

**CECÍLIA ALVES DE SOUSA**

**“Efeito da vedação da interface pilar/implante na  
formação de biofilmes isolados e mistos de *Candida  
albicans* e *Enterococcus faecalis* nas junções parafusadas”**

Araçatuba – São Paulo

2018

**CECÍLIA ALVES DE SOUSA**

**“Efeito da vedação da interface pilar/implante na formação de biofilmes isolados e mistos de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* nas junções parafusadas”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia - Área de concentração em Implantodontia.

**Orientador: Prof. Adj. Wirley Gonçalves Assunção**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Ass. Cristiane Duque**

Araçatuba – São Paulo

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S725e Sousa, Cecília Alves de.  
Efeito da vedação da interface pilar/implante na formação de biofilmes isolados e mistos de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* nas junções parafusadas : vedação da interface pilar/implante na formação de biofilmes em junções parafusadas / Cecília Alves de Sousa.. – Araçatuba, 2018  
76 f. : il.

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

Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção

Orientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Implantes dentários 2. Biofilmes 3. Prótese dentária  
4. Torque I. T.

Black D7  
CDD 617.64

## *Dados curriculares*

CECÍLIA ALVES DE SOUSA

NASCIMENTO 24/05/1992 – BOM DESPACHO – MG

FILIAÇÃO Maria Célia de Oliveira

Jarbas de Sousa Silva

2011/2015 Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”.

Araçatuba, São Paulo, Brasil.

2015/2015 Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia cirúrgica

Instituto Especializado em Saúde Odontológica (IES)

Bauru, São Paulo, Brasil

2016/2018 Curso de pós-graduação em Odontologia, área de concentração em  
Implantodontia, nível mestrado.

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”.

Araçatuba, São Paulo, Brasil.

## *Dedicatória*

Aos meus pais, **Jarbas de Sousa Silva** e **Maria Célia de Oliveira**, por nunca terem medido esforços para que meus objetivos e sonhos fossem alcançados. Por serem o meu maior referencial de amor. Por serem o meu porto seguro onde eu sempre busco forças quando minhas fraquezas são maiores que minha vontade de vencer. Tenho a certeza de que serão sempre meu refúgio e o meu amor incondicional. A vocês, dedico todo meu trabalho.

## *Agradecimentos especiais*

*A Deus,*

*“Peço-te que sejas a minha rocha de refúgio, para onde eu sempre possa ir; dá ordem para que me libertem, pois és a minha rocha e a minha fortaleza.” Salmo 71:3*

Foi nesta Rocha que findei meus sonhos, pensamentos, angústias e alegrias durante estes dois anos de mestrado. Por isso, primeiramente agradeço a **Deus**, Aquele que é a força maior que rege minhas atitudes. Durante todo esse tempo, nos momentos em que me perdi, foi no Senhor que me achei e me senti renovada para continuar esta trajetória. Essa força de vontade vem de Ti, pois sabes de todos os meus sonhos e os entrego integralmente à Sua vontade. Encheu minha vida de pessoas especiais, me fez filha em uma família que somente o Senhor, com o verdadeiro amor de um Pai, poderia ter escolhido para mim. Me fez amada e um ser humano especial me concedendo os dons da vida e da inteligência. O Senhor me proporcionou experiências incríveis que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente nestes últimos dois anos, por isso agradeço por nunca ter me abandonado nos momentos de provação. Obrigada pela companhia e proteção em cada quilômetro percorrido nestes 7 anos de estrada entre Minas Gerais e São Paulo, somente com o Senhor ao meu lado seria possível suportar tamanha saudade e dificuldades. Ao Senhor agradeço, dedico e entrego todo o meu trabalho.

### *À minha mãe, Maria Célia de Oliveira*

Difícil expressar tudo o que sinto por você, minha admiração pela mulher incrível que eu tenho o orgulho de chamar de mãe, minha eterna gratidão por tudo o que fez e faz por mim e pela minha educação. Eu sei que não deve ter sido fácil me deixar em uma cidade tão longe há alguns anos atrás quando decidi estudar odontologia em Araçatuba. E sei que ainda não é. A senhora nunca se deixou abalar, para não me abalar, para que eu pudesse seguir de onde eu estava. Mas no momento em que vim para esta universidade, ficou decidido que este momento de hoje se concretizaria e muitos outros que ainda virão. Deus escreve nossa história sem que, na nossa pequenez, sejamos capazes de entender, mas tenho a certeza de que ela terminará com um final muito feliz. Sempre pensei na senhora, sempre busquei te fazer feliz e te encher de orgulho, sempre zelei pela educação que me deu como forma de agradecimento a tudo que faz por mim. E só tenho a agradecer pelo amor incondicional, pela vela acesa à mim, pela oração, pela insistência em mim quando eu mesma não insisti e por nunca duvidar do meu potencial. Se hoje voou mais alto, sei que foi pela senhora. Meu eterno amor e gratidão!

### *Ao meu pai, Jarbas de Sousa Silva*

Se existe alma gêmea, o senhor é a minha. É meu exemplo, meu estímulo, a minha calma, meu orgulho e minha felicidade. Nem se eu vivesse dez vidas, eu seria capaz de conseguir retribuir tudo o que o senhor fez e faz por mim e por toda família. Um homem com uma profissão difícil, desvalorizada no nosso país e ainda assim, com insistência em fazer um trabalho bem feito, isso é sinônimo de comprometimento e caráter. Tenho muito orgulho da história que escreveu com muito esforço, estudo e trabalho, por isso me espelho incessantemente no senhor. Quando decidi fazer o mestrado há 2 anos atrás, sei da felicidade e orgulho que sentiu, mas sei também que a saudade aperta cada dia a mais que passo longe do senhor. Saiba que essa saudade é recíproca e infinita, mas é muito acalentador saber que seu colo estará sempre me esperando e que quando eu voltar para casa, terei seu abraço longo e apertado. Um homem que carrega uma fé inabalável, insuperável e transparente. Se algum dia em minha vida eu conseguir ser o mínimo do ser humano bondoso, caridoso, humilde e temente à Deus que é, somente com isso já me sentirei realizada. Muito obrigada por ser o melhor pai do mundo, por sonhar os meus sonhos junto comigo e fazer o possível para que eles se tornem realidade! O eterno e maior amor da minha vida! Te amo muito!

*Aos meus irmãos,*

**Philipe Alves de Oliveira e Silva**, o irmão mais velho que toda irmãzinha gostaria de ter! Sempre preocupado, responsável e disposto por todos nós. Muito obrigada por ser meu apoio e incentivo na continuação desta caminhada da minha formação profissional. Sem você, com certeza tudo na minha vida teria sido muito mais difícil. Me lembro que quando eu estudava para os vestibulares fazendo cursinho, certa vez você me esperava até muito tarde da noite na porta da escola e me disse “espero que você faça tudo valer à pena”, eu espero estar fazendo valer à pena, pois nem eu mesma naquele dia imaginei estar chegando onde estou. Obrigada por tudo e por ter me dado uma “irmã mais velha”, **Marília**, que é um reflexo do seu amor e da sua postura. Amo você!

**Letícia Alves de Sousa**, a irmã que supera a tudo e a todos e que só surpreende com tanta dedicação, estudo e força de vontade. Obrigada por ser um estímulo à mais para mim, não é nada fácil ser irmã mais velha, mas espero ser um bom exemplo para você. Obrigada por ser meu lado alegre, sereno, tranquilo e por completar tudo o que falta em mim. Amo você!

**Arthur Alves de Oliveira e Silva**, obrigada por ser a alegria da casa, especialmente a minha alegria quando volto para casa. Há sete anos atrás você era só uma criança e hoje vejo você com o dobro da minha altura e já entrando para faculdade. Você foi o único filho que restou em casa e sei que não deve ter sido fácil ficar sozinho depois de ter convivido a vida toda em uma família grande, ver seus irmãos seguindo rumo da vida em outras cidades, se despedindo em cada partida e sentindo falta da companhia rotineira. Muito obrigada pela compreensão, carinho e por ser um exemplo para mim de inteligência, versatilidade e verdade. Amo você!

*Aos meus familiares,*

Minha avó **Ana Alves de Oliveira**, obrigada por ser um exemplo para mim de mulher guerreira e que ama com todas as forças a família que construiu. Tenho muito orgulho em ser sua neta e poder ter a honra de conviver com um ser humano tão maravilhoso como a senhora. Te amo muito!

Meu avô **João George de Sousa Silva**, um homem que o sobrenome a vida toda foi trabalho. Construiu uma família com base no suor e esforço, foi esse prelúdio que me deu base para que eu estivesse aqui hoje e finalizasse meu mestrado. Obrigada por ser exemplo de

homem íntegro e com uma história tão bonita. Tenho muito orgulho de ser sua neta. Te amo muito!

A todos os **meus tios, primos e demais familiares**. Tenho muita sorte em fazer parte de uma família grande, feliz e unida. Agradeço pelo apoio, por compreenderem minha ausência e pela alegria dos reencontros! Cada um de vocês tem uma parte muito importante na minha história e na minha formação como ser humano. Amo muito vocês.

*Ao meu namorado, Gustavo Antônio Correa Momesso*

Você é, com certeza, um dos maiores pilares que Deus colocou em minha vida. Que sorte a minha ter como namorado meu melhor amigo, meu maior companheiro e cúmplice. Já são sete anos em Araçatuba e quase seis deles, foi com você ao meu lado em todos os momentos. Quantas águas já passaram por baixo de nossa ponte, quantas pontes vimos cair e ainda continuamos aqui, nos apoiando um no outro. Você é aquele que viu de pertinho meu crescimento, que me impulsiona a ser melhor todos os dias e principalmente, meu exemplo de determinação e dedicação. Se existe uma palavra que nos define, esta palavra é soma. Soma de amor, de cumplicidade e companheirismo pessoal e profissional. Obrigada pelo respeito, por completar minha vida e por nunca medir esforços para me ajudar. Obrigada por despertar em mim meus melhores sentimentos, por me enxergar melhor do que eu sou, por me ensinar e incentivar todos os dias a ser um ser humano melhor. Deus acertou em cheio, e continua acertando em tudo o que planejou para nós. Te amo muito!

*Ao meu orientador, Prof. Wirley Gonçalves Assunção*

Só tenho a agradecer por ser um exemplo de profissional e ser humano para mim. Agradeço imensamente por desde o início do mestrado ter confiado em minha capacidade, por ter me dado a liberdade de me expressar, compartilhar ideias e por dedicar parte de seu tempo para o meu crescimento. Nada na vida é por acaso e tenho a certeza de que não foi o acaso que me colocou como sua orientada, nestes dois anos aprendi mais do que jamais imaginei como pesquisadora e clínica. Tenho muita admiração pela sua postura íntegra, um homem de família, dono de um caráter enorme e um orientador com a capacidade de entender e se moldar à cada orientado que passa em suas mãos. Me mantive motivada a continuar seguindo o caminho da pós-graduação pela excelente orientação que tive, pela confiança a mim depositada, pelas palavras de motivação e principalmente, por sempre ter tido o reconhecimento do meu trabalho e dedicação por sua parte. Finalizo este mestrado muito feliz, com a certeza de que convivi e

aprendi com um grande profissional e com muito orgulho de ter aprendido a ser mestre com um grande professor. Muito obrigada por tudo!

