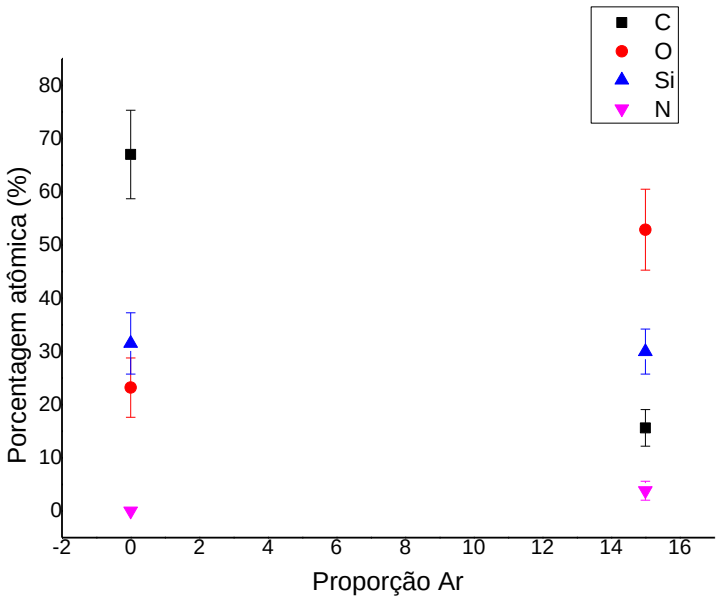


Figura 33 – Gráfico da porcentagem atômica (%) para os filmes estudados (0 e 15% Ar) após tratamento com plasma de O_2.



A Figura 33 mostra as proporções atômicas das espécies que compõem os filmes com pós-tratamento de O_2 como uma função de P_{Ar}. Como tais resultados foram obtidos por XPS, hidrogênio não é contabilizado nos cálculos. Da mesma forma o nitrogênio, que pode ser um contaminante, teve valor igual a zero para o filme 0% Ar/O_2 e próximo de zero para o filme 15% Ar/O_2, mostrando que, mesmo para esse filme, houve pouca contaminação do plasma com ar atmosférico. Verifica-se que a proporção de C, [C], diminui em função da P_{Ar}. O inverso ocorre com a proporção de [O], que é aumentada quando aumenta a P_{Ar}, indicando que o [C] está sendo substituído por oxigênio na estrutura. Além disso, a proporção de Si, [Si], é por volta de 30% para os dois filmes avaliados.

Da mesma forma que para a análise dos filmes depositados em resina acrílica, determinou-se a fórmula química de cada uma das diferentes estruturas, sem considerar o hidrogênio. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Estrutura molecular dos filmes estudados.

Filme	**Estrutura molecular**
0% Ar	$Si_1O_{0,97}C_{1,70}$
15%Ar	$Si_1O_{0,94}C_{1,70}$
0%Ar/O_2	$Si_1O_{1,68}C_{0,50}$
15%Ar/O2	$Si_1O_{3,89}C_{0,24}$

5.2.4 Espectros de infravermelho - FTIR

Da mesma forma que para os filmes depositados em resina acrílica, para os filmes depositados na superfície de titânio, também foram observadas as absorções relacionadas ao movimento de estiramento (2961 e 2940 cm^{-1}) e de deformação (1405 cm^{-1}) de grupos C-H alifáticos, de deformação de CH_x em grupos metilsilil (1254, 1000, 794 cm^{-1}), de estiramento (2250 cm^{-1}) e deformação (685 cm^{-1}) de ligações Si-H (Figura 34). Observando a curva 15% Ar, nota-se que ao introduzir argônio no plasma, houve alteração na cinética de deposição, modificando o filme e, consequentemente, as características do espectro. Verifica-se maior incorporação de grupos hidroxilas (~ 1670 e 3350 cm^{-1}).

As alterações produzidas pelo tratamento em plasmas de oxigênio não foram percebidas nos espectros de infravermelho dos filmes, uma vez que esses não apresentam alterações substanciais.

Figura 34 – Espectros de infravermelho de filmes depositados sobre titânio a partir de HMDSO contendo diferentes proporções de argônio no plasma e com pós tratamento de oxigênio.

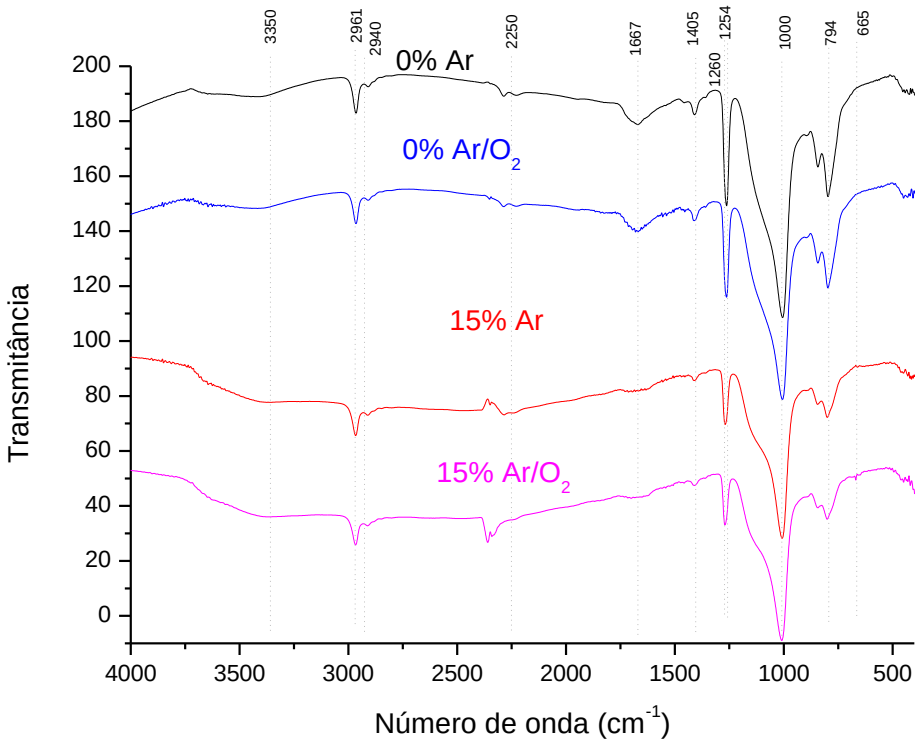
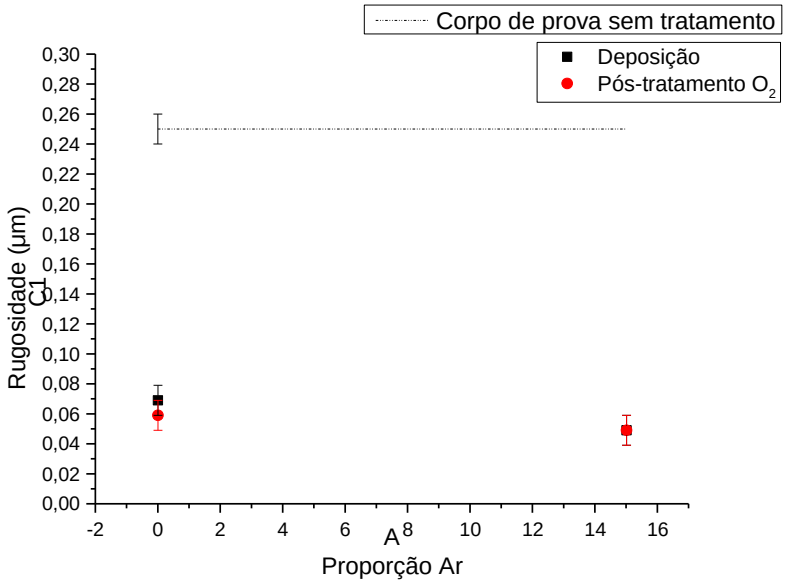


Tabela 9 - Números de ondas, atribuições e grupos de filmes depositados sobre titânio polido a partir de plasmas de HMDSO.

Número de ondas (cm^{-1})	Atribuições	Grupos	
665	Si-H_n		Guruvenket et al.[34], 2010
794	ν Si-C	$Si(CH_3)_2$	Guruvenket et al.[34], 2010
1000	ν Si-O	Si-O-Si	Gengenbach et al.[30], 1999
			Choudhury et al.[15], 2010
1254, 1260	∂ C-H_3	$Si(CH_3)_x$	Rao et al.[86], 2010
			Vautrin-Ul et al.[114], 2000
1405	∂ C-H	$Si(CH_3)_x$	Rao et al.[86], 2010
1670	O-H	Free Water	Vautrin-Ul et al.[114], 2000
2250	νSi-H		Gengenbach et al.[30], 1999
			Scheinmann et al.[101], 1970
2961, 2940	ν C-H	CH_3 e CH_2	Ricci et al.[90], 2011
3350	νO-H	Si-OH	Choudhurry et al.[15], 2010

5.2.5 Rugosidade

Figura 35 – Médias e desvios-padrão da rugosidade (µm) dos filmes depositados na superfície do titânio.

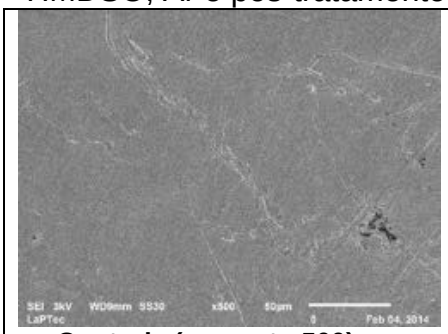


Pela Figura 35, observa-se que, da mesma forma que para a resina acrílica, as médias de rugosidade das superfícies dos corpos de prova de titânio, após a deposição dos filmes, foram menores que as do controle (sem filmes). Os valores dos filmes 0% Ar (0,07 µm ± 0,01), 15% Ar (0,05 µm ± 0,01), 0%Ar/O_2 (0,06 µm ± 0,01) e 15% Ar/O_2 (0,05 µm ± 0,01) foram similares.

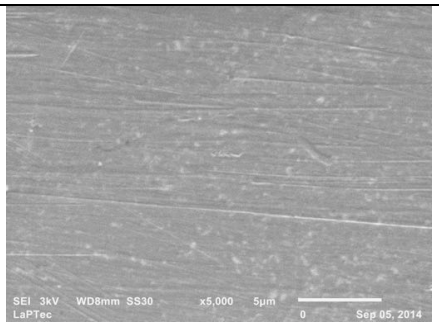
5.2.6 MEV

A Figura 36 mostra que todos os filmes resultaram em superfícies mais regulares, em relação às superfícies controles (36a e 36b). De forma geral, observam-se poucas estruturas granulares nos filmes depositados na superfície do titânio.

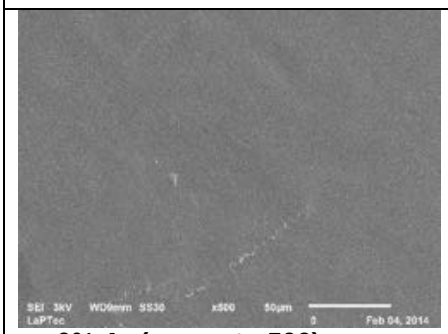
Figura 36 – Micrografias das superfícies de titânio com deposição dos filmes de HMDSO, Ar e pós-tratamento com O_2 avaliados no estudo.



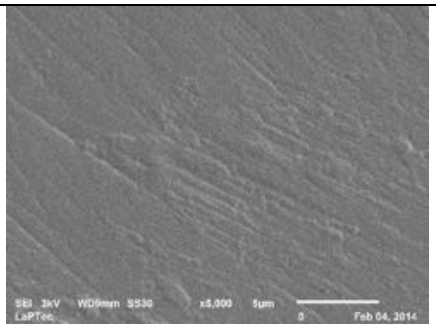
a - Controle (aumento 500)



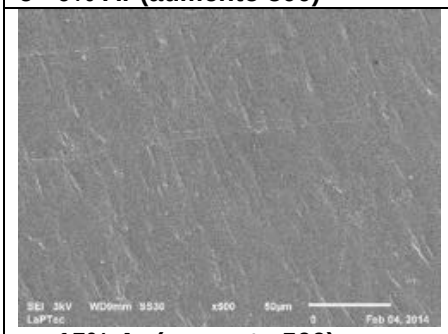
b - Controle (aumento 5.000)



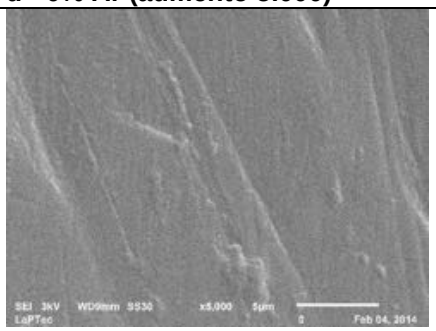
c - 0% Ar (aumento 500)



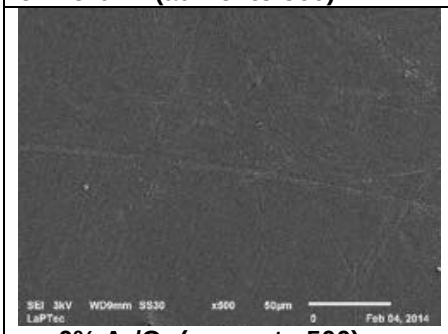
d - 0% Ar (aumento 5.000)



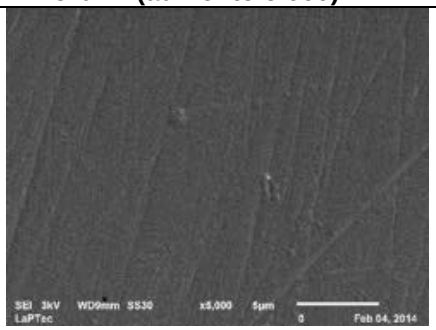
e - 15% Ar (aumento 500)



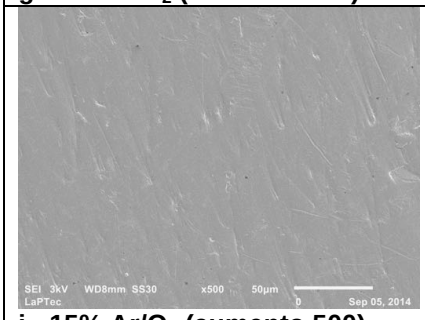
f - 15% Ar (aumento 5.000)



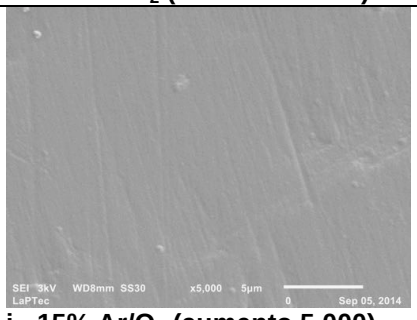
g - 0% Ar/O_2 (aumento 500)



h - 0% Ar/O_2 (aumento 5.000)



i - 15% Ar/O_2 (aumento 500)



j - 15% Ar/O_2 (aumento 5.000)

5.2.7 Formação de biofilme de *P. gingivalis*

5.2.7.1 Sem Pré-condicionamento em saliva

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos nos testes microbiológicos. Da mesma forma que para os corpos de prova de resina acrílica, os resultados estão apresentados em UFC/mL e % de crescimento. Para esses resultados, os valores de UFC/mL dos corpos de prova controle (sem tratamento) foram considerados como 100% de crescimento.

Tabela 10 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *P. gingivalis* em filmes depositados nos corpos de prova de titânio.

Corpo de prova	**Filme**								
	Controle	**0% Ar**		**15% Ar**		**0% Ar/O_2**		**15% Ar/O_2**	
	UFC/mL	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**
1	$1,6 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	54	$0,9 \times 10^6$	61	$1,4 \times 10^6$	100	$1,2 \times 10^6$	100
2	$1,4 \times 10^6$	$0,7 \times 10^6$	50	$0,8 \times 10^6$	54	$1,4 \times 10^6$	96	$1,3 \times 10^6$	89
3	$1,3 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	57	$0,8 \times 10^6$	57	$1,3 \times 10^6$	93	$1,3 \times 10^6$	86
4	$1,6 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	62	$0,8 \times 10^6$	54	$1,3 \times 10^6$	94	$1,0 \times 10^6$	72
5	$1,1 \times 10^6$	$0,8 \times 10^6$	54	$0,9 \times 10^6$	65	$1,2 \times 10^6$	83	$1,0 \times 10^6$	72
6	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	69	$0,1 \times 10^6$	80	$1,3 \times 10^6$	94	$1,3 \times 10^6$	90
7	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	74	$0,7 \times 10^6$	55	$1,1 \times 10^6$	86	$1,1 \times 10^6$	82
8	$1,1 \times 10^6$	$0,1 \times 10^6$	78	$0,8 \times 10^6$	58	$1,0 \times 10^6$	74	$1,0 \times 10^6$	74
9	$1,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	74	$1,0 \times 10^6$	74	$1,2 \times 10^6$	90	$0,9 \times 10^6$	70
Média	$1,4 \times 10^6$	$0,9 \times 10^6$	64	$0,8 \times 10^6$	62	$1,2 \times 10^6$	90	$1,1 \times 10^6$	82
DP	$0,2 \times 10^6$	$0,1 \times 10^6$	10	$0,1 \times 10^6$	9	$0,1 \times 10^6$	8	$0,2 \times 10^6$	10

Analisando os resultados apresentados na Tabela 10, pode-se observar redução na formação de biofilme de *P. gingivalis* nos corpos de prova tratados com os filmes mais hidrofóbicos (0 e 15% Ar), os quais apresentaram valores, em média, de 64% ± 10 e 62% ± 9, respectivamente. Para os filmes hidrofílicos, houve menor redução na formação de biofilme, tendo sido, em média, de 90 ± 8 para o filme 0% Ar/O_2 e de 82 ± 10 para o filme 15% Ar/O_2.

5.2.7.2 Com pré-condicionamento em saliva

Tabela 11 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *P. gingivalis* em filmes depositados nos corpos de prova de titânio, após armazenamento em saliva.

		Filme							
	Controle	**0% Ar**		**15% Ar**		**0% Ar/O_2**		**15% Ar/O_2**	
Corpo de prova	UFC/mL	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.
1	$1,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$	73	$6,0 \times 10^6$	58	$6,0 \times 10^6$	58	$6,0 \times 10^6$	58
2	$1,1 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	63	$5,5 \times 10^6$	53	$6,5 \times 10^6$	63	$6,5 \times 10^6$	63
3	$1,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	77	$6,5 \times 10^6$	63	$7,0 \times 10^6$	68	$5,5 \times 10^6$	53
4	$1,2 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	58	$5,5 \times 10^6$	49	$7,0 \times 10^6$	63	$7,5 \times 10^6$	67
5	$1,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	49	$5,5 \times 10^6$	49	$6,0 \times 10^6$	54	$7,0 \times 10^6$	63
6	$1,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	543	$6,5 \times 10^6$	58	$6,5 \times 10^6$	58	$7,0 \times 10^6$	63
7	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	56	$7,0 \times 10^6$	66	$6,5 \times 10^6$	61	$5,5 \times 10^6$	52
8	$1,2 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	66	$5,5 \times 10^6$	52	$7,0 \times 10^6$	66	$5,5 \times 10^6$	52
9	$1,1 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	61	$6,5 \times 10^6$	61	$5,5 \times 10^6$	52	$5,5 \times 10^6$	52
Média	$1,1 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$	62	$6,1 \times 10^6$	57	$6,4 \times 10^6$	60	$6,2 \times 10^6$	58
DP	$0,1 \times 10^7$	$0,8 \times 10^6$	9	$0,6 \times 10^6$	6	$0,5 \times 10^6$	5	$0,8 \times 10^6$	6

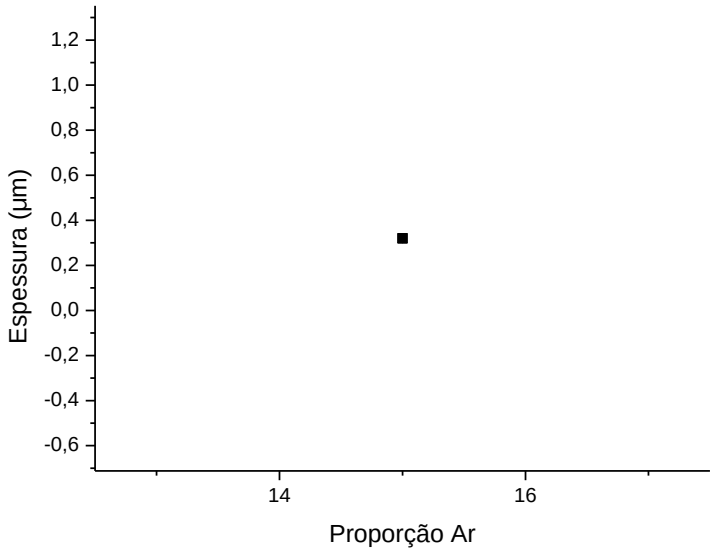
Os resultados obtidos para os corpos de prova de titânio que foram pré-condicionados em saliva estão apresentados na Tabela 11, tanto em UFC/mL como em % de crescimento, considerando-se os valores de UFC/mL dos corpos de prova controle (sem tratamento) como 100%. Houve redução na formação de biofilme, tendo sido os valores, em média, similares entre os filmes hidrofóbicos e hidrofílicos (0% Ar – 62% ± 8; 15% Ar – 57% ± 6; 0% Ar/O_2 – 60 % ± 5; 15% Ar/O_2 – 58% ± 6).

5.3 Filmes de HMDSO Formados na Superfície de Zircônia

5.3.1 Espessura

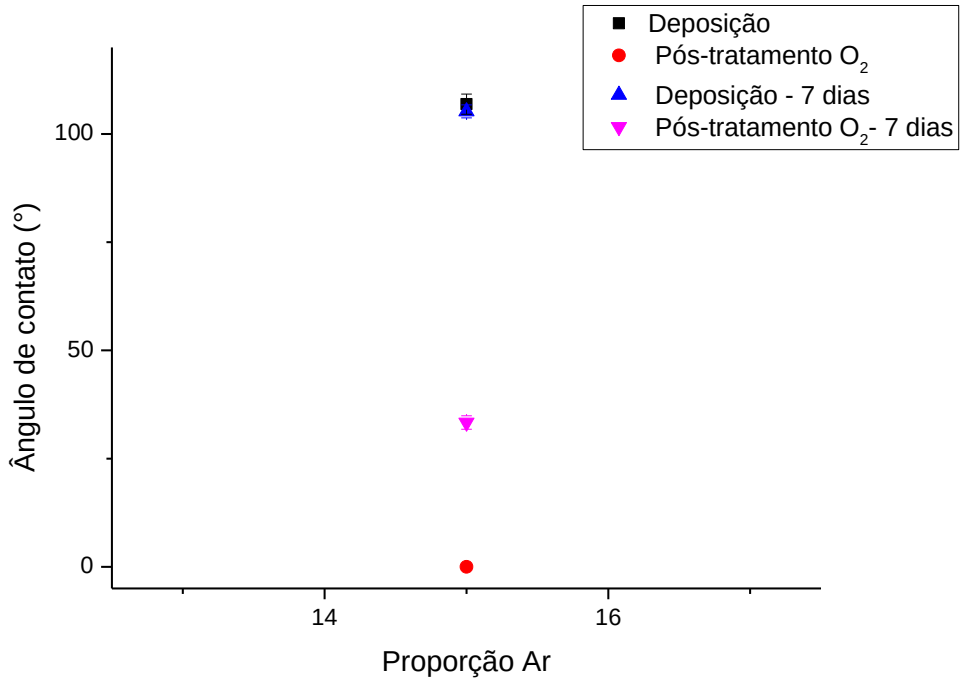
O filme 15% Ar depositado na superfície da zircônia teve espessura de 0,32 μm (±0,02), como ilustra a Figura 37. Quando o filme recebeu o pós-tratamento de O_2 (15% Ar/O_2), não houve formação de degrau, evidenciando que espessura inicial foi mantida.

Figura 37 – Médias e desvios-padrão da espessura (μm) dos filmes depositados na superfície da zircônia.



5.3.2 Ângulos de contato

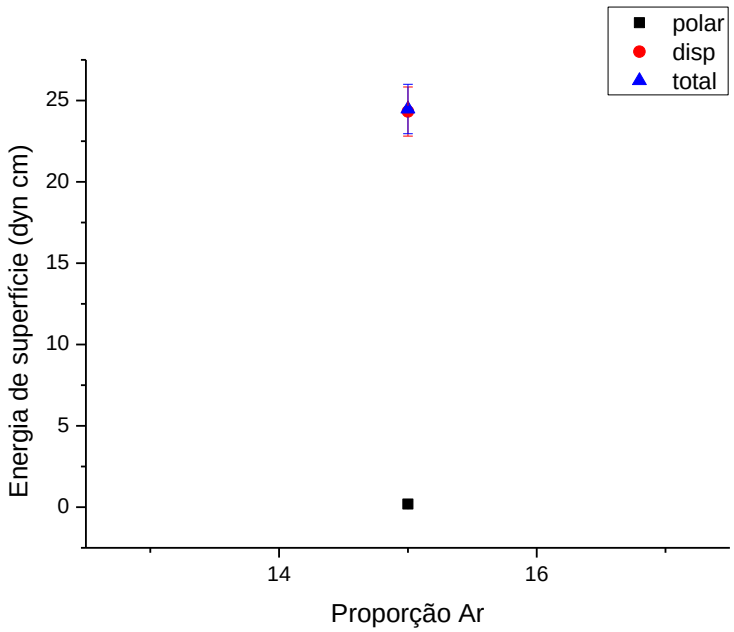
Figura 38 – Médias e desvios padrão (DP) dos valores de ângulos de contato dos filmes depositados na superfície da zircônia.



Como ilustra a Figura 38, após a deposição do filme 15% Ar na superfície da zircônia a ângulo de contato foi 106,90˚(±2,33), mostrando ser um filme hidrofóbico. Essa hidrofobicidade foi mantida após 7 dias (antes dos testes microbiológicos) (105,22˚ ±1,51). Com o pós-tratamento de O_2, o filme apresentou característica hidrofílica (zero). Após 7 dias, o filme 15% Ar/O_2 apresentou aumento do ângulo de contato (33,33 ±1,55).

5.3.3 Energia livre de superfície

Figura 39 – Componentes polar, $E_{P,}$ e dispersiva, E_D, bem como a total, E_T, da energia de superfície do filme depositado em zircônia.



Os resultados de energia livre de superfície estão apresentados na Figura 39. Considerando-se os valores de energia total (E_T), componente polar (E_P) e dispersiva (E_D), a E_P é menor que a E_D e a energia total está mais relacionada com a componente dispersiva.