*A minha coorientadora, Profa. Cristiane Duque*

Agradeço por ser a pessoa responsável pela minha ingressão no mundo científico. Minha primeira orientadora, ainda na iniciação científica. Sou muito grata por ter aceitado ser minha coorientadora em outra área durante a graduação e depois na pós-graduação. E principalmente, obrigada por ter me dado a oportunidade de me apaixonar pela microbiologia. Não consigo imaginar o quanto foi difícil para uma odontopediatra se aventurar pela área da implantodontia e estudar um pouco sobre implantes e componentes protéticos. Por isso, agradeço muito pela dedicação com este estudo, por ter me estimulado para que ele fosse concluído com excelência e por ter aberto as portas do laboratório para uso, bem como diversos materiais e equipamentos. Tenho a senhora como um grande exemplo de profissional, conciliando seu tempo como cirurgiã-dentista, professora, pesquisadora, mãe e sempre tão dedicada a seus alunos. Espero um dia, ter um pouco da competência que sempre observo na senhora. Muito obrigada por tudo!

*Aos professores,*

Agradeço imensamente ao querido amigo, **Prof. Leonardo Perez Faverani**. Uma das minhas inspirações no ingresso na área de implantodontia e também uma inspiração de carreira. Admiração que já vem de muitos anos, desde a convivência no laboratório de prótese no seu tempo de pós-graduação e no meu enquanto aluna de iniciação científica. Admiração esta que só aumenta com o passar do tempo e se une à alegria de poder compartilhar momentos de felicidade e vitórias. Fico muito feliz em poder ter sua amizade e por saber que posso sempre contar com você em todos os momentos. Um verdadeiro amigo. Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo o que fez e faz por mim desde o início da minha trajetória, pelos ensinamentos e pelas oportunidades a mim confiadas. Muito obrigada pela indicação do meu nome ao mestrado e pela confiança que possui em mim. Você é um exemplo de ser humano e profissional, o qual tenho o prazer de conviver e aprender! Muito obrigada, Léo!

Ao querido **Prof. Paulo Henrique dos Santos**. Não tenho palavras para descrever o quanto sua pessoa foi importante na minha formação clínica nestes dois anos, principalmente na disciplina de reabilitação oral. Um verdadeiro professor. Aquele que com muita humildade e infinita sabedoria, tem a o dom para a docência. É impossível estar em sua presença e não

aprender. Muito obrigada pela dedicação, educação e paciência em me ensinar. Se hoje sei um pouco sobre prótese e planejamento protético, tenho a certeza que foi porque tive um grande mestre ao meu lado. Talvez não tenha sido sua intenção, mas com o senhor aprendi a ser mais humana, mais madura na minha profissão e acreditar mais no meu potencial enquanto cirurgiã-dentista. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de conviver estes momentos e por sempre me proporcionar aprendizado de excelência. Ao senhor, minha grande admiração e gratidão!

Ao **Prof. Alberto Botazzo Delbem**, por ter aberto as portas do laboratório de pesquisa do departamento de odontopediatria para que fosse possível a realização deste trabalho. Por ser um exemplo de pesquisador e por ser sempre tão solícito à minha pessoa. Muito obrigada!

*Às minhas amigas,*

Minha parceirinha **Denise de Toledo Rós**. Foi com você que dividi muito mais do que um teto, dividi minhas angústias, prazos apertados e reclamações da vida de pós-graduação. Você tem o dom de manter as coisas suaves e fazer tudo parecer ser menor e mais alegre. Obrigada pelos “bons dias” e “boas noites” de todos os dias quando eles não eram tão bons assim, por sempre estar por mim em todos os momentos e por ser sempre o lado mais leve do nosso lar. Você fez tudo ser muito mais fácil e tranquilo, poderia ter sido muito diferente. Tenho grande admiração pelo seu amor ao que faz e por abraçar a Saúde Coletiva com tanto carinho, tenho certeza que essa dedicação te levará muito longe! Amo você e obrigada por tudo, parcinha!

A professorinha **Carla Ikuta**. Obrigada por ter chegado no momento em que não estávamos lhe esperando e por ter ficado durante o tempo necessário para que sentíssemos sua falta. Obrigada por sempre trazer o equilíbrio na medida certa para que saíssemos da rotina e depois ir embora deixando muita alegria.

Às Wirlletes, **Camila Berbel Seloto** e **Carolina Danielleto Zana**. Impossível não lembrar de vocês e da importância que vocês tiveram neste projeto. Desde o início me acolheram e me fizeram sentir parte de um grupo, que se ajuda, compartilha ideias, enxuga as lágrimas uma da outra e principalmente, nos faz não desistir de seguir em frente. Muito obrigada por cada conselho, cada aprendizado e histórias de vida compartilhada. Sinto muita falta da convivência diária e da salinha cheia da alegria de vocês. **Ca**, obrigada por ser exemplo de humildade e superação, você é dona de um coração enorme e ver seu crescimento de perto foi

muito inspirador. **Carol**, você é um exemplo de trabalho, inteligência e sua conduta detalhista e minuciosa é admirável! Obrigada por sempre estar à disposição para me ajudar em tudo o que precisei nos experimentos de corrosão, nada teria sido possível sem sua ajuda. Muito obrigada por tudo, meninas! Vocês serão sempre lembradas por mim!

*Ao colega de pós-graduação, Jadison Júnio Conforte*

Obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Nesta reta final, você foi peça fundamental para que tudo fosse entregue dentro do prazo necessário. Sei que foram muitas horas, dias e finais de semana de trabalho, mas espero que eu tenha colaborado de alguma forma para o seu aprendizado e estimulado para a execução do seu mestrado. Pode contar sempre comigo!

*Aos colegas do laboratório de microbiologia,*

**Karina Caiaffa, Vanessa Rodrigues, Jesse Augusto, Isabela Catanoze, Gabriella Costa, Bruno Guandalini Cunha, Thayse Hosida, Thamires Cavazana, Laís Arias e Ana Paula Miranda.** Obrigada pela parceria e compreensão de todos vocês. Somente quem se propõe a fazer experimentos com microbiologia sabe o quanto é importante ter companheiros e com certeza, vocês foram os melhores que eu poderia ter tido. Sem a ajuda de vocês seria tudo mais difícil, as horas de trabalho passariam mais devagar e os momentos de dificuldade seriam mais penosos. Muito obrigada pelos momentos de descontração e aprendizado!

*Em especial,*

**Karina Caiaffa**, muito obrigada pela ajuda no início deste projeto durante os pilotos. Você foi essencial para que esta metodologia funcionasse e pude aprender bastante com você. Obrigada por ter disposto um pouco do seu tempo para me ajudar. Muito obrigada por tudo, fofix!

A **todos os professores e colegas do departamento de odontologia infantil e social** pelo acolhimento e companhia. Sempre me sinto muito à vontade no departamento por estar rodeada de pessoas agradáveis, receptivas e que seguem incansavelmente horas a fio de muito trabalho e dedicação. Obrigada pela ajuda sempre solícita na utilização dos equipamentos, pelo conhecimento científico compartilhado, companhia nos feriados, finais de semana e horários prolongados à noite.

*Em especial,*

**Mariana Nagata**, pela ajuda ao utilizar o aparelho de rugosímetro e a embutidora. Muito obrigada por ser sempre tão solícita, divertida e sempre ajudar com muita boa vontade.

*As pauletes, Ana Teresa Malufy e Bruna Reis*

Ainda bem que pude ter o prazer de conviver um pouquinho com vocês! Obrigada por serem sempre tão amigas e por não medirem esforços para me ajudar em todos os momentos que precisei. Vocês me acolheram desde o início e pude ter a oportunidade de conhecer vocês melhor e observar o quanto respeitam o trabalho realizado por vocês. O amor que vocês depositam na pós-graduação e ao grupo de pesquisa de vocês é admirável! **Bru**, obrigada por ser um doce de pessoa, por compartilhar histórias e momentos que muito já me incentivaram e por ser exatamente como você é, uma pessoa meiga e diva. **Ana**, muito obrigada por ser uma inspiração, não tenho palavras para agradecer o tempo dedicado para uma ajuda, uma fotografia a ser tirada e auxílio com meus pacientes! Muito obrigada, meninas!

*Aos alunos de iniciação científica,*

**Tamires Matos Chiquito, Allan Oliveira, Maria Beatriz Taborda e Rafaela Laruzo**. Muito obrigada por me darem a chance de ajudar vocês com um pouco do meu conhecimento. Vocês também fizeram parte do meu crescimento!

*Aos melhores amigos que eu poderia ter levado da minha graduação,*

**Camila Ambrósio Dias, Caio Vinicius Debortoli, Denise Rós, Emilie Vinventin, Fred Lucas Pinto e Lidiane Mendes Louzada**. Estes dois anos foram muito mais alegres sabendo que vocês estavam aqui comigo! Obrigada pela amizade sempre muito incondicional, pela ajuda nos momentos difíceis e por me deixarem participar da vida de vocês. Vê-los crescer junto comigo é uma dádiva e sou muito grata à Deus por ter colocado vocês no meu caminho.

*À minha amiga de longa data,*

**Izabella Cecília de Lima e Silva**. É difícil perceber quando uma amizade é verdadeira. Com você sempre foi muito fácil. Obrigada pela admiração mútua, por torcer e se orgulhar de mim, não existe felicidade maior do que descobrir um amigo assim na vida e você com certeza é única e extremamente especial para mim. Muito obrigada por sempre

compartilhar cada momento da minha vida assim, com felicidade e com um bem querer tão grande! Sou muito feliz e grata pela sua amizade! Amo você!

*Aos funcionários,*

À secretária do Departamento de Prótese e Materiais Dentários, **Magda Requena**, pela alegria e competência com que se dedica ao trabalho no departamento. Não houve uma vez que uma ajuda ou um café não tivesse sido atendido. Você faz toda diferença no departamento. Uma pessoa ímpar.

Ao funcionário do Departamento de Odontopediatria **Ricardo**, pela ajuda com os equipamentos e auxílio no laboratório. Muito obrigada!

Aos **Professores da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Osvaldo Magro Filho, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Avila Campos e Leonardo Perez Faverani**, por serem meu referencial dentro da implantodontia.

Aos **Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese (Daniela Micheline dos Santos, Aldiéres Alves Pesqueira, Aimée Maria Guiotti, Marcelo Coelho Goiato, Adriana Zavaneli, Karina Helga Turcio de Carvahó, Eduardo Passos Rocha, Paulo Renato Junqueira Zuim, Fellipo Ramos Verri, Humberto Gennari Filho, Eduardo Piza Pellizzer e Débora de Barros Barbosa)**, pelo convívio no departamento e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos e colegas que fiz durante a pós-graduação, **Arthur Bruno Pereira Cavalcanti, Jéssica Marcela de Luna Gomes, Marcela Borghi, Murilo César Junior, Jéssica Figueira, Saygo Tomo, Fred Lucas Pinto, Breno Sendão Alves, João Martins de Melo Neto, Daniela Sá, Martin Adriazola, Fábio Roberto Souza Batista, Gabriel Mulirari, André Hergesel de Oliva, Ciro Duailibe, Caio Vinicius Debortoli e Morganna Almeida**. E aos pós-graduandos **Erik Neiva, William Phillip, Henrico Strazzi, Hiskell Fernandes, Tarik Polo, Valthierre Nunes**. Obrigada pela oportunidade de aprender com vocês!!

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – DS)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante os dois anos do curso. Meus sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e assim permitir a realização do mestrado.

## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa do seu Diretor, **Professor Wilson Roberto Poi** e ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia**, na pessoa do coordenador **Professor André Luiz Fraga Briso**, pelo acolhimento e oportunidade de realização do curso de Mestrado. Agradeço pelo empenho e dedicação para o crescimento do Programa e Pós-graduação em Odontologia da FOA.