5.3.4 Composição dos filmes (análise de XPS)

As Figuras 40 e 41 mostram as proporções atômicas das espécies que compõem os filmes 15% Ar e 15% Ar/O_2, respectivamente. Como tais resultados foram obtidos por XPS, hidrogênio não é contabilizado nos cálculos. Da mesma forma, o nitrogênio apresentou valor igual a zero para os dois filmes, mostrando que não houve contaminação do plasma com ar atmosférico. Pode-se observar que a proporção de C, [C], é maior para o filme 15% Ar (cerca de 40%) que para aquele submetido ao pós-tratamento de O_2, que apresentou cerca de 20% de C, [C]. A proporção de O,

[O] e Si, [Si] são praticamente iguais para o filme hidrofóbico. Já para o filme hidrofílico, as proporções de C, [C] e Si, [Si] são praticamente as mesmas. A Tabela 12 mostra as estruturas moleculares, calculadas para cada filme depositado, mostrando a redução do carbono e aumento do oxigênio.

Figura 40 – Gráfico da porcentagem atômica (%) para o filme estudado (15% Ar).

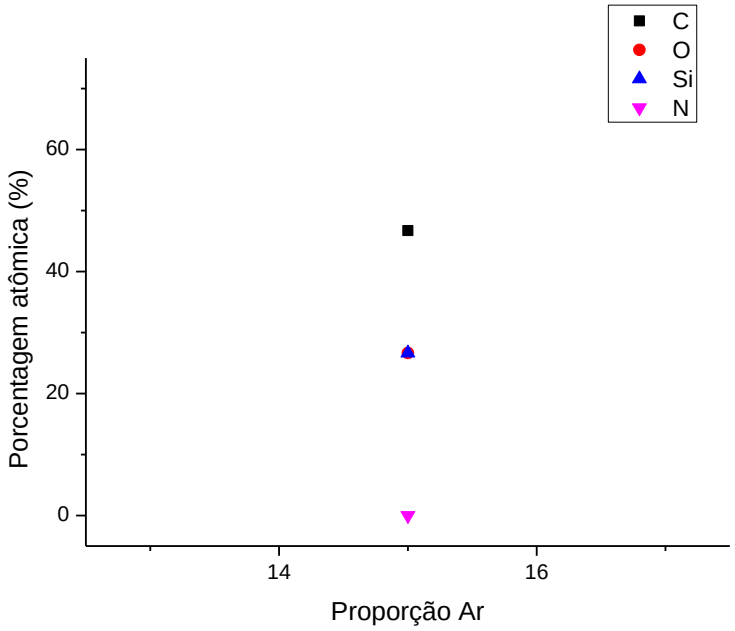


Figura 41 – Gráfico da porcentagem atômica (%) para o filme estudado (15% Ar) após tratamento com plasma de O_2.

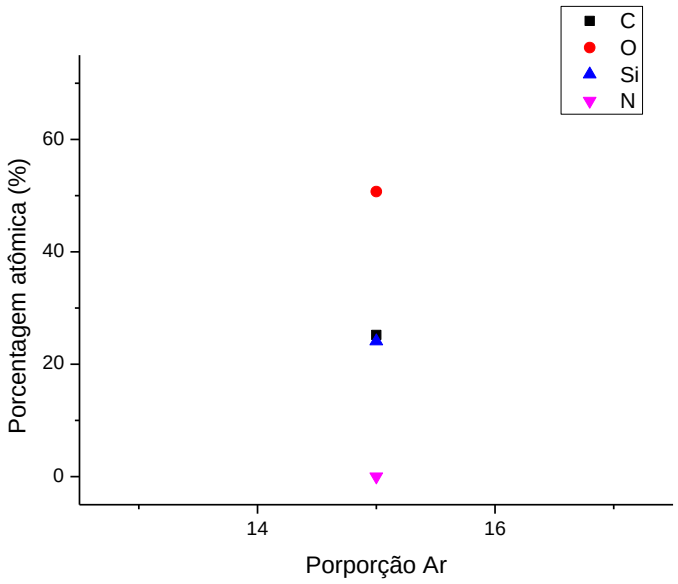


Tabela 12- Estrutura molecular dos filmes estudados

Filme	**Estrutura molecular**
15%Ar	$Si_1O_1C_{1,75}$
15%Ar/O_2	$Si_1O_{2,10}C_{1,05}$

5.3.5 Espectros de infravermelho - FTIR

Similar ao que foi observado para os filmes depositados em resina acrílica e titânio, a figura 42 mostra que os filmes depositados na superfície da zircônia também apresentaram as absorções relacionadas ao movimento de estiramento (2960 e 2940 cm^{-1}) de grupos C-H alifáticos, de deformação de CH_x em grupos metilsilil (1260, 794 cm^{-1}) de estiramento assimétrico (1022 cm^{-1}) de ligações Si-O em Si-O-Si e deformação (665 cm^{-1}) de ligações Si-H.

Nota-se que as alterações produzidas pelo tratamento em plasmas de oxigênio não foram percebidas no espectro de infravermelho do filme, uma vez que esses não apresentam alterações substanciais.

Figura 42 – Espectros de infravermelho de filmes depositados sobre zircônia a partir de HMDSO contendo argônio no plasma, sem e com pós-tratamento de oxigênio.

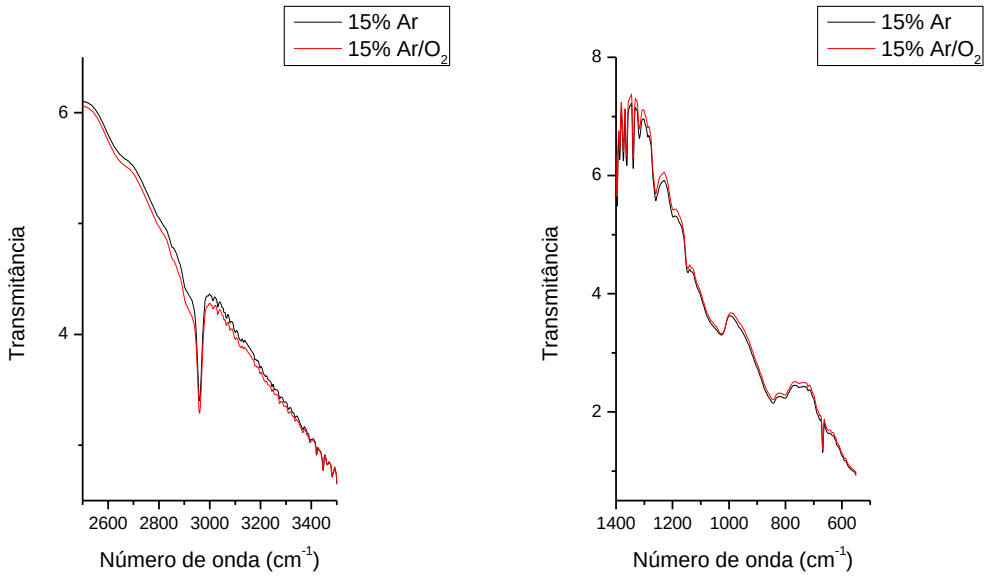
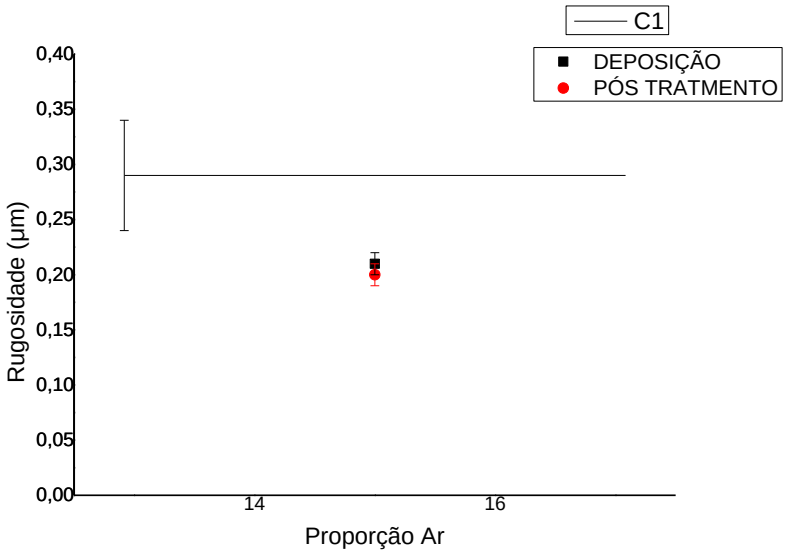


Tabela 13 - Números de ondas, atribuições e grupos de filmes depositados a partir de plasmas de HMDSO.

Número de ondas (cm^{-1})	Atribuições	Grupos	
665	Si-H_n		Guruvenket et al.[34], 2010
794	ν Si-C	$Si(CH_3)_2$	Guruvenket et al.[34], 2010
1022	ν Si-O	Si-O-Si	Gengenbach et al.[30], 1999
			Choudhury et al.[15], 2010
1260	∂ C-H_3	$Si(CH_3)_x$	Rao et al.[86], 2010
			Vautrin-Ul et al.[114], 2000
2960, 2940	ν C-H	CH_3 e CH_2	Ricci et al.[90], 2011

5.3.6 Rugosidade

Figura 43 – Médias e desvios-padrão da rugosidade (µm) dos filmes depositados na superfície da zircônia.

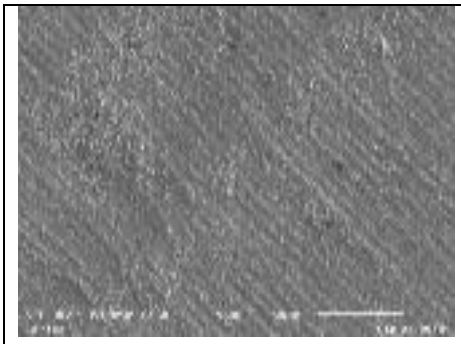
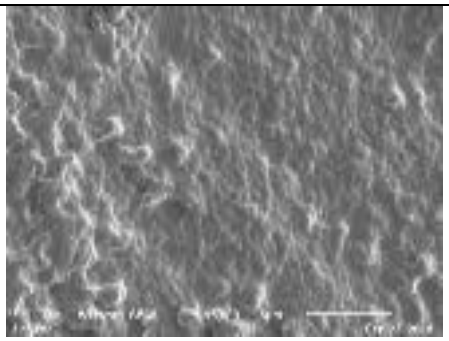
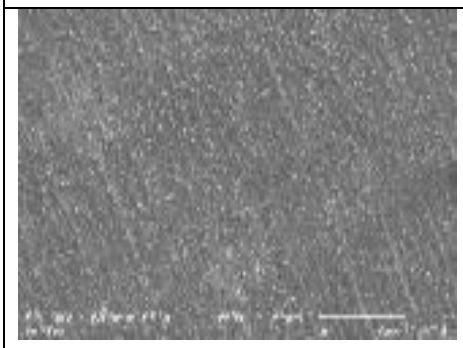
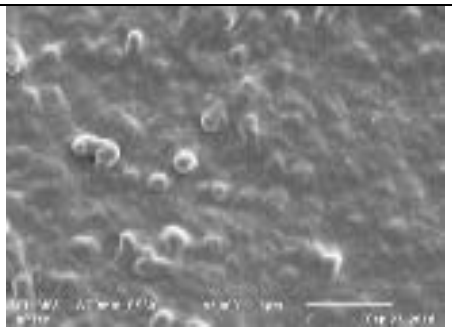
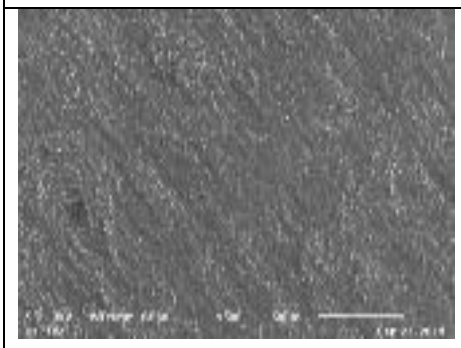
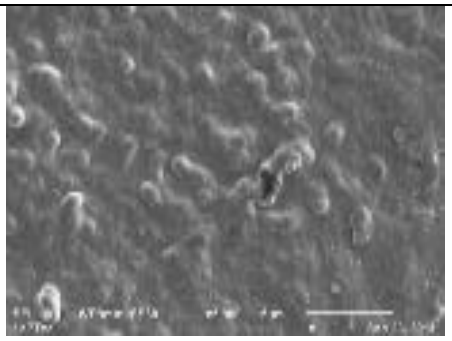


A Figura 43 ilustra a rugosidade dos filmes 15% Ar e 15% Ar/O_2, que foram, respectivamente, 0,21 µm ± 0,01 e 0,20 µm ± 0,01. Os valores foram inferiores ao do corpo de prova sem tratamento (0,28 µm ± 0,01).

5.3.7- MEV

A Figura 44 ilustra as micrografias obtidas das superfícies da zircônia sem tratamento (controle 44a e 44b) e com os filmes 15% Ar (44c e 44d) e 15% Ar/O_2 (44e e 44f). Nota-se superfície irregular da zircônia (controle) que foi recoberta pelos filmes depositados.

Figura 44 – Micrografias das superfícies de zircônia (controle) e com deposição do filme de HMDSO/Ar, sem e com pós-tratamento com O_2.

 **a - Controle (aumento 500)**	 **b - Controle (aumento 5.000)**
 **c - 15% Ar (aumento 500)**	 **d - 15% Ar (aumento 5.000)**
 **e - 15% Ar/O_2 (aumento 500)**	 **f - 15% Ar/O_2 (aumento 5.000)**

5.3.8 Formação de biofilme de *P. gingivalis*

5.3.8.1 Sem pré-condicionamento em saliva

Tabela 14 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *P. gingivalis* em filmes depositados nos corpos de prova de zircônia.