À **DSP Biomedical**, empresa que tornou possível a realização deste trabalho, através da parceria e doação dos espécimes de todas os implantes. O nosso país é carente de empresas que se dediquem ao estímulo da pesquisa e desenvolvimento científico, vocês são um grande exemplo.

Ao **Prof. Luís Augusto Rocha**, do Departamento de Física da Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP por ceder o espaço para uso do microscópio de eletrônico de varredura da instituição e ao pós-graduando **Fábio**, pelo atenção e tempo dispensado para execução desta análise.

Ao **prof. Valentim Adelino Ricardo Barão**, pelo suporte na execução do meu projeto de Exame Geral de Qualificação na UNICAMP em Piracicaba e ao seu orientado **Jairo Cordeiro**, pela dedicação com que me ajudou e me ensinou sobre corrosão. Fico muito feliz em ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com vocês.

A todos os **funcionários e técnicos de prótese** do departamento de Prótese e Materiais Dentários por sempre serem solícitos e dispostos a ajudar e pela convivência agradável.

Às **funcionárias da Pós-graduação: Valéria de Queiroz Marcondes Zagato, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada**, pela disponibilidade e gentileza em ajudar.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela disponibilidade e atenção.

## *Epígrafe*

*“Vitória não é para quem quer,  
mas para quem luta, persevera e jamais desiste.  
A vitória vem para aqueles que mesmo cansados seguem lutando,  
mesmo em circunstâncias difíceis seguem acreditando  
e que mesmo tudo sendo contrário seguem crendo que Deus  
está no controle. A vitória é desejo de muitos,  
mas troféu para poucos, pois muitos se entregam ao cansaço,  
outros desistem pelo caminho, mas somente os que tem  
Fé continuam, não por serem mais fortes,  
mas por ter um Deus forte ao seu favor.”*

*(Autora: Yla Fernandes)*

Sousa, C.A. **Efeito da vedação da interface pilar/implante na formação de biofilmes isolados e mistos de *C. albicans* e *E. faecalis* nas junções parafusadas** [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

## *Resumo*

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia do material Loctite 2400<sup>®</sup> como de agente de vedação no selamento da interface pilar/implante contra a infiltração e formação de biofilmes isolados e mistos de *C. albicans* e *E. faecalis* no interior de conexões protéticas HE e CM. Foram formados 216 conjuntos de implantes com seus pilares protéticos e parafusos de retenção. Deste total, foram formados 6 grupos (n=36) de acordo com cada biofilme em função do período de incubação (7 e 14 dias) e conexão de implantes HE e CM (n=18) divididos em função do uso do material (n=9). Os biofilmes foram analisados por meio da contagem UFC/ml. Para análise qualitativa do biofilme misto formado aos 7 dias, foi realizada MEV. A análise do agente de vedação nas junções parafusadas foi realizada por meio de fotografias de conjuntos seccionados. Para comparar as médias dos dados de contagem das UFC/mL para os ensaios de biofilme isolado de *E. faecalis* e *C. albicans*, os dados foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni considerando ( $\alpha=5\%$ ). E para biofilme misto, foi utilizado o teste *t Student*. A contagem UFC/ml isolado de *E. faecalis* e *C. albicans*, apresentou diferença estatística significativa de todos os grupos teste em relação ao controle, em todos os períodos de tempo. Para biofilme misto, não houve crescimento microbiano nos grupos HE, independente do microrganismos e período de tempo avaliado. Nos grupos CM, para *E. faecalis*, houve diferença estatística entre os grupos CM-C e CM-T somente no período de 14 dias. Para *C. albicans*, observa-se diferença estatística significativa entre os grupos CM-C e CM-T independente do período avaliado. A análise de MEV, mostra a formação de biofilme espesso com grande quantidade de matriz extracelular para os grupos controle. E a análise visual do agente de vedação, mostra a presença do material na interface pilar/implante e nas roscas da

junção parafusada. Conclui-se que a presença do agente de vedação interferiu positivamente na infiltração de biofilmes isolados de *E. faecalis* e *C. albicans* para o interior dos implantes independente do período de tempo avaliado. Para biofilmes mistos, a conexão hexagonal externa foi mais eficaz contra a infiltração microbiana, independente do microrganismo, tempo e uso do agente de vedação. Para a conexão cone Morse, o agente de vedação foi eficaz apenas no período de 14 dias.

**Palavras-chave:** Implante Dentário, Biofilmes Bacterianos, Prótese Dentária Fixada por Implante

Sousa, C.A. **Effect of the interface of the abutment / implant interface on the formation of isolated and mixed biofilms of *C. albicans* and *E. faecalis* on screw joints.** [Dissertation].

Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2018.

## *Abstract*

The aim of this research was to evaluate the efficacy of sealing agent in the interface abutment/implant against infiltration of isolated and mixed biofilms of *C. albicans* and *E. faecalis* inside EH and MT prosthetic connections. 216 sets of implants with their prosthetic abutments and retaining screws were formed. Of this total, were formed six groups (n = 36) in accordance with each biofilm as function of the incubation period (7 and 14 days) and implant connection EH and MT (n = 18) stratified by use of the material (n = 9). The biofilms were analyzed by counting UFC/mL. For qualitative analysis of the mixed biofilm the SEM analysis was performed at 7 days. The analysis of the sealing agent in the screw joints was performed by photographs of the sectioned sets. To compare the average UFC/mL count data of *E. faecalis* and *C. albicans* isolated biofilms, the data were analyzed by two-way ANOVA test followed by Bonferroni test ( $\alpha = 5\%$ ). For mixed biofilms it was applied *t* Student test. The UFC/mL isolated count for *E. faecalis* and *C. albicans* presented statistically significant difference of all the test groups in relation to the control, in all time periods. For mixed biofilm, there was no microbial growth in EH groups, independent of microorganisms and time period evaluated. In MT groups, for *E. faecalis*, there was statistical difference between MT-C and MT-T groups only in the period of 14-days. For *C. albicans*, statistically significant difference was observed between the groups MT-C and MT-T independent of the period evaluated. The SEM analysis shows the formation of thick biofilm with a high amount of extracellular matrix for control groups. The visual analysis of the sealing agent shows the presence of the material at the abutment/implant interface and the threads of the screw joint. It was concluded that the presence of the sealing agent interfered positively in the infiltration of isolated biofilms of *E. faecalis* and *C. albicans* into the implants regardless of the time period evaluated. For mixed biofilms, the external hexagonal connection is more effective against microbial infiltration, regardless of the microorganism, time and use of the sealing agent. For Morse taper connection, the sealing agent was effective only over the 14 day period.

**Key-words:** Dental implants, Biofilms, Dental prosthesis

## *Lista de Figuras*

- Figura 1:** Organograma ilustrativo da divisão dos grupos de estudo. **29**
- Figura 2:** Embalagem do material avaliado Loctite® 2400™ (Henkel Ltda, Düsseldorf, Germany) **30**
- Figura 3:** Composição do agente de vedação Loctite® 2400™ **30**
- Figura 4:** Características do agente de vedação Loctite® 2400™ (Catálogo Henkel®) **31**
- Figura 5:** Informações toxicológicas dos componentes do agente de vedação Loctite® 2400™ **32**
- Figura 6:** Inserção do meio de cultura no interior do implante **34**
- Figura 7:** A: Aplicação do material na porção hexagonal do implante HE; B: Aplicação do material na porção rosqueada do parafuso de conexão; C: Aplicação na porção indexadora do pilar protético CM. **35**
- Figura 8:** Implante no interior do tubo Falcon contendo a solução de meio de cultura com microrganismo. **35**
- Figura 9:** A: Implante sendo limpo externamente por gaze embebida em álcool 70%; B: solução salina sendo inserida no interior do implante; C: Material coletado do interior do implante sendo diluído em solução salina para plaqueamento; D: Plaqueamento em meio de cultura ágar do material diluído que foi coletado do interior do implante. **37**
- Figura 10:** Média (desvio-padrão) da contagem da UFC/ml (em escala logarítmica) de *E. faecalis* para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo, de acordo com os testes de Tukey, considerando  $p \leq 0,05$ . **39**
- Figura 11:** Média (desvio-padrão) da contagem da UFC/ml (em escala logarítmica) de *C. albicans* para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo, de acordo com os testes de Tukey, considerando  $p \leq 0,05$ . **40**
- Figura 12:** Média (desvio-padrão) da contagem da UFC/ml (em escala logarítmica) de *E. faecalis* e *C. albicans* após isolados durante o plaqueamento para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo, de acordo com os testes de Tukey, considerando  $p \leq 0,05$ . **41**
- Figura 13:** Imagens das micrografias obtidas através da MEV dos pilares UCLA para implante cone Morse na presença de biofilme misto aos 7 dias. A: Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-C. B: Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-T. C: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-C. D: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. E: Magnificação

1000X do biofilme formado no pilar do grupo CM-C. F: Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. Forma circular indica a presença do agente de vedação. Formas quadrangular indica o local de aproximação da imagem. Seta indica a presença de biofilme

43

**Figura 14:** Imagens das micrografias obtidas por meio da MEV dos implantes cone Morse na presença de biofilme misto aos 7 dias. A: Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-C. B: Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-T. C: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-C. D: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. E: Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo CM-C. F: Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. Forma retangular indica o local de aproximação. Setas indicam alguns microrganismos dispersos.

45

**Figura 15:** Imagens das micrografias obtidas através da MEV dos pilares UCLA para implante hexágono externo na presença de biofilme misto aos 7 dias. A: Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-C. B: Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-T. C: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-C. D: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-T. E: Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo HE-C. F: Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-T. Forma retangular indica o local de aproximação. Setas indicam a presença de biofilme.

47

**Figura 16:** Imagens das micrografias obtidas por meio da MEV dos implantes hexágono externo na presença de biofilme misto aos 7 dias. A: Parte indexadora do pilar protético do grupo HE--C. B: Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-T. C: Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-C. D: Magnificação de 100X da região demonstrando a superfície do pilar do grupo HE-T. E: Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo HE-C. F: Magnificação de 1000X da região do pilar do grupo HE-T. Formas retangulares indicam o local de aproximação. Forma circular indica a presença de biofilme.

49

**Figura 17:** Imagens fotográficas dos cortes longitudinal do longo eixo dos espécimes CM-C e CM-T, no qual é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada.

50

**Figura 18:** Imagens fotográficas dos cortes longitudinal do longo eixo dos espécimes CM-C e CM-T em maior aumento, no qual é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada. **51**

**Figura 19:** Imagens fotográficas dos cortes coronais do longo eixo dos implantes HE-C e HE-T onde é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada **52**

**Figura 20:** Imagens fotográficas em maior aumento dos cortes coronais do longo eixo dos implantes HE-C e HE-T onde é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada **53**

## *Lista de abreviaturas*

HE = Hexágono Externo

CM = Cone Morse

FC= Pilar *flexcone*

UCLA = *Universal Cast To Long Abutment*

*Candida albicans* = *C. albicans*

*Enterococcus faecalis*= *E. faecalis*

*Pseudomonas aeruginosa* = *P. aeruginosa*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* = *A. actinomycetemcomitans*

HE-C = Hexágono externo controle

CM-C = Cone Morse controle

HE-T = Hexágono externo teste

CM-T = Cone Morse teste

μL= microlitro

n= Número

N = Newton

N/cm = Newton por centímetro

mL = Mililitro

μl = Microlitros

% = Símbolo matemático de porcentagem

°C = grau Celsius

g= unidade de medida de massa (grama)

T= Teste

C= Controle

Min = Símbolo de minutos

MEV = Microscópio eletrônico de varredura

## *Sumário*

<b>Introdução</b> .....	23
<b>Objetivo</b> .....	28
<b>Hipótese</b> .....	28
<b>Materiais e método</b> .....	29
<b>Análise estatística</b> .....	38
<b>Resultados</b> .....	39
<b>Discussão</b> .....	54
<b>Conclusão</b> .....	61
<b>Referências</b> .....	62
<b>Anexos</b> .....	70

## *Introdução*

Numerosos estudos têm relatado altas taxas de sucesso no tratamento com implantes dentários. Entretanto, diversas complicações podem ocorrer durante e após o período de osseointegração, podendo levar à perda do implante. (Berglundh, Persson et al. 2002, Pjetursson, Tan et al. 2004) Uma das causas de falha dos implantes é o aumento da prevalência de infecções peri-implantares, que se configura por uma doença multifatorial, imuno inflamatória que afeta os tecidos de sustentação do implante, levando à perda de tecido ósseo adjacente (Swierkot, Lottholz et al. 2012).

Apesar das diferenças histológicas e estruturais existentes entre os dentes e os implantes, é possível observarmos similaridades clínicas no que diz respeito às doenças que acometem o tecido periodontal. O processo de inflamação nos tecidos de sustentação, a formação de bolsas profundas e reabsorção óssea exemplificam estas similaridades (Schou 2008, Akcali, Trullenque-Eriksson et al. 2017). Além disso, os fatores de risco da doença também se assemelham, tais como idade, tabaco e o nível de higiene do portador (Akcali, Trullenque-Eriksson et al. 2017). Dessa forma, o histórico periodontal pode também ser considerado um fator de risco para a doença. Schou (2008) por meio de uma revisão sistemática, mostram um aumento na incidência de peri-implantite e aumento da perda óssea em pacientes que perderam elementos dentais em função da doença periodontal e foram reabilitados com implantes. Da mesma forma, Safii, Palmer (2010) e Akcali, Trullenque-Eriksson (2017) demonstraram por meio de uma meta-análise que pacientes com peri-implantite apresentam maior índice de falha nos implantes e maior perda óssea marginal do que indivíduos periodontalmente saudáveis.

Estes fatos sugerem que os microrganismos causadores da doença periodontal poderiam migrar e colonizar sítios peri-implantares. Alguns autores, demonstram que os patógenos causadores da doença periodontal/peri-implantar são mais frequentemente encontrados em sítios de dentes adjacentes ou próximos ao implante (Quiryneen, Vogels et al. 2006, Cortelli, Cortelli et al. 2013). Isso mostra que o desenvolvimento da microbiota subgingival está diretamente relacionado com a influência da microbiota supragingival. Esta informação corrobora com outros estudos onde esta mesma correlação foi encontrada nos indivíduos totalmente desdentados, pois mesmo após a perda da estrutura dentária os autores mostraram que as espécies de microrganismos relacionados com a doença periodontal ainda

estavam presentes na cavidade bucal, tecido mole e até mesmo no osso alveolar (Cortelli, Aquino et al. 2008) (Fernandes, Aquino et al. 2010).

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) é um dos microrganismos encontrados em tecido ósseo em casos de peri-implantite e periodontite. (Canullo, Rossetti et al. 2015, Flanagan 2017) Classificada como bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, comensal, esférica e que geralmente reside no trato gastrointestinal. Devido à sua capacidade de se transformar em uma forma vegetativa, *E. faecalis* pode existir sem causar sinais ou sintomas de doença. Uma osteotomia em um sítio edêntulo desperta a forma vegetativa (Flanagan 2017). Quando um implante dentário é colocado na osteotomia, fornece superfície para a colonização bacteriana. Assim, o organismo vegetativo pode reativar, alterar seu metabolismo e formar um biofilme na superfície do implante. (Percival, McCarty et al. 2015)

As leveduras de *Candida* spp também são frequentemente associadas à formação de biofilme em implantes dentários. (Calcaterra, Di Girolamo et al. 2016) É um fungo comensal, que pode ser encontrado em biofilmes de áreas peri-implantes, geralmente infectam em situações que a imunidade do hospedeiro diminui. Além disso, as células de *Candida* podem se ligar às bactérias que já se ligaram ao corpo estranho colonizado, se juntando ao biofilme bacteriano formado. (Calcaterra, Di Girolamo et al. 2016)

Após o primeiro contato do implante estéril com a cavidade bucal, proteínas e glicoproteínas salivares se ligam no implante formando um filme fino, a chamada película adquirida. (Quirynen, Bollen et al. 1994, Busscher and van der Mei 1997, Quirynen, Alsaadi et al. 2005, do Nascimento, Barbosa et al. 2008, Dhir 2013). Proteínas e glicoproteínas salivares se ligam no implante formando um filme fino, a chamada película adquirida. Estas moléculas, atuam, principalmente, promovendo a adesão e agregação de microrganismos nesta estrutura. (Subramani, Jung et al. 2009, Dhir 2013, Yoda, Koseki et al. 2014) Inicia-se então a fase de acumulação, os microrganismos se multiplicam formando vários grupos de células em camadas na superfície do implante. Ocorre a liberação de substâncias poliméricas extracelulares, basicamente polissacarídeos, formando um conjunto de multicamadas de colônias microbianas que se mantém suspensas na matriz polimérica (Subramani, Jung et al. 2009). Este conjunto que se forma é o biofilme. (Gibbons and van Houte 1973, Dhir 2013)

No caso dos implantes dentários, além de colonizar sua superfície externa, as bactérias podem também se estabelecer na interface entre o implante e a conexão da prótese (Koutouzis, Wallet et al. 2011), por meio do *microgap* formado entre as duas peças, implante e pilar protético. As bactérias que estão colonizando a superfície externa podem ser eliminadas pelo mecanismo de defesa do organismo, no entanto, a colonização interna dos implantes e das

interfaces entre as peças podem persistir por longos períodos, gerando mau odor, gosto desagradável na cavidade bucal, infecções e danos teciduais ao periodonto (Listgarten 1999).

Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado a presença de bactérias viáveis na parte interna dos implantes, demonstrando infiltração de fluidos e bactérias em todo seu espaço interno, podendo ser uma fonte de contaminação para os tecidos próximos ao implante instalado (Koutouzis, Mesia et al. 2014, Koutouzis, Gadalla et al. 2016). Tripodi, Vantaggiato (2012) realizaram um estudo *in vitro* avaliando a infiltração de diferentes microrganismos na conexão entre o implante e o pilar protético de dois tipos diferentes de implantes: hexágono-interno (HI) e cone Morse (CM), durante 28 dias. Foram utilizadas duas bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) para a contaminação dos implantes. Os resultados mostraram que em todos os casos houve contaminação interna das amostras de HI pelos microrganismos durante todo o intervalo de tempo avaliado. Por outro lado, no implante do tipo CM não foi observada contaminação de *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das amostras em nenhum período de tempo avaliado, sendo apenas dois implantes contaminados por *P. aeruginosa* em um total de 10 amostras no 22º dia (Tripodi, Vantaggiato et al. 2012). Assim, pôde-se concluir que a contaminação bacteriana ocorreu nas duas conexões pilar/implante avaliadas, entretanto, variou de acordo com a concentração microbiana.

Acreditando que o desenho da interface que existente entre o *abutment* e o implante possa ter um impacto sobre a quantidade de microrganismos que penetram ao interior do implante, Koutouzis, Gadalla (2016), compararam implantes do tipo cone Morse de margem inclinada de diferentes marcas com o implante do tipo cone Morse convencional, ambos simulando carga. Foi observado que os implantes de margem inclinada apresentaram valores semelhantes de contaminação por *Escherichia coli* em seus *microgaps*, quando comparado com os grupos de implantes de margem convencional. Concluíram que a contaminação na interface entre o implante e o conector da prótese está sujeita a contaminação por bactérias independente de seu formato, sendo a completa vedação bacteriana difícil de ser alcançada.

Alguns autores sugerem também que a remodelação da crista óssea que ocorre após a segunda fase cirúrgica da instalação dos implantes é resultado de um processo inflamatório do tecido peri-implantar e causada pela formação de biofilme bacteriano na região de conexão entre o implante e o *abutment* protético (Ericsson, Persson et al. 1995, Brogini, McManus et al. 2003, Brogini, McManus et al. 2006). A colonização interna no implante após a osseointegração tem sido demonstrada em vários sistemas de implantes (Aloise, Curcio et al. 2010, Dias, Bisognin et al. 2012). O fato é que o biofilme instalado nesta interface prejudica o

espaço biológico, levando-o a uma posição mais apical e causando perda óssea marginal. (Small and Tarnow 2000, Dias, Bisognin et al. 2012).

Segundo De Mori, Ribeiro (2014), em implantes de conexão hexagonal externa a média do *microgap* é de 7.36 $\mu$ m, enquanto que para os de conexão cone Morse essa média cai para 3,34 $\mu$ m (Gehrke and Pereira Fde 2014). Levando em consideração a dimensão bacteriana presente na microbiota bucal, onde a média pode variar entre 0,2 a 5 $\mu$ m (Smith and Turkyilmaz 2014), pode-se concluir que a microinfiltração nos sistemas implante/pilar é inevitável.

Na tentativa de testar a eficácia de materiais que selariam esta interface, Duarte *et al.* (Duarte, Rossetti et al. 2006), sugeriram a aplicação de verniz de clorexidina e selante de silicone, os quais não mostraram um selamento eficaz por mais de 35 dias, demonstrando não terem capacidade de vedação da interface implante-intermediário. Outros materiais tem sido amplamente estudados tais como guta-percha (Cavalcanti, Fonseca et al. 2016), gel Gap-Seal (Nayak, Fernandes et al. 2014), materiais a base de politetrafluoretileno (fita veda-rosca) associados ao uso de resina composta (do Nascimento, Pita et al. 2016) porém, apesar destes materiais apresentarem resultados favoráveis, não apresentam durabilidade, funcionando contra a infiltração por curto período de tempo.

Neste sentido, surgiu a intenção de se utilizar materiais de vedação na interface da junção pilar/implante a fim de minimizar ou mesmo impedir a penetração bacteriana nessa interface. Estes materiais, frequentemente utilizados na mecânica e chamados de “trava química”, são resinas com mono componentes, sem solventes, que se polimerizam em temperatura ambiente na ausência de oxigênio quando presa entre as peças. Esses materiais, de acordo com os fabricantes, impedem o afrouxamento de porcas e parafusos provocados pelas vibrações, pois preenchem os espaços vazios entre os filetes das roscas, moldando-se às rugosidades e formando assim um corpo único. Um desses materiais foi avaliado por Seloto, Strazzi Sahyon (2017) quanto ao seu desempenho para manutenção da pré-carga de junções parafusadas pilar/implante com resultados promissores.

Fundamentado nas condições mencionadas anteriormente, nas constantes inovações do mercado odontológico associado à necessidade clínica de longevidade do tratamento com implantes dentários e próteses implantossuportadas e a manutenção da saúde dos tecidos bucais na presença dos implantes sem afetar negativamente sua osseointegração, é justificável a necessidade de pesquisas relacionadas a materiais e técnicas que proporcionem a vedação entre as partes constituintes das junções parafusadas pilar/implante, favorecendo tanto sua manutenção durante a função quanto prevenindo ou até mesmo eliminando a colonização

dessas estruturas por microrganismos, contribuindo para maior previsibilidade das reabilitações implantossuportadas.

## *Objetivo e Hipóteses de nulidade*

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficácia de um agente de vedação no selamento da interface pilar/implante, infiltração e formação de biofilmes isolados e mistos de *C. albicans* e *E. faecalis* no interior de duas conexões protéticas de implantes dentários (hexagonal externa e interna do tipo cone Morse) em diferentes tempos (7 e 14 dias).