Corpo de prova		**Filmes**			
	Controle	**15% Ar**		**15% Ar/O2**	
	UFC/mL	UFC/mL	% cresc.	UFC/mL	% cresc.
1	$9,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	67	$7,0 \times 10^5$	86
2	$6,5 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	86	$6,5 \times 10^5$	80
3	$8,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	92	$7,5 \times 10^5$	92
4	$9,5 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	98	$8,0 \times 10^5$	92
5	$7,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	75	$8,0 \times 10^5$	92
6	$9,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	87	$7,0 \times 10^5$	81
7	$8,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	74	$8,5 \times 10^5$	96
8	$9,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	79	$7,5 \times 10^5$	85
9	$9,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	91	$6,5 \times 10^5$	74
Média	$8,6 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$	83	$7,4 \times 10^5$	86
DP	$1,0 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	10	$0,7 \times 10^5$	7

A Tabela 14 mostra que, para os corpos de prova tratados com os filmes avaliados, houve pequena diminuição na formação de biofilme de *P. gingivalis* em relação aos corpos de prova controle, com valores médios de 83% ± 10 para o filme 15 % Ar e 86% ± 7 para o filme 15% Ar/O_2. Os valores foram similares para os filmes hidrofóbico e hidrofílico.

5.3.8.2 Com pré-condicionamento em saliva

Analisando-se os valores em porcentagem, apresentados na Tabela 15, nota-se que houve diminuição na formação do biofilme de *P. gingivalis* quando os filmes foram depositados na superfície da zircônia em comparação aos corpos de prova controle, consideradas como 100%. Os valores médios foram similares para os dois filmes: 15% Ar - 66% ± 7; 15% Ar/O_2 - 63% ± 6.

Tabela 15 - Valores de UFC/mL e porcentagem (%) de crescimento de *P. gingivalis* em filmes depositados nos corpos de prova de zircônia, após armazenamento em saliva

	Filmes				
Corpo de prova	**Controle**	**15% Ar**		**15%Ar/O_2**	
	UFC/mL	**UFC/mL**	**% cresc.**	**UFC/mL**	**% cresc.**
1	12,5 x 10^6	7,0 x 10^6	60	7,5 x 10^6	64
2	11,5 x 10^6	8,0 x 10^6	69	7,5 x 10^6	64
3	11,0 x 10^6	7,5 x 10^6	64	8,0 x 10^6	69
4	15,0 x 10^6	1,0 x 10^6	75	9,0 x 10^6	68
5	14,0 x 10^6	1,1 x 10^6	79	8,0 x 10^6	60
6	11,0 x 10^6	8,0 x 10^6	60	8,5 x 10^6	64
7	14,0 x 10^6	8,0 x 10^6	62	8,5 x 10^6	65
8	13,0 x 10^6	9,0 x 10^6	69	6,5 x 10^6	50
9	12,0 x 10^6	7,5 x 10^6	58	8,0 x 10^6	62
Média	12,7 x 10^6	8,4 x 10^6	66	7,9 x 10^6	63
DP	1,4 x 10^6	1,2 x 10^6	7	0,7 x 10^6	6

5.3.9 Hidrofobicidade celular da *P. gingivalis*

O valor médio do ângulo de contato da *P. gingivalis* foi 22,8° (± 3,34), indicando superfície celular hidrofílica.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Em relação à espessura dos filmes de HMDSO depositados a plasma na superfície dos corpos de prova de resina acrílica, foi observado que, quando pequenas proporções de Ar (P_{Ar}) foram introduzidas (15%), a espessura da camada depositada manteve-se praticamente inalterada (Figura 19). Todavia, aumentando-se P_{Ar} além de 15% houve tendência de redução da espessura. Considerando-se que o tempo de deposição, *t*, foi mantido constante em todos os procedimentos, a taxa de deposição, que é definida como a razão entre a espessura e *t*, apresentou a mesma tendência dos valores de espessura. As taxas de deposição obtidas neste trabalho situaram-se entre 13 e 4 nm/min. Para entender o comportamento observado, deve-se considerar que a incorporação de Ar em plasmas aumenta a atividade do mesmo, ou seja, a descarga torna-se mais reativa e mais energética quando argônio está presente[120]. Esse aumento na atividade do plasma tem dois efeitos contrários sobre a taxa de deposição. Primeiramente, aumenta-se o grau de fragmentação da molécula do HMDSO, aumentando a disponibilidade de fragmentos precursores da formação do filme, o que tende a acelerar a velocidade de crescimento. Por outro lado, o aumento na atividade do plasma aumenta a energia total transferida ao filme pelo bombardeamento iônico fazendo crescer a taxa de ejeção das espécies já depositadas, pelo procedimento de "*sputtering*". Como a velocidade de crescimento do filme é um balanço entre a taxa de chegada e de remoção de espécies, atribui-se a queda na espessura com o aumento de P_{Ar} ao crescimento na taxa de "*sputtering*". Além disso, tendo em vista que a pressão final de gases foi mantida constante, com o aumento da P_{Ar} a proporção de HMDSO diminuiu, resultando em queda na disponibilidade de espécies precursoras da formação do filme. Resultados similares foram obtidos no estudo de Vautrin-Ul et

al.[114] em 2000, que avaliaram a proporção de HMDSO em função da espessura do filme, e observaram que filmes mais finos foram obtidos com menores proporções de HMDSO. Todos esses efeitos contribuíram para a tendência observada.

O filme 15% Ar depositado na superfície da zircônia, apresentou espessura de 0,32 µm (± 0,02) que foi similar à do respectivo filme depositado na superfície da resina (0,39 µm ± 0,06). No presente estudo, com o método utilizado (perfilometria) não foi possível determinar a espessura dos filmes obtidos para o titânio. De qualquer forma, as demais análises realizadas (ângulo de contato, XPS e FTIR) confirmaram que os filmes avaliados para o titânio foram depositados sobre as superfícies. Além disso, as leituras realizadas em resina acrílica, mostraram que, utilizando-se a perfilometria, filmes de pequena espessura (0,12 µm para 50% Ar) puderam ser mensurados.

Neste estudo, alguns dos filmes depositados em todos os materiais avaliados foram, posteriormente, submetidos ao pós-tratamento em plasma de oxigênio, visando remover carbono da superfície do filme, por meio do processo de ablação química, resultando em algumas monocamadas de SiOx, que são resistentes ao ataque do oxigênio e apresentam características hidrofílicas. Foi observado, nas análises em perfilômetro dos filmes com pós-tratamento, que não houve formação de degrau, evidenciando que a espessura inicial dos filmes foi mantida.

Quanto aos ângulos de contato mensurados após a deposição dos filmes em superfície de resina acrílica (Figura 20), foi possível observar tendência de redução nos valores obtidos quando P_{Ar} foi aumentada de 0 a 50%. Aumentando-se a proporção de Ar além de 50%, não produziu mais alterações em θ. Portanto, os resultados demonstraram que, variando-se a proporção de argônio no plasma foi possível controlar a molhabilidade/hidrofobicidade dos filmes. Os filmes de HMDSO

puro e aqueles depositados com menores proporções de argônio (15% e 30%) proporcionaram valores de ângulos de contato maiores que os observados em estudos anteriores[118, 128-129] para a mesma resina acrílica (cerca de 50° a 60°), resultando, portanto, em superfícies mais hidrofóbicas que a do material sem tratamento. As leituras realizadas após a deposição dos filmes, também mostraram que, para aqueles depositados com 0% Ar e 15% Ar, as superfícies apresentaram-se hidrofóbicas para os três materiais avaliados (resina, titânio e zircônia). Entretanto, houve variação nos valores médios obtidos (Figuras 20, 30 e 38). A deposição do HMDSO puro proporcionou ângulos de contato de 101,9° ± 2,54 para a resina e de 82,90˚± 3,66 para o titânio, enquanto os filmes depositados com 15% de argônio resultaram em valores de 88,2˚± 5,13 para a resina, 79,60˚± 2,28 para o titânio e 106,90 ˚± 2,33 para a zircônia.

Um aspecto observado neste estudo foi que, após envelhecimento dos corpos de prova por 7 dias, para todos os filmes depositados nas superfícies dos três diferentes materiais, não ocorreram alterações significativas na molhabilidade dos corpos de prova (Figuras 20, 30 e 38), evidenciando que os filmes obtidos foram estáveis quando em contato com a atmosfera.

Para os filmes que foram submetidos ao pós-tratamento de O_2, as medidas de ângulo de contato, realizadas após o tratamento, evidenciaram característica hidrofílica (valores iguais a zero) para todos os materiais avaliados. Esses resultados mostraram que o plasma de O_2 permite alterar a hidrofobicidade dos filmes depositados. Isso ocorre devido à variação na proporção de [O] na estrutura molecular do filme, conforme demonstrado pelas análises de XPS, que serão discutidas posteriormente. Os resultados mostraram, ainda, que, para todos os materiais, após 7 dias de envelhecimento, os filmes submetidos ao pós-tratamento

tiveram menor estabilidade. Os valores foram maiores que zero (cerca de 40°, 35° e 30°, para resina, titânio e zircônia, respectivamente), mostrando, assim, aumento do ângulo de contato (Figuras 26, 30 e 38). É importante salientar, no entanto, que, mesmo com o aumento observado, os valores ainda foram menores que os obtidos para os respectivos filmes sem pós-tratamento. Assim, a característica de menor hidrofobicidade (maior molhabilidade) foi mantida após o período estudado (7 dias).

Os resultados de energia livre de superfície dos filmes depositados na superfície de resina acrílica demonstraram que os valores para as componentes polar e dispersiva apresentaram a mesma tendência da energia total (Figura 21). Isso mostra que a presença do argônio no plasma aumentou a afinidade dos filmes tanto para líquidos polares como para apolares. Além disso, também foi possível observar que a energia total para os filmes 0% Ar, 15% Ar e 30% Ar foi mais relacionada à componente dispersiva, mostrando que esses filmes podem apresentar maior afinidade para líquidos apolares. Da mesma forma, quando os filmes foram depositados na superfície de titânio e da zircônia (Figuras 31 e 39, respectivamente), foi observado que os valores da componente polar foram menores que os da componente dispersiva, os quais estão mais próximos aos valores da energia total. Esses resultados mostram que a energia total está mais relacionada à componente dispersiva, mostrando que, da mesma forma que na superfície da resina acrílica, os filmes depositados em titânio e zircônia podem ser mais receptivos a líquidos apolares.

Nas análises de XPS dos filmes depositados, para todas as superfícies avaliadas, o hidrogênio não foi contabilizado nos cálculos. Da mesma forma, ainda que o nitrogênio não tenha sido deliberadamente introduzido no reator, ele aparece como contaminante em baixas proporções (Figuras 22, 27, 32, 33, 40 e 41). Isso

pode ser consequência tanto da atmosfera residual presente no reator durante o procedimento de deposição, como também resultado da interação de radicais livres residuais, incorporados na estrutura do filme, com espécies atmosféricas quando o corpo de prova é exposto ao ar[16].

Para entender os resultados de XPS dos filmes de HMDSO depositados em resina acrílica deve-se considerar o aumento na atividade do plasma com a P_{Ar}. À medida que a P_{Ar} aumenta, a taxa de fragmentação do composto organosilicone (HMDSO) cresce, afetando a cinética de deposição e, dessa forma, a composição química da estrutura obtida. O mesmo resultado foi observado no trabalho de Alexander et al.[4] em 1997, que avaliaram o grau de fragmentação do HMDSO em plasmas com alta e baixa potência. Os autores observaram que o aumento da potência produziu maior fragmentação do composto organometálico, fazendo crescer a proporção de espécies contendo carbono e/ou hidrogênio, de menor peso molecular, (H_2, H, CH_3, CH_4, C_2H_2, C_2H_4, C_2H_6, C_3H_8) na fase plasma. Essas espécies, assim como os compostos oxidados (CO, CO^+, CO_2, H_2O) (Ricci et al.[90], 2011), gerados a partir da combinação de radicais, são removidos do reator pelo sistema de vácuo e, dessa forma, não contribuem efetivamente para o processo de deposição. Nessa situação, os filmes são formados, principalmente, pela chegada de moléculas inorgânicas de menor peso molecular à superfície. Em outras palavras, há uma alteração na cinética de crescimento do filme de forma que espécies orgânicas, abundantemente incorporadas na estrutura quando o composto não é severamente fragmentado, passam a contribuir muito menos quando o monômero é muito fragmentado. Esses mecanismos podem explicar não somente as alterações de composição química (Figura 22) como também a queda na taxa de deposição dos filmes (Figura 19). Outro processo que pode ser apontado como responsável

pela perda de grupos orgânicos da estrutura é o bombardeamento iônico, visto que, aumentando-se P_{Ar}, aumenta-se a energia total entregue ao sólido por colisões iônicas.

Quando os filmes em resina acrílica receberam o pós-tratamento com oxigênio, foi observado que, para os filmes depositados com menores P_{Ar} (0% Ar/O_2 e 15% Ar/O_2 – Figura 27) a proporção de C [C] foi menor (cerca de 15%) que aquela verificada para os mesmos filmes sem pós-tratamento (cerca de 40% - Figura 22). Esses resultados estão de acordo com o processo de ablação química do pós-tratamento, que remove carbono da superfície. O aumento da P_{Ar} para 30%, também contribuiu para reduzir as proporções de orgânicos, pelos mesmos mecanismos já expostos para os filmes depositados em resina acrílica e não submetidos ao pós-tratamento (alteração na cinética de deposição e na composição química, e bombardeamento iônico). Para os filmes depositados sobre titânio e zircônia, o pós-tratamento também evidenciou o processo de ablação pelo plasma de oxigênio, reduzindo as proporções de carbono (Figuras 32, 33, 40 e 41).