Para tanto, foram estabelecidas as seguintes hipóteses de nulidade deste estudo:

**1-** Não haveria diferença significativa na infiltração de *C. albicans* e *E. faecalis* quando inoculados isoladamente ou em conjunto, independentemente da conexão e do período avaliado.

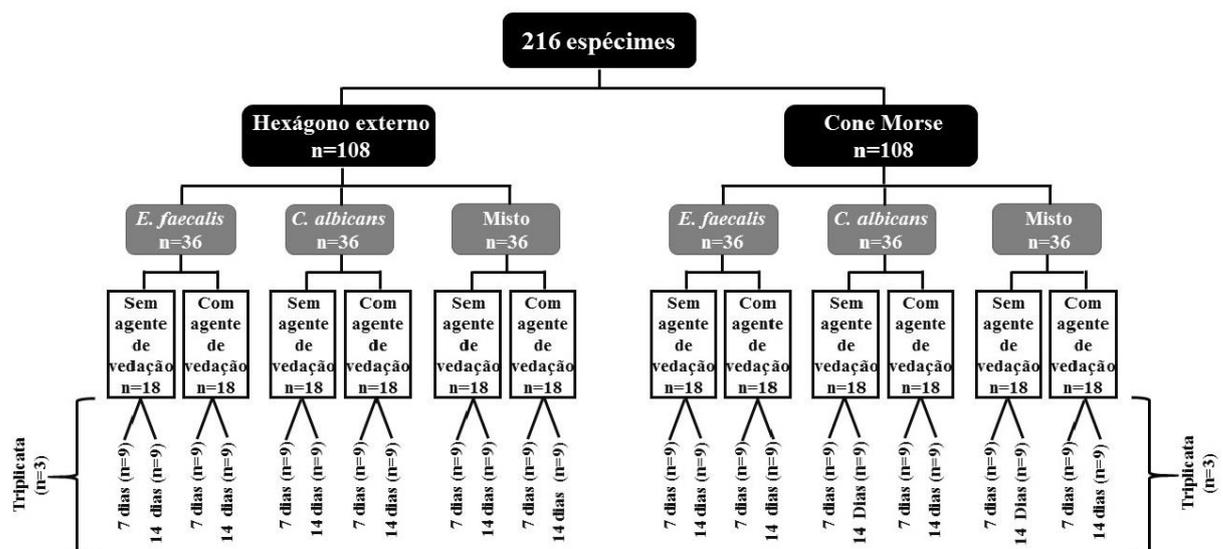
**2-** Não haveria diferença estatística significativa para infiltração microbiana e formação de biofilmes entre os grupos testes (com agente de vedação) e os controles (sem agente de vedação), independente da conexão e período avaliado.

## Material e métodos

### 1. Grupos de estudo

Inicialmente, foram formados 216 conjuntos de implantes osseointegráveis de 4 mm de diâmetro acoplados seus respectivos pilares protéticos tipo UCLA retidos pelos parafusos de retenção apropriados, ambos em liga de titânio (DSP Biomedical®, Campo Largo, Paraná, Brasil). Foram avaliados dois tipos de conexão de implante, hexágono externo (HE) (n=108) e cone Morse (CM) (n=108). Três tipos de biofilme foram analisados: biofilme isolados de *C. albicans* (n=36), biofilme isolado de *E. faecalis* (n=36) e biofilmes mistos de *C. albicans* com *E. faecalis* (n=36). Para cada tipo de biofilme, os conjuntos foram subdivididos em 2 grupos, teste e controle, em função uso ou não do agente de vedação (HE + agente de vedação (HE-T) (n=18); HE sem agente de vedação (HE-C) (n=18); CM + agente de vedação (CM-T) (n=18); CM sem agente de vedação (CM-C) (n=18)). Os biofilmes formados nestes conjuntos foram avaliados em dois períodos de tempo, 7 e 14 dias (n=9).

Para análise dos biofilmes, foram realizados três experimentos em ocasiões independentes nos quais em cada um deles foram utilizadas 3 amostras de cada grupo configurando a triplicata do experimento. Esta estratégia auxilia a reduzir a variabilidade não relacionada com o tratamento e, assim, detectar variações “verdadeiras” com maior precisão, além de possibilitar que os dados sejam avaliados estatisticamente. A **Figura 1** mostra a divisão dos grupos de estudo aqui descritas.



**Figura 1:** Organograma ilustrativo da divisão dos grupos de estudo.

## 2. Especificações do agente de vedação analisado

O material avaliado é o produto Loctite® 2400™ (**Figura 2**) fabricado pela empresa Henkel® Corporation (Henkel Ltda, Düsseldorf, Germany), um material monocomponente, anaeróbio, tixotrópico, de baixa resistência à desmontagem, sendo utilizado industrialmente para ajustar parafusos. Segundo a ficha de informações de segurança de produtos químicos e de acordo com o Regulamento (CE) nº 1907/2006 é um produto líder em saúde e segurança, sem símbolo de perigo, nem frases de risco ou segurança, possui Ficha de Dados de Segurança e Higiene “limpa” e, segundo o fabricante, é de uso adequado quando necessário a desmontagem habitual com ferramentas manuais.



**Figura 2:** Embalagem do material avaliado Loctite® 2400™.

De acordo com a Data Safety Sheet (2014) do produto, o adesivo possui em sua composição os seguintes componentes:

**Figura 3:** Composição do agente de vedação Loctite® 2400™

3. COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS		
Hazardous Component(s)	CAS Number	Percentage*
Methacrylate resin	Proprietary	60 - 100
Rheological additive	Unknown	1 - 5

IDH number: 1526121 Product name: LOCTITE® 2400 NA™ THREADLOCKER

Na **Figura 4**, observam-se suas características físicas e químicas:

<b>DESCRIÇÃO DO PRODUTO</b>	
LOCTITE® 2400™ apresenta as seguintes características:	
<b>Tecnologia</b>	Acrílico
Base Química	Éster Dimetacrilato
Aparência (não curado)	Líquido azul <sup>MS</sup>
Fluorescência	Positiva sob luz UV <sup>MS</sup>
Componentes	Mono componente - não requer mistura
Viscosidade	Média, tixotrópico
<b>Cura</b>	Anaeróbico
Cura Secundária	Ativador
<b>Aplicação</b>	Trava Roscas
Resistência	Média

**Figura 4:** Características do agente de vedação Loctite® 2400™ (Fonte: Catálogo Henkel®)

Segundo o fabricante, este produto é indicado para travamento e vedação de superfícies roscadas, cuja desmontagem requeiram ferramentas manuais convencionais. O produto cura quando confinado entre superfícies metálicas e na ausência de ar, e evita o afrouxamento e vazamento originados por impacto e vibração. Especialmente indicado para aplicações em superfícies menos ativas, tais como: aço inoxidável e superfícies tratadas, onde ferramentas manuais são indicadas para desmontagem. A característica tixotrópica do Loctite® 2400™ reduz o escorrimento do produto líquido após aplicação no substrato.

Para verificar se o paciente estaria em segurança durante o uso do material, foi feita uma investigação detalhada de suas propriedades químicas e toxicológicas, a partir do MSDS (Material Safety Data Sheet) (MSDS, 2014), conhecido no Brasil como FIPSQ (Ficha de Informação de Segurando de Produto Químico), um formulário contendo dados relativos às propriedades de uma determinada substância. Este documento é um importante componente de segurança do trabalho, que fornece informações importantes como dados físicos, toxicidade, efeitos sobre a saúde, primeiros socorros, reatividade, armazenamento, eliminação, manipulação e descarte (Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico/Material Safety Data Sheet Solutions Center, 2014).

A **Figura 5** mostra as implicações toxicológicas dos seus componentes, segundo a MSDS (2014):

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION			
Relevant routes of exposure:		Skin, Inhalation, Eyes	
Potential Health Effects/Symptoms			
Inhalation:	Inhalation of vapors or mists of the product may be irritating to the respiratory system.		
Skin contact:	Causes skin irritation.		
Eye contact:	Causes serious eye irritation.		
Ingestion:	Not expected to be harmful by ingestion.		
Hazardous Component(s)	LD50s and LC50s	Immediate and Delayed Health Effects	
Methacrylate resin	None	Allergen, Irritant	
Rheological additive	None	No Data	
Hazardous Component(s)	NTP Carcinogen	IARC Carcinogen	OSHA Carcinogen (Specifically Regulated)
Methacrylate resin	No	No	No
Rheological additive	No	No	No

**Figura 5:** Informações toxicológicas dos componentes do agente de vedação Loctite® 2400™

É importante ressaltar que o produto foi aplicado na porção indexadora do componente protético, que se situa na porção mais apical e que se conecta no interior do implante, e não diretamente nos tecidos da cavidade oral.

### 3. Cepas bacterianas e condições de crescimento

Para o presente estudo, foram utilizados dois microrganismos: a levedura saprófita *C. albicans* (ATCC 90028) e a espécie bacteriana gram-positiva *E. faecalis* (ATCC 29212) relacionados com casos de peri-implantites e periodontite (Smith and Turkyilmaz 2014). Inicialmente, as cepas microbianas que estavam congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em solução contendo 25% de glicerol, foram reativadas em placas de Sabouraud Dextrose Ágar (Difco, Kansas City, MO, USA) para *C. albicans* e meio BHI ágar (Difco, Kansas City, MO, USA) para *E. faecalis* em meio BHI ágar (Difco, Kansas City, MO, USA) e encubadas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 a 72h. Uma alçada dos microrganismos cultivados foi coletada e transferida para um tubo contendo 5mL de meio BHI caldo (Difco, Kansas City, MO, USA) para realização das curva de crescimento dos microrganismos (Sanchez, Llama-Palacios et al. 2014), com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para que cada um deles atingisse sua fase de maior multiplicação celular (fase log ou exponencial de crescimento), que foi determinado pelos valores de Densidade Óptica (DO). Ao atingir metade da fase exponencial (0,3 para *C. albicans* e 0,5 para *E. faecalis*), as quantidades de microrganismos foram ajustadas para  $1,5 \times 10^8$  células/mL, sendo padronizada a diluição de 1000x para *C. albicans* e de 10000x para *E. faecalis*.

#### **4. Ensaio de biofilme e coleta para processamento microbiológico**

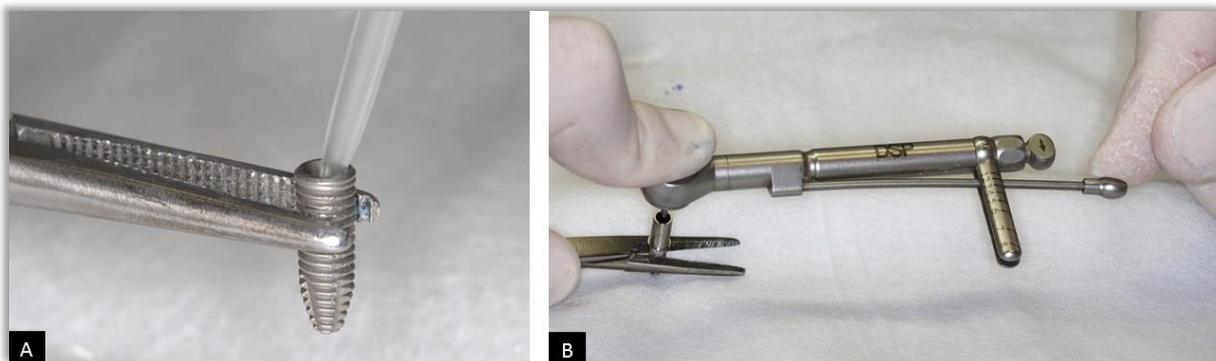
##### **4.1 Controle da contaminação do experimento:**

Medidas foram tomadas para se evitar a contaminação externa durante as etapas laboratoriais. Todo o experimento foi realizado no interior de uma câmara de fluxo laminar (Veco – Campinas – SP, Brasil). Ao acionar a câmara, a fim de manter todo o seu ambiente estéril, foi ativada a luz ultravioleta por 15 minutos. A bancada da câmara de fluxo laminar foi previamente desinfetada com álcool 70% e forrada com campos cirúrgicos estéreis. O experimento foi realizado na zona reservada no interior da capela, na área asséptica e todos os instrumentos necessários foram previamente esterilizados. O agente de vedação foi esterilizado por meio da luz ultravioleta da câmara de fluxo laminar por 30 minutos antes do início do experimento. Dois operadores executaram o experimento. O primeiro operador fez uso de luva estéril, máscara e gorro cirúrgico durante todo o experimento tocando apenas nos materiais que estavam estéreis mantendo a cadeia asséptica. O segundo operador fez uso de luvas de procedimento, máscara e gorro cirúrgico podendo ter contato com o restante dos instrumentais que não estavam estéreis.

##### **4.2 Ensaio do grupo controle**

Na primeira fase do ensaio, no interior da câmara de fluxo laminar, os implantes pertencentes aos grupos controles (sem agente de vedação) previamente esterilizados (120°C por 20min em embalagens lacradas individuais) foram removidos das embalagens por meio de pinça estéril e colocados na área asséptica. O primeiro operador foi responsável por manter o implante em posição vertical por meio de uma pinça hemostática travada, impossibilitando a movimentação do implante em qualquer direção (do Nascimento, Barbosa et al. 2008). Em seguida, o segundo operador inseriu 2µl de meio de cultura BHI caldo estéril no interior dos implantes por meio de uma micropipeta (**Figura 6A**). Os respectivos pilares foram posicionados nos implantes e seus parafusos rosqueados utilizando o torque preconizado pelo fabricante aplicado a cada um dos parafusos por meio de um torquímetro mecânico manual (DSP Biomedical, Campo Largo, PR, Brasil). O primeiro operador foi o responsável por manter as peças em posição e aplicar o torque necessário (20N/cm para os implantes do tipo cone Morse e 30N/cm para implantes do tipo hexágono externo) por meio da chave específica e do

torquímetro (**Figura 6B**). O segundo operador auxiliou estabilizando a pinça hemostática pela alça, mantendo assim o implante em posição adequada (do Nascimento, Barbosa et al. 2008).



**Figura 6:** A-Inserção do meio de cultura no interior do implante. B-Posicionamento do pilar e aplicação do torque no parafuso de retenção.

Os espécimes foram colocados dentro de um tubo Falcon (15mL) contendo 5 mL da mistura de suspensões microbianas: 4,5 mL de meio de cultura BHI puro e 0,5 mL de suspensão bacteriana na concentração  $1,5 \times 10^8$ . Os tubos foram fechados com um quarto de volta e incubados em estufa de  $\text{CO}_2$   $37^\circ\text{C}$ , onde foram mantidos até a coleta do material que foi realizada nos períodos pós 7 e 14 dias de incubação, nos quais os implantes ficaram em contato com o meio contaminado, para análise de contaminação do meio externo para o meio interno. A cada dois dias o meio de cultura em contato com os espécimes foi renovado no mesmo volume para evitar sua saturação, mantendo assim, as bactérias em condições viáveis.

Para evitar que a abertura da parte superior do pilar protético interferisse na infiltração para o interior do implante, esta porção superior foi fechada com a inserção de algodão estéril e material restaurador provisório (Obtur - Maquira e Produtos Odontológicos S.A – Maringá – PR, Brasil).

#### **4.3 Ensaio de contaminação bacteriana – grupo teste**

No interior da câmara de fluxo laminar, os implantes pertencentes aos grupos testes (com agente de vedação) previamente esterilizados ( $120^\circ\text{C}$  por 20min em embalagens lacradas individuais) foram removidos das embalagens por meio de pinça estéril e colocados na área asséptica. O primeiro operador foi responsável por manter o implante em posição vertical por meio de uma pinça hemostática travada, impossibilitando a movimentação do implante em

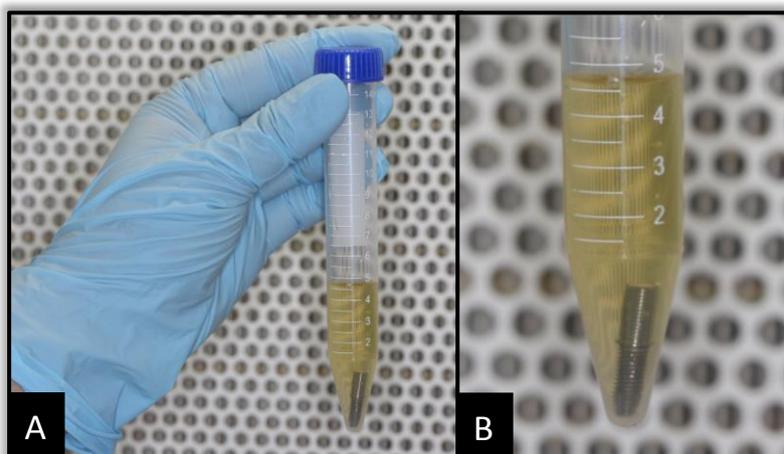
qualquer direção. Em seguida, o segundo operador inseriu 2µl de meio de cultura BHI caldo estéril no interior dos implantes por meio de uma micropipeta (**Figura 6A**).

Na plataforma do implante (**Figura 7A**), do pilar protético (**Figura 7B**) e nas roscas do parafuso de retenção (**Figura 7C**) foi aplicada uma fina camada do agente de vedação (previamente esterilizado) com o auxílio de um micro pincel também estéril. Em seguida, os respectivos pilares foram posicionados nos implantes e seus parafusos rosqueados utilizando o torque preconizado pelo fabricante aplicado a cada um dos parafusos por meio de uma chave específica e torquímetro, conforme já descrito para os grupos controle (**Figura 5B**).



**Figura 7:** A: Aplicação do material na porção hexagonal do implante HE; B: Aplicação na porção indexadora do pilar protético CM; C: Aplicação do material nas roscas do parafuso de retenção.

Os espécimes foram colocados dentro de um tubo de vidro contendo 5 mL da mistura de suspensões bacterianas: 4,5 ml de meio de cultura BHI puro e 0,5 ml de suspensão microbiana na concentração  $1,5 \times 10^8$ . Para o ensaio de biofilme misto, utilizou-se 0,25 mL de cada microrganismo. (**Figura 8**)



**Figura 8:** A: Espécime no interior do tubo Falcon contendo a solução de meio de cultura com microrganismo. B: Vista aproximada.

Os tubos foram fechados com um quarto de volta e incubados em estufa de anaerobiose a 37°C, onde foram mantidos até a coleta do material que foi realizada após 7 e 14

dias, nos quais os implantes ficaram em contato com o meio contaminado, para analisar a contaminação do meio externo para o meio interno. Como nos grupos testes, a cada dois dias o meio de cultura em contato com os espécimes foi renovado no mesmo volume para evitar sua saturação, mantendo assim, as bactérias em condições viáveis.

#### **4.4 Coleta do material e contagem microbiana**

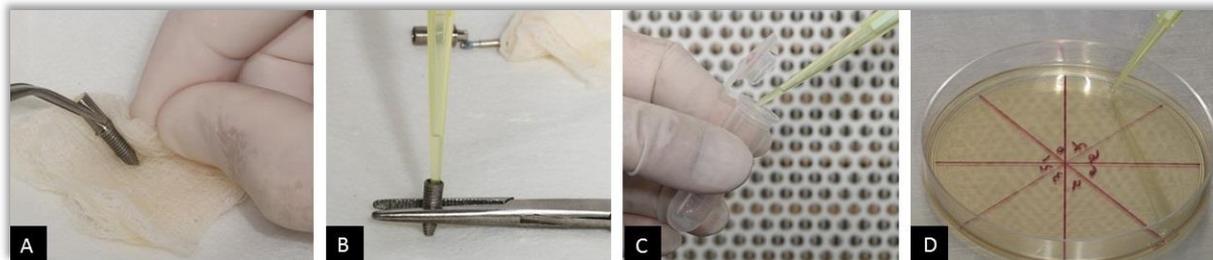
Após 7 e 14 dias de incubação, foi realizada a coleta do meio de cultura no interior do implante que havia sido inserido no início do experimento.

Dentro de uma câmara de fluxo laminar, os espécimes foram retirados dos tubos com o auxílio de uma pinça e friccionados em gaze embebida com álcool a 70% para descontaminação externa (**Figura 9A**). O conjunto foi estabilizado em posição vertical com o auxílio de uma pinça hemostática, e o parafuso do pilar protético foi desrosqueado com auxílio do torquímetro manual e removido, permitindo a separação pilar/implante. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, foi dispensado no interior do implante 10  $\mu\text{L}$  de solução salina ressuspensão do líquido, a fim de diluir o meio de cultura que fora colocado anteriormente e fazer com que os microrganismos que por ventura estivessem apreendidos por entre as roscas se incorporassem ao líquido (**Figura 9B**) (**Guiotti, Cunha et al. 2016**). Tal método foi utilizado a fim de coletar os microrganismos que tenham ficado nas reentrâncias das paredes internas do implante. Foi coletado 5  $\mu\text{L}$  desta solução contendo o meio de cultura e os microrganismos e essa foi diluída em 0,45  $\mu\text{L}$  de solução salina para posterior plaqueamento (**Figura 9C**).

A solução coletada foi analisada por meio da contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) a fim de avaliar a quantidade de microrganismos que pudessem ter ultrapassado a barreira promovida pelo agente de vedação, colonizando o interior do implante e, por consequência, contaminando o meio de cultura que estava estéril em seu interior. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar, a fim de manter o ambiente livre de contaminações externas.

Foram realizadas 7 diluições seriadas da solução coletada, transferindo-se 5  $\mu\text{L}$  dessa solução para 45  $\mu\text{L}$  de solução salina em um microtubo. Foram plaqueadas duas gotas de 10  $\mu\text{L}$  em placas de Petri (**Figura 9D**) contendo meio de cultura BHI ágar. Para os ensaios de biofilme misto, a fim de isolar os microrganismos para contagem, foi utilizado meio BHI contendo anfotericina (antifúngico) para o isolamento de *E. faecalis* (Harriott and Noverr 2010) e BHI contendo cloranfenicol (antibiótico) para isolamento de *C. albicans* (Zago, Silva et al. 2015). Em seguida todas as placas foram incubadas por 24 horas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).



**Figura 9:** A: Limpeza externa do espécime com gaze embebida em álcool 70%; B: Inserção de solução salina no interior do implante; C: Material coletado do interior do implante sendo diluído em solução salina para plaqueamento; D: Plaqueamento em meio de cultura ágar do material diluído coletado do interior do implante.