Com base nas análises em XPS, foram calculadas as estruturas moleculares dos filmes depositados na superfície da resina acrílica, do titânio e da zircônia, tendo sido demonstrado que elas foram semelhantes (Tabelas 1, 8 e 12). Esses resultados mostraram que a deposição a plasma dos filmes de HMDSO pelo processo PECVD foi similar, independentemente do tipo de substrato. Outro aspecto verificado, para todos os materiais estudados, foi que o pós-tratamento promoveu a substituição do carbono [C] pelo oxigênio [O] na estrutura dos filmes (Tabelas 5, 8 e 12). Dessa forma, as análises e os cálculos das estruturas moleculares mostraram que a estequiometria dos filmes de HMDSO puro (0% Ar) ou depositados com pequena proporção de argônio (15% Ar), aproximaram-se mais da estequiometria do

polidimetilsiloxano (C_2H_6OSi) que da sílica (SiO_2). Por outro lado, os filmes depositados com maiores proporções de argônio na mistura de gases e aqueles submetidos ao pós-tratamento em plasma de oxigênio, possuem estruturas moleculares mais próximas da óxida que da polimérica.

Em relação aos resultados de FTIR, de forma geral, os espectros dos filmes obtidos nas superfícies da resina acrílica (Figura 23), titânio (Figura 34) e zircônia (Figura 42) foram similares. As bandas observadas na Figura 23 identificam vários componentes, que são gerados pela fragmentação da molécula precursora pelo plasma. Reações de múltiplas etapas na fase plasma também podem contribuir para a sua formação, gerando grupos não característicos da molécula do HMDSO como o Si-H. Analisando-se esses componentes, nota-se o crescimento de uma estrutura organosilicone, muito semelhante ao polidimetilsiloxano (PDMS). A Figura 23 evidenciou, ainda, que a introdução de argônio no plasma, alterou a cinética de deposição, modificando o filme e, consequentemente, as características do espectro. Todas essas variações demonstradas nas análises de FTIR podem ter sido intensificadas pela diminuição da espessura do filme (Figura 19), mas não podem ser atribuídas exclusivamente a esse aspecto. Portanto, a comparação dos espectros permite afirmar que a estrutura organosilicone (tipo polidimetilsiloxano) preparada em plasmas contendo somente HMDSO foi transformada em uma estrutura rica em óxido de silício quando argônio foi adicionado no plasma, consistentemente com os resultados obtidos por XPS. A elevada proporção de grupos metilsilil nos filmes depositados em plasmas contendo 0 e 15% de Ar, explica seu caráter hidrofóbico. Muito embora grupos polares Si-O-Si estejam presentes na estrutura organosilicone, a blindagem eletrostática (“*electrostatic shielding*”) causada pelos grupos metil, não polares, reduz seu efeito sobre as moléculas de água. Por

outro lado, quando a proporção de grupos metilsilil é diminuída, o grupo funcional polar (Si-O-Si) é exposto, tornando a superfície menos hidrofóbica.

Para os corpos de prova de resina acrílica (filmes depositados com proporções de Ar variando de 0 a 70%), ao se correlacionar os resultados de composição química, estrutura molecular e de molhabilidade, obtidos 7 dias após a deposição, nota-se que a redução no ângulo de contato com o aumento da P_{Ar} é consistente com a transição de uma estrutura hidrofóbica, do tipo silicone, para uma menos hidrofóbica, mais rica em óxido. Todavia, considerando-se a precisão dos resultados obtidos por XPS (20%) era esperado que a concentração de grupos polares contendo oxigênio e, consequentemente, o ângulo de contato dos filmes depositados com P_{Ar} maior que 30% fossem praticamente os mesmos. Avaliando-se a Figura 20, nota-se que a molhabilidade é similar somente para os filmes preparados com 50 e 70% de Ar no plasma. Já o filme depositado com P_{Ar} de 30% difere substancialmente das demais, indicando que a composição química não é o único fator influenciando os resultados.

As análises de FTIR dos filmes de resina (Figura 28), titânio (Figura 34) e zircônia (Figura 42) que foram submetidos ao pós-tratamento mostraram que não houve alterações substanciais nos espectros obtidos. Esses resultados são consequência da pequena espessura da camada superficial afetada pelo plasma de oxigênio em comparação à espessura total do filme.

Em relação à rugosidade, os corpos de prova controle (sem deposição de filmes) de resina acrílica, titânio e zircônia, apresentaram valores de Ra (µm), em média, de 0,27, 0,25 e 0,28, respectivamente (Figuras 24, 35 e 43). Para a resina acrílica, foi observado que a deposição do filme 0% Ar (HMDSO puro) proporcionou rugosidade maior que os demais. Esse resultado pode ser explicado pelo mecanismo de

deposição, no qual a estrutura é formada pela aglomeração de partículas com diferentes diâmetros que se assentam no substrato dando origem a estruturas granulares[59, 85], aumentando, dessa forma, a rugosidade superficial. Quando P_{Ar} era maior que 0%, foi verificado que a rugosidade da superfície diminuiu e permaneceu praticamente inalterada até P_{Ar} de 70%. Portanto, a tendência observada para o ângulo de contato na Figura 24 pode ser atribuída, principalmente, às alterações de composição induzidas pela variação na proporção de Ar. O pós-tratamento em plasma de oxigênio não teve efeito adverso sobre a rugosidade dos filmes depositados. Para a resina acrílica, a rugosidade média dos filmes de HMDSO puro (0,08 μm), que apresentaram estrutura mais granular, foi reduzida pelo pós-tratamento (0,02 μm). E, para todos os demais filmes depositados (Figuras 29, 35 e 43, para resina, titânio e zircônia, respectivamente), não foram observadas alterações na rugosidade.

Outro aspecto observado foi que, para todos os filmes depositados, os valores médios de rugosidade foram menores que as dos respectivos corpos de prova controles (sem deposição de filmes) de resina, titânio e zircônia. Houve diminuição da rugosidade de, aproximadamente, 70,4% em relação aos corpos de prova controle de resina acrílica, 72% em relação aos corpos de prova controle de titânio e 25% em relação aos corpos de prova controle de zircônia. Esse é um efeito positivo dos filmes de HMDSO sobre as superfícies dos materiais, tendo em vista que as próteses devem apresentar-se tão lisas quanto possível já que a rugosidade pode facilitar a retenção microbiana[2, 12, 38, 53, 70, 76, 80, 105, 109, 117] e, consequentemente, a ocorrência de infecções. Hauser□Gerspach et al.[38], 2012 investigaram a adesão in vitro das bactérias *Streptococcus sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis* sobre discos de titânio comercialmente puro, jateado e submetido a ataque ácido (Ra – 1,554 μm)

ou polido (Ra – 0,012 µm) e de zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio (Y-TZP) microestruturada (Ra – 0,356 µm) ou polida (Ra – 0,009 µm). Foi verificado que, para os dois materiais, a adesão das bactérias avaliadas ocorreu em maior extensão nas superfícies rugosas que nas lisas. Al-Ahmad et al.[2] em 2010, realizaram estudo in vivo utilizando vários materiais (alumina, zircônia, titânio e esmalte bovino). Foi observado que a rugosidade média foi de 0,014 µm para o esmalte bovino (controle) e variou de 0,021 µm para a alumina reforçada com zircônia e superfície polida a 0,544 µm para o titânio com superfície tratada por anodização eletroquímica. Os autores observaram que a espessura dos biofilmes formados, no período de 3 dias, correlacionaram com a rugosidade, com exceção do titânio com superfície desgastada (Ra - 0,054 µm). Bürgers et al.[12] em 2010 (a) realizaram estudos in vivo e in vitro avaliando a adesão de bactérias sobre titânio desgastado ("*machined*") e jateado seguido de ataque ácido. Foi verificada maior quantidade de *Streptococcus sanguinis* aderindo ao titânio jateado (Ra - 0,95 µm) nos testes in vitro e, in vivo, esse fenômeno foi ainda mais evidente (acúmulo de placa 7,7 vezes maior que no titânio desgastado – Ra - 0,15 µm). Esses resultados provavelmente ocorreram devido ao efeito de proteção ("*sheltering*") das superfícies rugosas contra as forças de remoção, as quais não estão presentes em estudos in vitro, em condições semi-estáticas. Por outro lado, no estudo in vitro realizado por Zhao et al.[134]em 2014, não foi possível correlacionar diretamente a rugosidade com a formação de biofilmes de 24 horas das bactérias avaliadas. Foram utilizados três materiais (titânio, liga de titânio-zircônia e óxido de zircônia) que receberam diferentes tipos de tratamentos de superfície (polimento, desgaste, ataque ácido). Os valores de rugosidade variaram de 0,07 µm a 0,8 µm. Houve diferenças no biovolume dos biofilmes formados pelas bactérias avaliadas (*Streptococcus oralis*,

Streptococcus mitis, *Streptococcus salivarius* e *Staphylococcus aureus*), nos diversos materiais. Quando o biovolume total formado foi analisado, foi observado que, para as amostras que receberam os mesmos tratamentos de superfície e apresentaram valores similares de rugosidade, as de zircônia atraíram mais biofilme que as de titânio. As bactérias utilizadas e o período de formação de biofilme avaliado (24 horas) podem ter contribuído para os resultados obtidos pelos autores.

Os resultados do presente estudo mostraram, ainda, que as médias de rugosidade obtidas, na maioria dos filmes, situaram-se abaixo de 0,2 µm. De acordo com a literatura, esse valor tem sido considerado como o limite de rugosidade média abaixo do qual a adesão microbiana não pode ser reduzida significativamente[3, 10, 27]. De acordo com Al-Radha et al.[3], em 2012, tem sido demonstrado que rugosidade inferior a esse valor não tem efeito na adesão bacteriana, tendo em vista que a maioria das bactérias são maiores em tamanho. No presente estudo, os filmes depositados em resina e titânio resultaram em superfícies com rugosidade menor que esse limite e, no caso da zircônia, os valores médios dos filmes obtidos (Figura 43) foram similares a ele. Dessa forma, pode-se considerar que, para todos os materiais e filmes avaliados, a rugosidade não foi um fator contribuinte para o processo de formação de biofilme de *C. albicans* e de *P. gingivalis*. Rimondini et al.[92], em 2002, avaliaram a adesão in vitro e in vivo de diferentes bactérias, entre elas a *P. gingivalis*, e observaram que, em geral, não houve diferença entre os corpos de prova de zircônia sinterizada ("*as-fired*") e altamente polida. Os autores relacionaram esses resultados ao fato da rugosidade média dessas superfícies ("*as-fired"* – 0,18 µm; polida – 0,04 µm) ter sido abaixo do limite de 0,2 µm. Da mesma forma, Lee et al.[55] em 2011, ao avaliarem resina composta fotopolimerizável, titânio comercialmente puro e zircônia Y-TZP, que foram polidos e receberam acabamento

com pasta de diamante, observaram maior adesão de *Streptococcus sanguinis* na resina, não havendo diferença entre o titânio e a zircônia. Apesar do acabamento igual para todos os materiais, os valores de rugosidade variaram tendo sido maior para a resina (0,179 µm), enquanto os do titânio (0,059 µm) e da zircônia (0,064 µm) foram baixos e similares, o que explicaria os resultados de adesão bacteriana obtidos.

As análises em microscopia (MEV) mostraram que houve formação de filmes recobrindo as superfícies estudadas. Além disso, os resultados foram, em geral, condizentes com os obtidos nas leituras de rugosidade e análises em XPS. Para o filme 0% Ar, depositado na superfície de resina acrílica (Figura 25), foi possível observar a presença de grânulos, que foi maior em relação a todos os filmes estudados nos três diferentes materiais. Essa característica é consistente com os resultados de rugosidade obtidos, tendo sido observado que o valor médio de rugosidade do filme 0% Ar foi maior que os dos demais filmes em resina. De forma geral, as análises de microscopia revelam que, à medida que a proporção de Ar aumentou, houve menor presença de estruturas granulares nos filmes depositados. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que, com o aumento na proporção de argônio, o conteúdo de HMDSO na mistura diminuiu. De acordo com a estequiometria dos filmes depositados (Tabela 1), quanto menor a proporção de argônio no plasma a estrutura do filme é mais próxima da estequiometria do polidimetilsiloxano (C_2H_6OSi), que forma uma estrutura mais granular que aquela da sílica (SiO_2). Da mesma forma, quando há o pós-tratamento em plasma de oxigênio, a estequiometria do filme é mais próxima à da sílica, o que explica nas imagens de MEV haver menor quantidade de grânulos (Figuras 30c e 30d). Para o titânio, as superfícies com os filmes depositados apresentam-se mais lisas (menor rugosidade)

que o controle, que apresentou sulcos (Figura 36). E, para a zircônia (Figura 44), as diferenças entre as características de superfície do controle e dos corpos de prova com deposição de filmes não foram tão acentuadas, aspecto também observado nas medidas de rugosidade.

Para a formação de biofilme na superfície de resina acrílica foi utilizada a espécie *C. albicans* por ser o microrganismo mais comumente associado à estomatite protética[40, 109]. Os resultados obtidos mostraram que os valores de crescimento de biofilme de *C. albicans* foram menores para os filmes 0% Ar, 15% Ar e 30% Ar, quando comparados com o do controle, considerado como 100% (Tabela 3). Esses filmes também apresentaram maiores valores de ângulo de contato em relação àqueles depositados com 50% Ar e 70% Ar. Assim, os resultados deste estudo sugerem que filmes hidrofóbicos, depositados na superfície de resina acrílica, podem promover menor formação de biofilme de *C. albicans*. Apesar das diferenças nas metodologias, os resultados de Yildirim et al.[121], em 2005, foram similares. Os autores avaliaram a modificação de resina acrílica através de um tratamento a plasma, alterando a molhabilidade da superfície e verificaram maior adesão de *C. albicans* nas superfícies hidrofílicas. A adesão dos microrganismos também tem sido correlacionada com a hidrofobicidade celular. De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa e em estudo anterior[118], a *C. albicans* (ATCC 90028) pode ser considerada uma cepa hidrofílica e, assim, houve maior formação de biofilme nas superfícies com menores ângulos de contato (50% Ar e 70% Ar), bem como para os filmes com pós-tratamento de O_2 (Tabela 6), que também foram hidrofílicos. Outros estudos também relataram essa associação entre hidrofobicidade celular/molhabilidade do substrato, isto é, que a adesão e o desenvolvimento de biofilme de espécies hidrofílicas, como a *C. albicans*, aumentam em superfícies mais

hidrofílicas [46, 64]. Da mesma forma, Yoshijima et al.[123] em 2010, observaram que a aplicação de um revestimento hidrofílico sobre a superfície da resina acrílica diminuiu a adesão de cepas hidrofóbicas, porém, para várias cepas não-hidrofóbicas, houve aumento na adesão.

Tem sido observado que a bactéria *P. gingivalis* está presente em grande quantidade no biofilme supra e sub-gengival em peri-implantites[28, 103]. Assim, essa bactéria foi selecionada para os testes microbiológicos realizados com os corpos de prova de titânio e de zircônia. Foi verificado que a formação de biofilme de *P. gingivalis* foi cerca de 40% menor nos corpos de prova de titânio com filmes de HMDSO puro ou depositados com 15% Ar, em comparação com as superfícies não tratadas (Tabela 10). Assim, embora a redução tenha sido menor que a observada para a resina acrílica e *C. albicans* para os filmes 0% Ar, 15% Ar e 30% Ar, que foi de, aproximadamente, 60 a 70% (Tabela 3), houve também uma tendência de redução de *P. gingivalis* em superfícies de titânio mais hidrofóbicas. Nos corpos de prova de zircônia, os filmes depositados proporcionaram redução na formação de biofilme de *P. gingivalis*. Entretanto, as porcentagens observadas foram menores (em torno de 15%) e similares entre o filme hidrofóbico e o hidrofílico (Tabela 14). Embora estudos sobre a retenção microbiana em titânio e zircônia tenham sido realizados, a comparação direta dos resultados é difícil, devido às diferenças nas metodologias. Em estudo in vivo, Al-Ahmad A et al.[2] 2010, analisaram vários materiais (alumina, zircônia, titânio e esmalte bovino) com diferentes composições e características de superfície. Os ângulos de contato variaram de 22,09° para o titânio com superfície tratada por anodização eletroquímica a 96,55° para o titânio com superfície desgastada ("*machined*"), enquanto o esmalte bovino apresentou valor de 73,40°. Não foram observadas diferenças na composição dos biofilmes

entre os materiais, tendo sido identificadas espécies de *Streptococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* e espécies de *Veillonella*. Bürgers et al.[12], em 2010, avaliaram in vivo e in vitro a adesão de bactérias sobre titânio desgastado ("*machined*") e jateado seguido de ataque ácido. Os valores de energia de superfície do titânio desgastado foram maiores (energia total – 39,6 mJ/m^2; componente dispersivo – 35,9 mJ/m^2; componente polar – 3,7 mJ/m^2) que os do titânio jateado (total – 18,3 mJ/m^2; componente dispersivo - 18,1 mJ/m^2; componente polar – 0,2 mJ/m^2). Foi verificada maior quantidade de *Streptococcus sanguinis* aderindo ao titânio jateado nos testes in vitro e, in vivo, esse fenômeno foi ainda mais evidente (acúmulo de placa 7,7 vezes maior que no titânio desgastado). A opinião atual, de acordo com os autores, indica que materiais com baixa energia de superfície e rugosidade reduzida, limitam a adesão microbiana. No entanto, o titânio jateado apresentou menor energia, porém maior rugosidade, fato que, para os autores, evidenciou que o efeito da rugosidade se sobrepôs ao da energia livre de superfície na adesão inicial ao titânio. Al-Radha et al.[3], em 2012, avaliaram diversos materiais utilizados em implantes e observaram que o titânio polido exibiu menor ângulo de contato (74,32°) e maior energia de superfície (37,58 mN/m) que a zircônia polida (82,79°; 33,4 mN/m). Segundo os autores, a energia livre de superfície pareceu ser o fator mais importante para os resultados obtidos (zircônia teve efeito superior em reduzir a presença de microorganismos). É importante notar que, no estudo de Al-Radha et al.[3] (2012), foi avaliada a adesão inicial (6 horas) e as bactérias utilizadas foram *Streptococcus mitis* e *Prevotella nigrescens*. No estudo in vitro de Zhao et al.[135], em 2014, foram utilizados titânio, liga de titânio-zircônia e óxido de zircônia, que receberam diversos tipos de tratamentos de superfície (polimento, desgaste, ataque ácido) tendo sido observado que os ângulos de contato

variaram de 2° a 92°. Entre os quatro tipos de tratamentos realizados no titânio, os resultados mostraram que as menores quantidades de biovolume total formado pelas diferentes bactérias avaliadas (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Staphylococcus aureus*), foram observadas tanto nas amostras mais hidrofílicas como nas mais hidrofóbicas. Assim, nos estudos citados, a hidrofobicidade dos diversos materiais, entre eles titânio e zircônia, parece não ter influenciado nos testes microbiológicos. Os diferentes períodos avaliados, de adesão inicial e de formação dos biofilmes, podem ter contribuído para esses resultados. Da mesma forma, diversos tipos de bactérias foram avaliados. Tem sido relatado que a hidrofobicidade da superfície celular é também um fator a ser considerado. No presente estudo a hidrofobicidade celular da cepa de *P. gingivalis* avaliada foi de 22,8°. Resultados similares foram relatados por van der Mei *et al*.[113] em 1998, para as cepas de *P. gingivalis* HG1101 e HG1102 que apresentaram ângulos de contato mensurados com água de 30° e 37°, respectivamente. A característica hidrofílica da cepa utilizada neste estudo pode explicar, pelo menos em parte, a tendência observada de maior formação de biofilme de *P. gingivalis* para os filmes menos hidrofóbicos (1% Ar/O_2 e 15% Ar/O_2) depositados no titânio (Tabela 10).

Para simular a condição bucal, os corpos de prova foram armazenados em saliva humana[12, 57, 73, 88, 96] previamente à realização dos testes microbiológicos. Foi possível observar que, com a presença da película de saliva na superfície dos corpos de prova de resina acrílica, houve maior formação de biofilme de *C. albicans* em todos eles (controle e com os diferentes filmes de HMDSO depositados). Os valores de contagem das Tabelas 3 e 5 (sem saliva) foram da ordem de 10^6 UFC/mL, enquanto os da Tabela 4 e 6 (com saliva) foram da ordem de 10^7 UFC/mL. No estudo de Santana et al.[96], em 2013, foi avaliada a hidrofobicidade da *C. albicans*

90028 cultivada em meio de cultura suplementado ou não com carboidratos, usualmente presentes na dieta. A formação de biofilme sobre resina acrílica nas mesmas condições também foi investigada. Foi observado que as células cultivadas em condições limitadas de nutrientes foram mais hidrofóbicas que as cultivadas em meios suplementados. Além disso, foi observado que, para os biofilmes maduros (48 e 72 horas), a exposição aos meios suplementados resultou em maior número de células viáveis e maior atividade metabólica comparadas com o controle (sem suplementação). Os autores associaram esses resultados à presença da película de saliva sobre a superfície da resina a qual, segundo o estudo de Göcke et al.[31], em 2002, apresenta muitas proteínas hidrofílicas. Dessa forma, os autores consideraram que as alterações nas proteínas da parede celular, em condições limitadas de nutrientes, devem ter contribuído para a maior hidrofobicidade celular e, consequentemente, redução na formação de biofilme[96]. No presente estudo, foi utilizado meio de cultura suplementado com glicose e a cepa de *C. albicans* apresentou característica hidrofílica, fatores que, provavelmente, contribuíram para a maior formação de biofilme nos corpos de prova que foram pré-condicionados em saliva. A Tabela 4 mostra que, após o armazenamento em saliva, houve pouca redução na formação de biofilme de *C. albicans*. É interessante notar que as porcentagens obtidas com os filmes 50% Ar e 70% Ar (menos hidrofóbicos) foram menores que as dos demais (Tabela 4), tendência oposta àquela observada nos corpos de prova avaliados sem pré-condicionamento em saliva (Tabela 3). Da mesma forma, para os filmes hidrofílicos (0% Ar/O_2, 15% Ar/O_2 e 30% Ar/O_2) a presença da película de saliva resultou em porcentagens de redução em torno de 15 a 20% (Tabela 7), enquanto para os mesmos filmes, sem saliva, nenhuma redução na formação de biofilme de *C. albicans* foi observada (Tabela 6). Assim, os

resultados deste estudo indicam que a interação entre *C. albicans*, saliva e superfície é complexa e, conforme relatado na literatura, a película formada pode ser influenciada pelo tipo de substrato[104, 121-122]. De qualquer forma, foi observado que, em geral, a saliva teve efeito homogeneizador ("*levelling*")[51], diminuindo as diferenças entre as características das superfícies, que originalmente apresentaram hidrofobicidades distintas[127], tornando menos pronunciadas as diferenças entre os valores de formação de biofilme, nos corpos de prova pré-condicionados. E, como já relatado, para todos os filmes a saliva aumentou a formação de biofilme de *C. albicans* sobre a resina acrílica avaliada (da ordem de 10^6 UFC/mL para 10^7 UFC/mL).

No presente estudo, foi também verificado que, para a bactéria *P. gingivalis*, a saliva aumentou a formação de biofilme para os corpos de prova de titânio controles (sem filmes) da ordem de 10^6 UFC/mL para 10^7 UFC/mL e, para todos os corpos de prova de zircônia (controle e com filmes depositados) da ordem de 10^5 UFC/mL para 10^6 UFC/mL. Similar à resina acrílica, a saliva em contato com os filmes hidrofílicos (0% Ar/O_2 e 15% Ar/O_2) depositados no titânio proporcionou porcentagens de redução em torno de 40% (Tabela 11), em relação ao controle, que foram maiores que aquelas obtidas para esses mesmos filmes, sem saliva (Tabela 10; em torno de 10 a 20%). Como consequência, as diferenças observadas entre os filmes hidrofóbicos (tendência de menor formação de biofilme) e hidrofílicos para os testes realizados sem saliva, não foram mais detectadas (efeito nivelador da saliva). E, as porcentagens de redução de formação de biofilme da *P. gingivalis* foram de, aproximadamente, 40% para os quatro filmes avaliados. Já para a zircônia, embora a saliva também tenha resultado em porcentagens maiores de redução (33% a 37%, aproximadamente) em relação ao controle (Tabela 15), quando comparadas com os

valores obtidos sem saliva (tabela 14, redução em torno de 15%), as médias dos filmes hidrofóbico e hidrofílico foram similares, em qualquer das condições avaliadas. Lima et al.[58], em 2008, também observaram que o efeito da saliva na adesão microbiana variou dependendo do substrato e do tipo de bactéria avaliada. Os autores avaliaram a adesão de bactérias nas superficies de titânio, zircônia e hidroxiapatita e verificaram que, para o *Streptococcus mutans*, as diferenças observadas entre os materiais (maior adesão ao titânio e à zircônia que à hidroxiapatita) não foram mais detectadas na presença de saliva. Para a bactéria *Actinomyces naeslundii*, não houve diferença entre as amostras com e sem saliva e, em geral, aderiu menos no titânio e na zircônia que na hidroxiapatita.

Outro aspecto observado no presente estudo foi que a formação de biofilme de *P. gingivalis* foi menor nos corpos de prova de zircônia que nos de titânio. Para a zircônia, os valores foram da ordem de 10^5 UFC/mL e de 10^6 UFC/mL para os corpos de prova avaliados sem e com saliva, respectivamente, enquanto para o titânio esses valores foram da ordem de 10^6 UFC/mL (sem saliva) e entre 10^6 e 10^7 UFC/mL (com saliva). Outros autores também relataram resultados similares. Scarano et al.[100], em 2004, realizaram estudo em que 10 voluntários utilizaram aparelhos contendo discos de titânio comercialmente puro e de óxido de zircônia (rugosidades similares – titânio 0,73 µm; zircônia 0,76 µm) por 24 horas. Foi verificado que a área recoberta (porcentagem), avaliada em microscopia, foi menor para a zircônia (12,1%) que para o titânio (19,3%). Hauser□Gerspach et al. [38] em 2012, investigaram a adesão in vitro das bactérias *Streptococcus sanguinis* e *Porphyromonas gingivalis* sobre discos de titânio comercialmente puro, jateado e submetido a ataque ácido ou polido, e zircônia tetragonal estabilizada por óxido de ítrio (Y-TZP), microestruturada ou polida. Segundo os autores, os resultados

confirmaram a expectativa de que a zircônia, nas condições avaliadas, mostraria menor adesão bacteriana que o titânio, demonstrando que a zircônia pode ser um material favorável para confecção de "*abutments*" sobre implantes, com menor potencial de colonização. Sánchez et al. [95], em 2014, utilizaram hidroxiapatita, discos de titânio jateado e submetido a ataque e zircônia com superfície com micro rugosidades obtidas pelo tratamento com ácido. Foram avaliados biofilmes mistos de 6 espécies, entre elas a *P. gingivalis*, e verificaram que, embora a viabilidade tenha sido similar para os três materiais, a espessura dos biofilmes formados na zircônia foi menor nos 3 períodos pesquisados (12h, 48h e 72h). Do Nascimento et al.[67], em 2014, também realizaram estudo in vivo para avaliar a adesão bacteriana em titânio puro desgastado, titânio fundido e polido e zircônia. Todos os materiais mostraram colonização bacteriana após exposição ao meio bucal por 24 horas. *P. gingivalis* foi isolada em 95.84% das amostras. E, de modo geral, a zircônia mostrou as menores contagens bacterianas.