### 5. Análise de biofilme por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

No período de 7 dias, a organização do biofilme misto foi avaliada por meio da MEV na região do espelho da plataforma do implante e na região de conexão do pilar do grupo misto (n=2). A análise foi realizada em pelo menos dois locais separados e representativos nas dimensões de 20, 100 e 1000X através de um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-5600LV, Jeol Ltda, Akishima, Tóquio, Japão) à 15 kV. Para isso, os biofilmes nos implantes foram previamente fixados em solução de fixação de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 5% de formoldeído, 0,1M de solução tampão de fosfato de sódio pH7,2), seguida por desidratação com banhos em série de diferentes concentrações de álcoois (5 minutos em 60%, 80%, e 90% e por 10 minutos em álcool 100%) e secos em condições assépticas no interior da câmara de fluxo laminar (Lucena-Ferreira, Ricomini-Filho et al. 2014). Após fixação, os espécimes foram posicionados em *stubs*, submetidos à metalização com jateamento de ouro e analisados.

### 6. Análise visual das junções parafusadas e do agente de vedação em seu interior

A fim de visualizar as junções parafusadas avaliadas e o comportamento do material de vedação nessas interfaces, os conjuntos montados referentes a cada grupo (CM + agente de vedação, HE + agente de vedação, CM sem agente de vedação e HE sem agente de vedação) foram embutidos em resina acrílica autopolimerizável incolor (VIPI Flash, VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga – SP - Brasil) por meio de uma embutidora elétrica (Arotec PRS-30S – Arotec Indústria e Comércio – Cotia - SP, Brasil). Em seguida, foram posicionados e submetidos a um corte coronal com auxílio de uma cortadeira de precisão (Isomet 5000, Buehler – Illinois, EUA) a fim de seccionar o espécime em seu longo eixo e permitir a

visualização da conexão e da câmara do implante, bem como a presença do agente de vedação na interface pilar/implante e parafuso de retenção. As peças obtidas foram fotografadas por meio de uma câmera fotográfica digital com lente macro de 100mm (Canon® EOS 70D – Ota –Toquio, Japão).

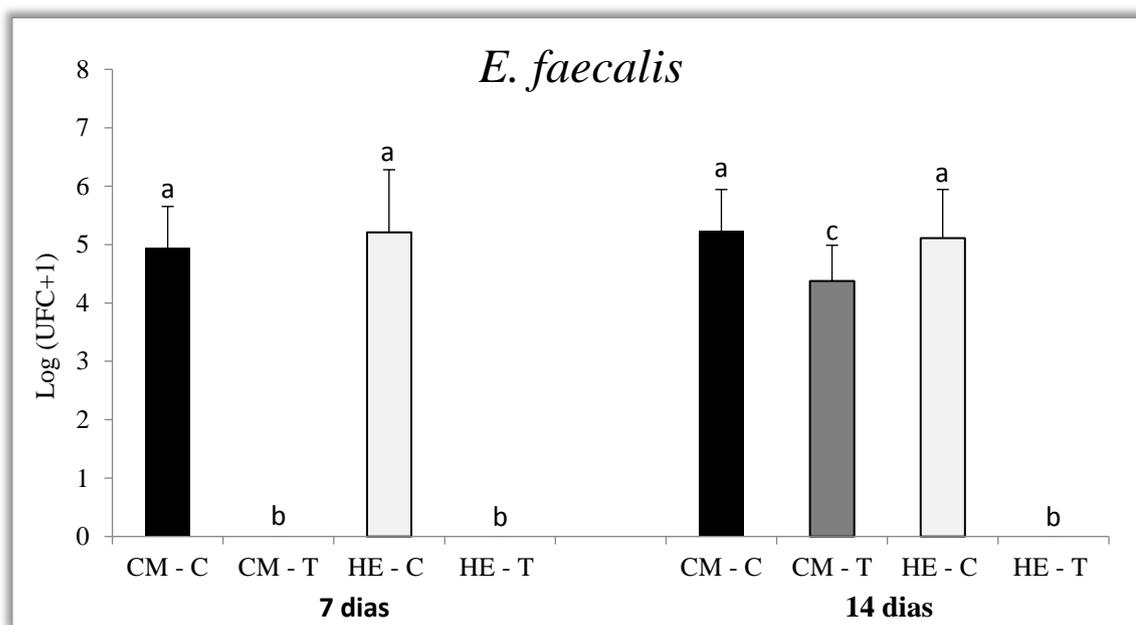
## 7. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do *software* estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation, New York, EUA) versão 17.1. Os dados tabulados foram submetidos ao teste de homogeneidade de Kolmogorov-Smirnov e observada sua distribuição normal. Para comparar as médias dos dados de contagem das UFC/mL para os ensaios de biofilme isolado de *E. faecalis* e *C. albicans*, os dados foram analisados pelo teste de ANOVA a dois critérios seguida pelo teste de Bonferroni considerando o nível de significância de 5%. E para biofilme misto, foi utilizado o teste *t Student*. Foi analisada a influência da presença do agente de vedação e do período de avaliação (7 e 14 dias). Devido à amplitude dos dados de contagem microbiana, o número de UFC/mL foi transformado em log (UFC+1). O +1 foi adicionado por conta dos valores 0 encontrados no estudo ( $\log 1 = 0$ ).

## Resultados

### 1. Resultados da contagem de UFC/ml dos grupos de biofilme isolado

A **Figura 10** indica os valores de crescimento microbiano em log (UFC/mL+1) para os grupos isolados de *E. faecalis* nos períodos de 7 e 14 dias.

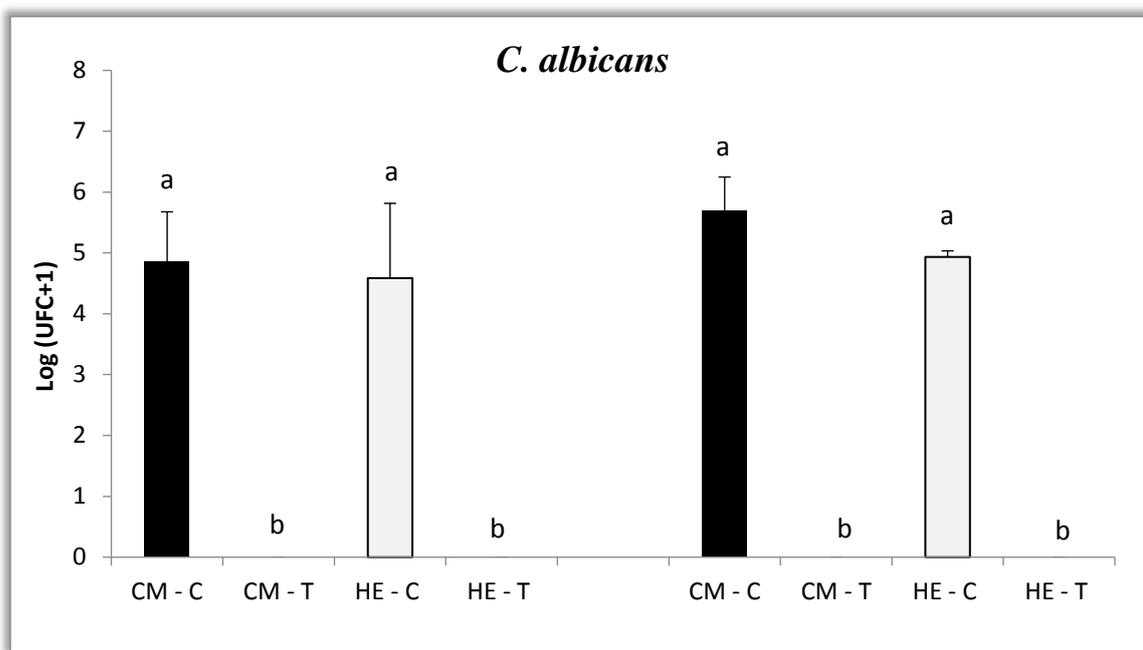


**Figura 10:** Média (desvio-padrão) da contagem de UFC/ml (em escala logarítmica) de *E. faecalis* para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo e tempo de avaliação, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, considerando  $p \leq 0,05$ .

Analisando o fator “conexão”, para *E. faecalis* no período de 7 dias, é possível observar que houve diferença estatística significativa entre os grupos teste e controle na análise intergrupos de conexão cônica (CM-C x CM-T) ( $p=0$ ), com crescimento bacteriano apenas no grupo controle (sem agente de vedação). Nesse período a conexão hexagonal externa apresentou comportamento semelhante (HE-C x HE-T) ( $p=0$ ), com crescimento bacteriano no grupo controle. Na análise intergrupos para as conexões nos diferentes períodos (fator “tempo”), identificamos diferença significativa entre os grupos teste para conexão cone Morse (CM-T 7 dias x CM-T 14 dias) ( $p > 0,05$ ).

No período de 14 dias de incubação, na análise intergrupos, observa-se diferença estatística significativa ( $p=0,04$ ) entre os grupos de conexão cônica (CM-C x CM-T), com maior valor de crescimento bacteriano no grupo CM-C ( $5,22\pm 0,71$ ). Na análise da conexão hexagonal neste mesmo período (HE-C x HE-T), observa-se diferença estatística significativa ( $p=0$ ) entre os grupos com crescimento somente para o grupo HE-C ( $5,10\pm 0,83$ ). Para os grupos controle de diferentes conexões (CM-C x HE-C) não houve diferença estatística significativa ( $p=1$ ), enquanto que os grupos teste (CM-T e HE-T) diferiram entre si ( $p=0$ ), sendo que o grupo HE-T não apresentou crescimento bacteriano (0).

A **Figura 11**, mostra os valores de crescimento microbiano (UFC/ml) para os grupos isolados de *C. albicans* nos períodos de 7 e 14 dias.



**Figura 11:** Média (desvio-padrão) da contagem de UFC/ml (em escala logarítmica) de *C. albicans* para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo e tempo de avaliação, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni, considerando  $p\leq 0,05$ .

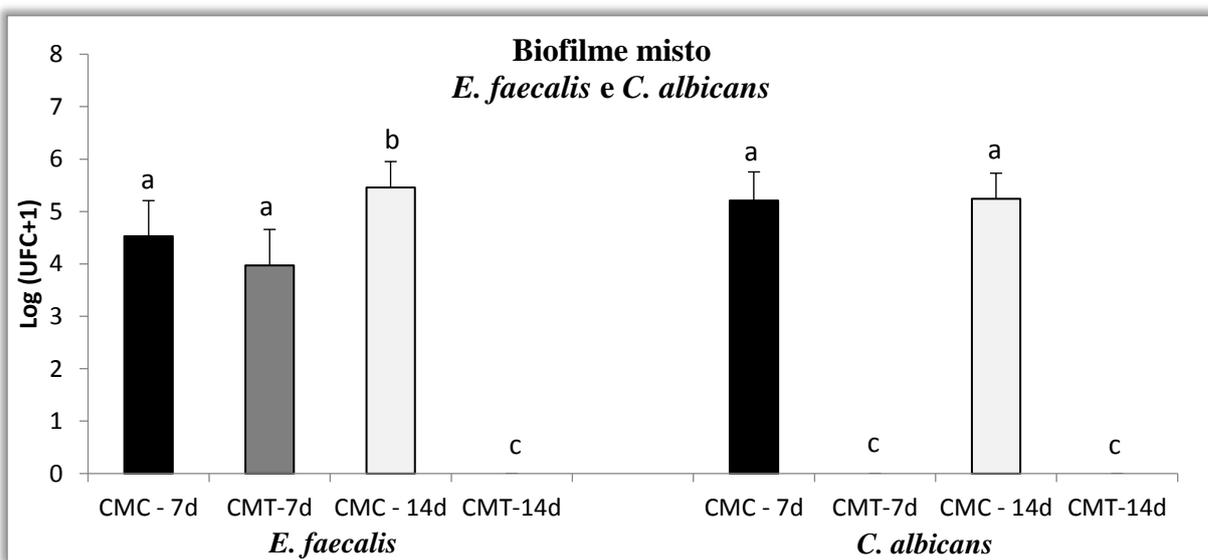
Analisando o fator “conexão”, para *C. albicans* no período de 7 dias, é possível observar que houve diferença estatística significativa entre os grupos teste e controle na análise da conexão cônica (CM-C x CM-T) assim como da hexagonal externa ( $p=0$ ), com crescimento microbiano apenas nos grupos controles (sem agente de vedação). Na análise entre as conexões não ocorreram diferenças significantes ( $p=1$ ) entre os grupos controle e teste (CM-C x HE-C e CM-T x HE-T).