Os parâmetros estabelecidos neste estudo, para a técnica PECVD utilizada, permitiram a deposição de filmes, de HMDSO puro ou com diferentes proporções de argônio na mistura de gases, nas superfícies avaliadas (resina acrílica, titânio e zircônia). Foi possível obter filmes com composições e estruturas químicas distintas e superfícies com diferentes hidrofobicidades. Os filmes depositados apresentaram-se estáveis, com pequena espessura e adesão eficiente aos substratos (nenhum descolamento foi observado), e reduziram a rugosidade das superfícies. Para os três materiais, alguns dos filmes depositados proporcionaram redução no número de células fúngicas (*C. albicans*) e bacterianas (*P. gingivalis*) dos biofilmes de 48 horas. Esses aspectos sugerem que esses filmes têm potencial para aplicação em diferentes materiais odontológicos. Além disso, clinicamente, existem forças de

remoção geradas pela mastigação, fluxo salivar e escovação. Nessas condições, os resultados obtidos com os filmes depositados podem ser melhores, devido à ausência da proteção proporcionada aos microrganismos pelas rugosidades superficiais. Assim, o efeito desses filmes na adesão inicial e em condições que simulem as forças de remoção merece ser avaliado em estudos futuros.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais avaliadas, os resultados obtidos permitiram concluir que:

1) Para os filmes depositados em resina acrílica, o aumento da proporção de argônio no plasma resultou em: a) diminuição da espessura, da taxa de deposição, dos ângulos de contato e da rugosidade; b) aumento dos valores de energia livre de superfície.

2) Para os filmes obtidos nos três materiais (resina acrílica, titânio e zircônia), e que não foram submetidos ao pós-tratamento em plasmas de oxigênio, não houve alterações dos ângulos de contato no período de 7 dias após a deposição.

3) O pós-tratamento com oxigênio tornou os filmes hidrofílicos (ângulos de contato iguais a zero). Após 7 dias do tratamento, apesar do aumento nos ângulos de contato, as superfícies continuaram hidrofílicas.

4) As proporções de carbono presentes nos filmes depositados foram reduzidas pelo pós-tratamento com oxigênio e pelo aumento do argônio na mistura de gases (30%, 50% e 70%), tornando as estruturas moleculares desses filmes mais próximas da óxida (sílica - SiO_2) que da polimérica (polidimetilsiloxano - C_2H_6OSi).

5) A rugosidade de todos os filmes obtidos foi menor que à dos respectivos controles (resina, titânio e zircônia, sem deposição de filmes), com médias inferiores à 0,2 µm.

6) Em geral, o aumento da proporção de argônio e o pós-tratamento com oxigênio diminuíram a presença de grânulos nas superfícies dos filmes depositados.

7) Os filmes hidrofóbicos resultaram em menores valores de formação de biofilme de *C. albicans* na resina acrílica e de *P. gingivalis* no titânio.

8) As cepas avaliadas de *C. albicans* e de *P. gingivalis* apresentaram características hidrofílicas, com maiores valores de formação de biofilme em superfícies hidrofílicas.

9) A presença de saliva resultou em: a) maior formação de biolfime de *C. albicans* nas superfícies de resina acrílica (controle e com filmes depositados); b) menor formação de biolfime de *P. gingivalis* nas superfícies de titânio, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas; c) maior formação de biolfime de *P. gingivalis* nas superfícies de zircônia (controle e com filmes depositados).

Referência

REFERÊNCIA

1. Akesso L, Navabpour P, Teer D, Pettitt ME, Callow ME, Liu C et al. Deposition parameters to improve the fouling-release properties of thin siloxane coatings prepared by PACVD. Appl Surf Sci. 2009; 255(13-14): 6508-14.

2. Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Faust J, Bächle M, Follo M, Wolkewitz M, et al. Biofilm formation and composition on different implant materials in vivo. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010; 95B(1): 101-9.

3. Al-Radha ASD, 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.

4. Alexander MR, Jones F R, Short R D. Mass spectral investigation of the radio-frequency plasma deposition of hexamethyldisiloxane. J Phys Chem. B 1997; 101(18): 3614-9.

5. Bartoš P, Volfová L, Špatenka P. Limited volume thin film deposition on geometrically complicated substrates. Eur Phys J D. 2009; 54 (2): 173-7.

6. Bayram C, Mizrak AK, Aktürk S, Kurşaklioğlu H, Iyisoy A, Ifran A, et al. In vitro biocompatibility of plasma-aided surface-modified 316L stainless steel for intracoronary stents. Biomed Mater. 2010; 5 (5): 055007 (8pp).

7. Bazaka K, Jacob MV, Crawford RJ, Ivanova EP. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. Acta Biomater. 2011; 7 (5): 2015-28.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da Foar, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: http://www.foar.unesp.br#biblioteca/manual

8. Beikler T, Flemmig TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. Periodontol 2000. 2011; 55(1): 87-103.

9. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. Arch Oral Biol. 2014; 59(1): 66-72.

10. Bollen, CM, Lambrechts, Quirynen P, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mat. 1997; 13(4): 258-69.

11. Bremer F, Grade S, Kohorst P, Stiesch M. In vivo biofilm formation on different dental ceramics. Quintessence Int. 2011; 42(7): 565-74.

12. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. Clin Oral Implants Res. 2010; 21(2): 156-64.

13. Bürgers 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(6): 2307-13.

14. Callan DP. Dental implant design and oral and systemic health. Compend Contin Educ Dent. 2007; 28(9): 482-4, 486-90, 492. Review.

15. Choudhury AJ, Chutia J, Kakati H, Barve SA, Pal AR, Sarma NS, et al. Studies of radiofrequency plasma deposition of hexamethyldisiloxane films and their thermal stability and corrosion resistance behavior. Vacuum. 2010; 84(11): 1327-33.

16. d'Agostino R Plasma Deposition, Treatment and Etching of Polymers. New York: Academic Press, 1990.

17. da Silva WJ, Leal CM, Viu FC, Gonc alves LM, Barbosa CM, Del Bel Cury AA. Influence of surface free energy of denture base and liner materials on *Candida*

albicans biofilms. J Investig Clin Dent. 2014; doi: 10.1111/jicd.12079. 5 [Epub ahead of print].

18. da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010; 94(1): 149-56.

19. de Avila ED, de Molon RS, Vergani CE, Mollo Jr FA, Salih V. The relationship between biofilm and physical-chemical properties of implant abutment materials for successful dental implants. Materials. 2014; 7(5): 3651-62.

20. de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B. 2006; 83(1): 34-8.

21. Dhir S. Biofilm and dental implant: The microbial link. J Indian Soc Periodontol. 2013; 17(1): 5-11.

22. Dong Y, Li X, Tian L, Bell T, Sammons RL, Dong H. Towards long-lasting antibacterial stainless steel surfaces by combining double glow plasma silvering with active screen plasma nitriding. Acta Biomater. 2011; 7(1): 447- 57.

23. Edgerton M, Scannapieco FA. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of *Streptococci*. Int J Oral Maxillofac Implants. 1996; 11(4): 443-9.

24. Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. Infect Immun. 1993; 61(6): 2644-52.

25. Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A, Yoshinari M. In vitro adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces. Dent Mater J 2013; 32(1): 101-6.

26. Elguezabal N, Maza JL, Dorronsoro S, Ponton J. Whole saliva has a dual role on the adherence of *Candida albicans* to polymethylmetacrylate. Open Dent J. 2008; 2: 1-4.

27. Elter C, Heuer W, Demling A, Hannig M, Heidenblut T, Bach FW, et al. Supra- and subgingival biofilm formation on implant abutments with different surface characteristics. Int J Oral Maxillofac Implants. 2008; 23(2): 327-34.

28. Figuero E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri□implant mucositis and peri□implantitis. Periodontol 2000. 2014; 66(1): 255-73.

29. Fracassi F, d'Agostino R, Palumbo F, Angelini E, Grassini S, Rosalbino F. Application of plasma deposited organosilicon thin films for the corrosion protection of metals. Surf Coat Technol. 2003; 174-5: 107-11.

30. Gengenbach TR, Griesser HJ. Post-deposition ageing reactions differ markedly between plasma polymers deposited from siloxane and silazane monomers. Polymer. 1999; 40(18): 5079-94.

31. Göcke R, Gerath F, von Schwanewede H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. Clin Oral Investig. 2002; 6(4): 227-35.

32. Guess PC, Att W, Strub JRf. Zirconia in fixed implant prosthodontics. Clin Implant Dent Relat Res. 2012; 14(5): 633-45.

33. Guillemot G, Despax B, Raynaud P, Zanna S, Marcus P, Schmitz P, et al. Plasma deposition of silver nanoparticles onto stainless steel for the prevention of fungal biofilms: a case study on *Saccharomyces cerevisiae*. Plasma Process Polym. 2008; 5(3): 228-38.

34. Guruvenket S, Azzi M, Li D, Szpunar JA, Martinu L, Klemberg-Sapieha JE. Structural, mechanical, tribological, and corrosion properties of a-SiC:H coatings prepared by PECVD. Surf Coat Technol. 2010; 204(21-22): 3358-65.

35. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early *Candida albicans* adhesion to prosthetic resins. J Mater Sci Mater Med. 2009 (a); 20(1): 249-55.

36. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. Dent Mat. 2009; 25(8): 969-75.

37. Hauser□Gerspach I, Stübinger S, Meyer J. Bactericidal effects of different laser systems on bacteria adhered to dental implant surfaces: an in vitro study comparing zirconia with titanium. Clin Oral Implant Res. 2010; 21(3): 277-83.

38. Hauser-Gerspach I, Vadaszan J, Deronjic I, Gass C, Meyer J, Dard M, et al. Influence of gaseous ozone in peri-implantitis: bactericidal efficacy and cellular response. An in vitro study using titanium and zirconia. Clin Oral Investig. 2012; 16(4): 1049-59.

39. Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K. Characterization and protein-adsorption behavior of deposited organic thin film onto titanium by plasma polymerization with hexamethyldisiloxane. Biomaterials. 2004; 25(1): 119-27.

40. He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. Mycoses. 2006; 49(2): 80-4.

41. 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. 2011; 30(2): 193-200.

42. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res. 2009; 88(11): 982-90.

43. Holst S, Blatz MB, Hegenbarth E, Wichmann M, Eitner S. Prosthodontic considerations for predictable single-implant esthetics in the anterior maxilla. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63(9): 89-96.

44. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence. 2011; 2(5): 435-44.

45. James CE. Recent advances in studies of polymicrobial interactions in oral biofilms. Curr Oral Health Rep. 2014; 1(1): 59-69.

46. Karaagaclioglu L, Can G, Yilmaz B, Ayhan N, Semiz O, Levent H. The adherence of *Candida albicans* to acrylic resin reinforced with different fibers. J Mater Sci Mater Med. 2008; 19(2): 959-63.

47. Kensche A, Reich M, Kümmerer K, Hannig M, Hannig C. Lipids in preventive dentistry. Clin Oral Invest. 2013; 17(3): 669-85.

48. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. J Microbiol. 2011; 49(2): 171-7.

49. Kim JH, Lee MA, Han GJ, Cho BH. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. Acta Odontol Scand. 2014; 72(1): 1-12.

50. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. Infect Immun. 1985; 50(1): 97-101.

51. Koch C, Bürgers R, Hahnel S. *Candida albicans* adherence and proliferation on the surface of denture base materials. Gerodontology. 2013; 30(4): 309-13.

52. Krasteva NA, Toromanov G, Hristova KT, Radeva EI, Pecheva EV, Dimitrova RP, et al. Initial biocompatibility of plasma polymerized hexamethyldisiloxane films with different wettability. J Phys: Conf Ser. 2010; 253(1): 012079. doi:10.1088/1742-6596/253/1/012079

53. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. Eur J Oral Sci. 2003; 111(6): 465-71.

54. Lassen B, Holmberg K, Brink C, Carlén A, Olsson J. Binding of salivary proteins and oral bacteria to hydrophobic and hydrophilic surfaces in vivo and in vitro. Colloid Polym Sci. 1994; 272(9): 1143-50.

55. Lee BC, Jung GY, Kim DJ, Han JS. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. J Adv Prosthodont. 2011; 3(2): 81-4.

56. Lehocký M, Amaral PFF, Sťahel P, Coelho MAZ, Barros-Timmons AM, Coutinho JAP. Preparation and characterization of organosilicon thin films for selective adhesion of *Yarrowia lipolytica* yeast cells. J Chem Technol Biotechnol. 2007; 82(4): 360-6.

57. Li J, Hirota K, Goto T, Yumoto H, Miyake Y, Ichikawa TJ. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. J Dent. 2012; 40(8): 686-92.

58. Lima EM, Koo H, Vacca Smith AM, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. Clin Oral Implants Res. 2008; 19(8): 780-5.

59. Lopes BB, Rangel RCC, Antonio CA, Durrant SF, Cruz NC, Rangel EC. Mechanical and Tribological Properties of Plasma Deposited a-C:H:Si:O Films, Nanoindentation in Materials Science, Dr. Jiri Nemecek (Ed.), ISBN: 978-953-51-0802-3, InTech, DOI: 10.5772/50278. Available from: http://www.intechopen.com/books/nanoindentation-in-materials-science/mechanical-and-tribological-properties-of-plasma-deposited-a-c-h-si-o-films, 2012.

60. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. APMIS. 2002; 110(9): 601-10.

61. Mabboux F, Ponsonnet L, Morrier J-J, Jaffrezic N, Barsotti O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials - an in vitro study. Coll Surfs B: Biointerfaces. 2004; 39(4): 199-205.

62. Mercier-Bonin M, Duviau M-P, Ellero C, Lebleu N, Raynaud P, Despax B, et al. Dynamics of detachment of *Escherichia coli* from plasma-mediated coatings under shear flow. Biofouling 2012; 28(9): 881-94.

63. Michaeli W, Telgenbüscher K, Striffler J, Leiber J, Stollenwerk M. Broad range variation in surface tension by plasma-polymerized coatings on polymethyl methacrylate. Surf Coating Tech. 1993; 59(1): 338-41.

64. Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. Infect Immun. 1985; 47(1): 11-4.

65. Moura JS, Silva WJ, Pereira T, Cury ADB, Garcia RCMR. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. J Prosthet Dent. 2006; 96(3): 205-11.

66. Nakamura K, Kanno T, Milleding P, Ortengren U. Zirconia as a dental implant abutment material: a systematic review. Int J Prosthodont. 2010; 23(4): 299-309.

67. Nascimento CD, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. Clin Oral Implants Res. 2014; 25(3): 337-43.

68. Navabpour P, Teer D, Su X, Liu C, Wang S, Zhao Q, et al. Optimisation of the properties of siloxane coatings as anti-biofouling coatings: comparison of PACVD and hybrid PACVD–PVD coatings. Surf Coat Technol. 2010; 204(20): 3188-95.

69. Nelson A, Muir BW, Oldham J, Fong Ca, McLean KM, Hartley PG, et al. X-Ray and neutron reflectometry study of glow-discharge plasma polymer films. Langmuir. 2006; 22(1): 453-8.

70. Odagiri K, Sawada T, Hori N, Seimiya K, Otsuji T, Hamada N, et al. Evaluation of denture base resin after disinfection method using reactive oxygen species (ROS). Dent Mater J. 2012; 31(3): 443–8.

71. Olsson J, CarleHn A, Burns NL, Holmberg K. Modified pellicle formation and reduced in vitro bacterial adherence after surface treatment with different siloxane polymers. Colloids Surf B Biointerfaces. 1995; 5(3): 161-9.

72. Paisoonsin S, Pornsunthorntawee O, Rujiravanit R. Preparation and characterization of ZnO-deposited DBD plasma-treated PP packaging film with antibacterial activities. Appl Surf Sci 2013; 273: 824-35.

73. Papaioannou W, Panagopoulos A, Koletsi-Kounari H, Kontou E, Makou M. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* and biofilm formation on different types of orthodontic brackets. Int J Dent. 2012; 2012: 471380. doi: 10.1155/2012/471380. Epub 2012 Jan 18.

74. Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. J Prosthodont. 2003; 12(4): 249-54.

75. Pereira-Cenci T, Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. Int J Prosthodont. 2007; 20(3): 308-10.

76. Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters MG, Williams DW. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. Clin Oral Implants Res. 2006; 17(6): 633-7.

77. 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): 1-14.

78. Quirynen M, Herrera D, Teughels W, Sanz M. Implant therapy: 40 years of experience. Periodontol 2000. 2014; 66(1): 7-12.

79. Radeva E, Pramatarova L, Pecheva E, Hikov T, Iacob E, Vanzetti L, et al. Study of organosilicon plasma polymer used in composite layers with biomedical application. AIP Conf Proc. 2010; 1203(1): 949-54.

80. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SH, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. J Dent. 1998; 26(7): 577-83.

81. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009; 35(4): 340-55.

82. Ramage G, Robertson SN, Williams C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43(2): 114-20.

83. Rangel EC, Durrant SF, Rangel RCC, Kayama ME, Landers R, da Cruz NC. Amorphous carbon nitrogenated films prepared by plasma immersion ion implantation and deposition. Thin Solid Films. 2006; 515(4): 1561-7.

84. Rangel EC, Gadioli GZ, Cruz NC. Investigations on the stability of plasma modified silicone surfaces. Plasm and Polym 2004; 9(1): 35-48.

85. Rangel RCC, Pompeu TC, Barros Jr JLS, Antonio CA, Santos NM, Pelici BO, et al. Improvement of the corrosion resistance of carbon steel by plasma deposited thin

films. Recent Researches in Corrosion Evaluation and Protection 2012; 91-116. Reza Shoja Razavi (Ed.), ISBN: 978-953-307-920-2, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/articles/show/title/improvement-of-the-corrosion-resistance-of-carbon-steel-by-plasma-deposited-thin-films, 2012.

86. Rao AP, Rao AV. Modifying the surface energy and hydrophobicity of the low density silica aerogels through the use of combinations of surface-modification agents. J Mat Sci. 2010; 45(1): 51-63.

87. Ravi N, Bukhovets VL, Varshavskaya IG, Sundararajan G. Deposition of diamond-like carbon films on aluminium substrates by RF-PECVD technique: influence of process parameters. Diam Rel Mat. 2007; 16(1): 90-7.

88. Reich M, Kümmerer K, Al-Ahmad A, Hannig C. Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): an in-situ study. Lipids. 2013; 48(9): 929-37.

89. Ricard JD, Roux D. *Candida* colonization in ventilated ICU patients: no longer a bystander! Intensive Care Med. 2012; 38(8): 1243-5.

90. Ricci M, Dorier J, Hollestein C, Fayet P. Influence of argon and nitrogen admixture in HMDSO/O_2 plasmas onto powder formation. Plasma Proc Polym. 2011; 8(2): 108-17.

91. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 2003; 11(2): 94-100.

92. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: An in vitro and in vivo study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2002; 17(6): 793-8.

93. Salihoglu U, Boynuegri D, Engin D, Duman AN, Gokalp P, Balos K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2011; 26(1):101-7.

94. Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 1980; 25(8-9): 611-5.

95. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Fernández E, Figuero E, Marín MJ, León R, et al. An in vitro biofilm model associated to dental implants: Structural and quantitative analysis of in vitro biofilm formation on different dental implant surfaces. Dent Mater. 2014; 30(10): 1161-71.

96. Santana IL, Gonçalves LM, de Vasconcellos AA, da Silva WJ, Cury JA, Del Bel Cury AA. Dietary carbohydrates modulate *Candida albicans* biofilm development on the denture surface. PLoS One. 2013 May 30; 8(5): e64645. doi: 10.1371/journal.pone.0064645. Print 2013.

97. Sardin S, Morrier J-J, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. J Oral Rehabil. 2004; 31(2); 140-8.

98. Saulou C, Despax B, Raynaud P, Zanna S, Marcus P, Mercier-Bonin M. Plasma-mediated modification of austenitic stainless steel: application to the prevention of yeast adhesion. Plasma Proc Polym. 2009; 6(12): 813-24.

99. Saulou C, Despax B, Raynaud P, Zanna S, Seyeux A, Marcus P, et al. Plasma□mediated nanosilver□organosilicon composite films deposited on stainless steel: synthesis, surface characterization, and evaluation of anti□adhesive and anti□microbial properties on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Plas Proc Polym. 2012; 9(3): 324-38.

100. 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(2): 292-6.

101. Scheinmann F. An introduction to spectroscopic methods for the identification of organic compounds. Oxford : Pergamon Press, 1970. v. 1.

102. Shenoy A, Shenoy N. Dental ceramics: An update. J Conserv Dent. 2010; 13(4): 195-203.

103. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. Clin Oral Implants Res. 2008; 19(10): 975-82.

104. Sipahi C, Anil N, Bayramli E. The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. J Dent. 2001; 29(3): 197-204.

105. Subramani K, Jung RE, Molenberg A, Hammerle CH. Biofilm on dental implants: a review of the literature. Int J Oral Maxillofac Implants. 2009; 24(4): 616-26.

106. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. Int Congr Ser. 2005; 1284: 103-12.

107. Tay LY, Jorge JH, Herrera DR, Campanha NH, Gomes BP, Andre Dos Santos F. Evaluation of different treatment methods against denture stomatitis: a randomized clinical study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2014; 118(1): 72-7.

108. Taylor R, Marian C, Verran J. Retention of oral microorganisms on cobalt–chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. J Prosthet Dent. 1998; 80(5): 592-7.

109. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009; 88(2): 105-15.

110. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. Clin Oral Imp Res. 2006; 17(Suppl 2): 68-81.

111. van Acker H, Van Dijck P, Coenye T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. Trends Microbiol. 2014; 22(6): 326-33.

112. van Brakel R, Cune MS, van Winkelhoff AJ, de Putter C, Verhoeven JW, van der Reijden W. Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an in vivo study in man. Clin Oral Implants Res. 2011; 22(6): 571-7.

113. van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1998; 11(4): 213-21.

114. Vautrin-Ul C, Boisse-Laporte C, Benissad N, Chausse A, Leprince P, Messina R. Plasma-polymerized coatings using HMDSO precursor for iron protection. Progress in Organic Coatings. 2000; 38(1): 9-15.

115. Vasudev MC, Anderson KD, Bunning TJ, Tsukruk VV, Naik RR. Exploration of plasma-enhanced chemical vapor deposition as a method for thin-film fabrication with biological applications. ACS Appl Mater Interfaces. 2013; 5(10): 3983-94.

116. Vechiato Filho AJ, Dos Santos DM, Goiato MC, de Medeiros RA, Moreno A, Bonatto LD, et al. Surface characterization of lithium disilicate ceramic after

nonthermal plasma treatment. J Prosthet Dent. 2014 Jun 11. pii: S0022-3913(14)00164-4. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.02.021. [Epub ahead of print].

117. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. J Prosthet Dent. 1997; 77(5): 535-9.

118. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. J Appl Microbiol. 2012; 112(6): 1163-72.

119. Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, et al. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2007; 81(1): 66-75.

120. Yasuda H. Plasma Polymerization, Academic Press, New York, 1985.

121. Yildirim MS, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. J Oral Rehabil. 2005; 32(7): 518-25.

122- Yildirim MS, Kesimer M, Hasirci N, Kiliç N, Hasanreisoglu U. Adsorption of human salivary mucin MG1onto glow-discharge plasma treated acrylic resin surfaces. J Oral Rehabil. 2006; 33(10): 775-83.

123. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T, et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. Mycoses 2010; 53(3): 221-6.

124. Yoshinari M, Oda Y, Kato T, Okuda K, Hirayama A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion in vitro. J Biomed Mater Res. 2000; 52(2): 388-94.

125. Yoshinari M, Wei J, Matsuzaka K, Inoue T. Effect of cold plasma-surface modification on surface wettability and initial cell attachment. World Acad Sci Eng Technol. 2009; 58: 171-5.

126. Zanini S, Massini P, Mietta M, Grimoldi E, Riccardi C. Plasma treatments of PET meshes for fuel-water separation applications. J Coll Interface Sci. 2008; 322(2): 566-71.

127. Zamperini CA, Carneiro HL, Rangel EC, Cruz NC, Vergani CE, Machado AL. In vitro adhesion of *Candida glabrata* to denture base acrylic resin modified by glow-discharge plasma treatment. Mycoses. 2013; 56(2): 134-44.

128. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, da Cruz NC. Adherence in vitro of *Candida albicans* to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2010; 55(10): 763-70.

129. Zamperini CA, Machado AL, Vergani CE, Pavarina AC, Rangel EC, Cruz NC. Evaluation of fungal adherence to plasma-modified polymethylmethacrylate. Mycoses. 2011; 54(5): e344-51.

130. Zarone F, Russo S, Sorrentino R. From porcelain-fused-to-metal to zirconia: clinical and experimental considerations. Dent Mat. 2011; 27(1): 83-96.

131. Zembic A, Bösch A, Jung RE, Hämmerle CH, Sailer I. Five□year results of a randomized controlled clinical trial comparing zirconia and titanium abutments supporting single□implant crowns in canine and posterior regions. Clin Oral implants Res. 2013; 24(4): 384-90.

132. Zhang X-Y, Huang X-B, Jiang L, Ma Y, Fan A-L, Tang B. Antibacterial property of cu modified stainless steel by plasma surface alloying. Journal of Iron and Steel Research, International. 2012, 19(4): 75-79

133. Zhao Q, Wang C, Liu Y, Wang S. Bacterial adhesion on the metal-polymer composite coatings. Int J Adhes Adhes. 2007(2); 27: 85-91.

134. Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijer R, Busscher HJ, Ren Y. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. Dent Mater. 2014; 30(7): 716-27.

Anexo

Anexo A- Parecer do CEP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA - UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das características de superfície e formação de biofilmes em materiais odontológicos tratados em plasmas de HMDSO.

Pesquisador: Ana Lucia Machado

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23957113.1.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 682.110

Data da Relatoria: 10/06/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto apresentado de forma adequada e de conformidade com as normas vigentes.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar o efeito de filmes polimerizados a plasma a partir do HDMSO nas características de superfície e na formação de biofilmes em resina acrílica, titânio e zircônia, utilizados na confecção de próteses fixas e removíveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram avaliados pelo pesquisador responsável.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto multicentro que terá a participação externa sob a supervisão dos Professores Elidiane C. Rangel e Nilson C. da Cruz (Laboratório de Plasmas Tecnológicos da UNESP - Sorocaba), nas etapas de deposição e caracterização dos filmes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios são apresentados.

Recomendações:

O projeto deverá ser apresentado no CEP do centro colaborador (UNESP-Sorocaba) após aprovação

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 **Fax:** 1633-0164 **E-mail:** cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA - UNESP

no CEP local (FOAr).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a declarar.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 10 de junho de 2014.

ARARAQUARA, 10 de Junho de 2014

Assinado por:
Mauricio Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 **Fax:** 1633-0164 **E-mail:** cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

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

Araraquara, 23 de março de 2015.
AMANDA FUCCI WADY