No período de 14 dias de incubação, na análise intergrupos, é possível observar diferença estatística significativa ( $p=0$ ) entre os grupos de conexão cônica (CM-C e CM-T). Na análise do grupo de conexão hexagonal (HE-C e HE-T), observa-se diferença estatística significativa ( $p=0$ ) entre os grupos com crescimento somente no grupo HE-C ( $4,93\pm 0,09$ ). Na análise intragrupos (CM-C x HE-C e CM-T x HE-T), os grupos controle e teste não apresentaram diferença estatística significativa entre si ( $p=1$ ).

Analisando o fator “tempo”, não houve diferença estatística entre conexões semelhantes em função do tempo ( $p=1$ ).

## 2. Resultados da contagem de UFC/ml dos grupos de biofilmes mistos

A **Figura 12** ilustra os valores de crescimento microbiano em log (UFC/ml +1) para os grupos com biofilmes mistos de *E. faecalis* e *C. albicans*, após isolados durante o plaqueamento, nos períodos de 7 e 14 dias para a conexão do tipo cone Morse, uma vez que não foi observado crescimento microbiano na conexão hexagonal externa, independente do microrganismo e do período de tempo que foi avaliado. Sendo assim, houve diferença estatística significativa entre as conexões em todos os períodos de tempo, independente do microrganismo.



**Figura 12:** Média (desvio-padrão) da contagem de UFC/ml (em escala logarítmica) de *E. faecalis* e *C. albicans* após isolados durante o plaqueamento para cada grupo. Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre cada grupo, de acordo com os testes de Tukey, considerando  $p\leq 0,05$ .

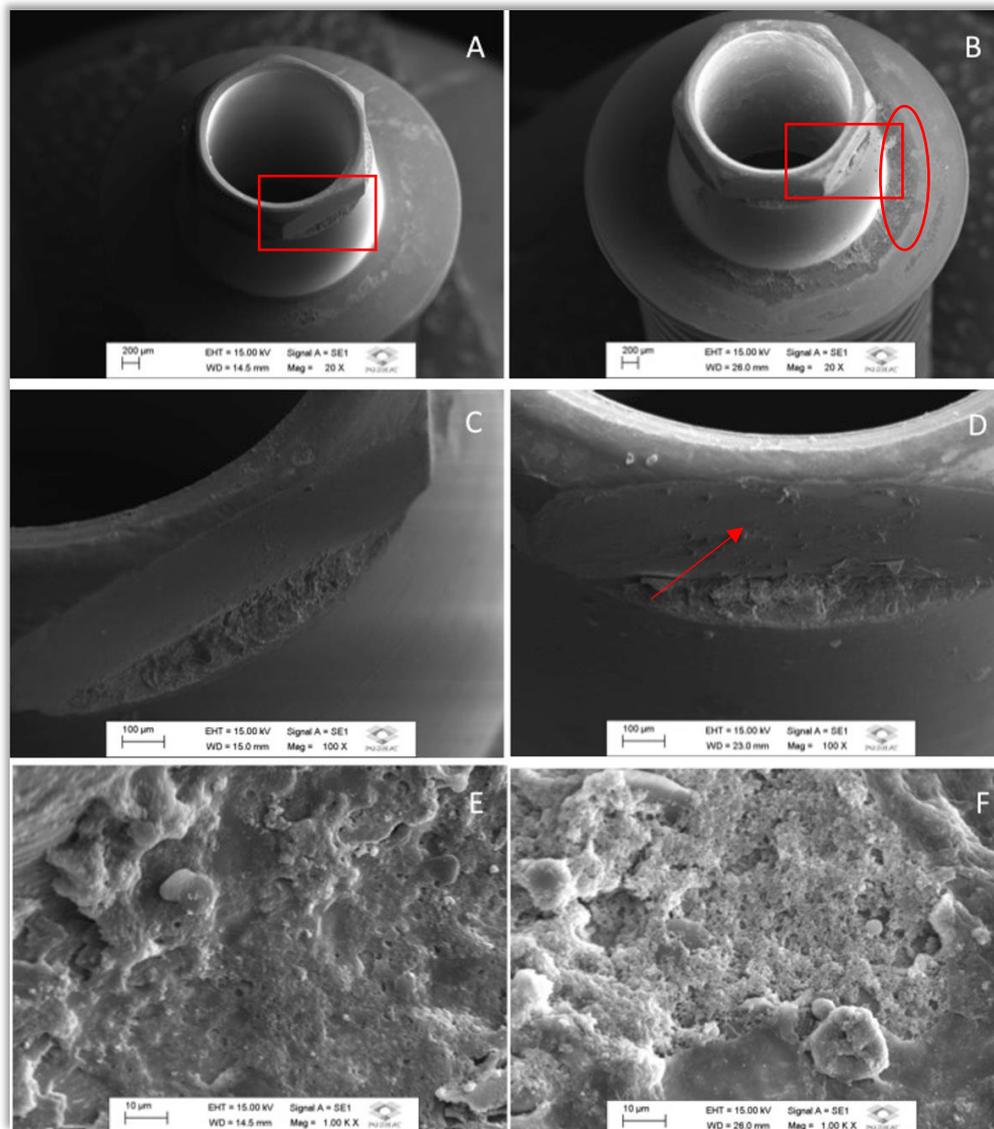
Na análise intergrupos da conexão cone Morse para *E. faecalis* no biofilme misto, no fator “tempo” aos 7 dias, observa-se que não houve diferença estatística significativa do

grupo CM-T em relação ao controle, demonstrando crescimento bacteriano no grupo teste ( $p=1$ ). Já no período de 14 dias, houve diferença estatística significativa do grupo CM-T em relação ao controle. Também houve diferença significativa na comparação entre os períodos 7 e 14 dias dos grupos CM-C e CM-T. É possível identificar também que não houve crescimento bacteriano para o grupo CM-T no período de 14 dias.

Na análise intergrupo para *C. albicans* no biofilme misto, é possível observar que no fator “tempo” aos 7 e 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle ( $p=0$ ). Podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos controle (CM-C 7 dias x CM-C 14 dias) e nem entre os grupos teste (CM-T 7 dias e CM-T 14 dias). Observa-se também que não houve crescimento para *C. albicans* nos grupos teste, independente do período avaliado.

### 3. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

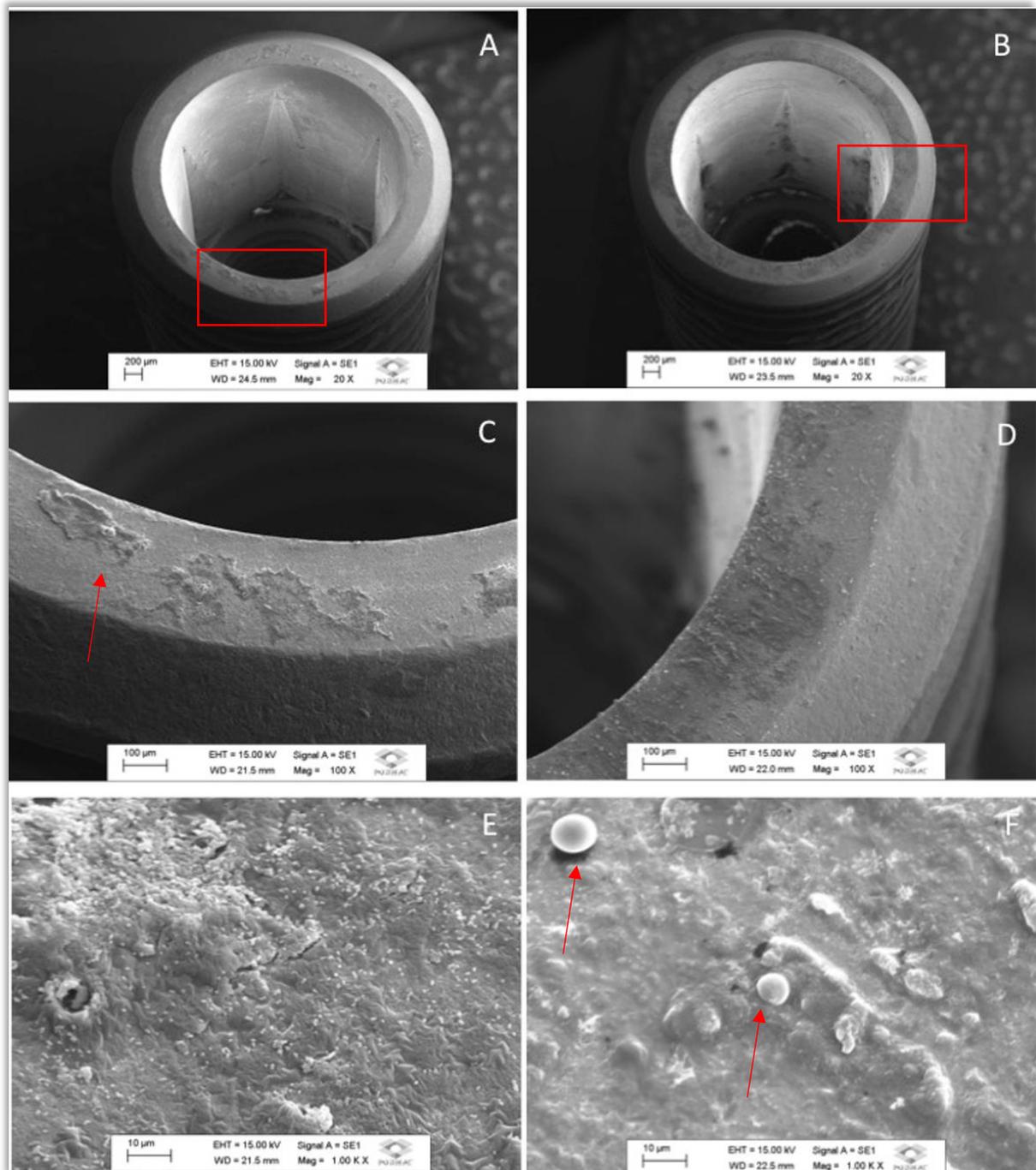
A **Figura 13** apresenta as micrografias obtidas por meio da MEV do pilar UCLA cônico para implante cone Morse na presença do biofilme misto aos 7 dias. Na magnitude 20x, temos imagens da região de sua conexão. Nas **Figuras 13A e 13B**, observa-se o espécime representativo do grupo CM-C e CM-T, respectivamente. É possível observar na **Figura 13B** a presença de material na porção ao redor da região cônica do pilar, indicando a presença do agente de vedação. Na magnitude de 100x, é possível observar na **Figura 13C**, que representa o grupo CM-C, e na **Figura 13D**, que representa o grupo CM-T, a presença de biofilme na região indexadora hexagonal do pilar. Nas **Figuras 13E e 13F**, que representam os grupos CM-C e CM-T respectivamente, temos as imagens na magnitude de 1000x, nas quais é possível observar o biofilme com algumas células e muita matriz extracelular, na qual células esféricas maiores são características fenotípicas de *C. albicans* e células esféricas menores, de *E. faecalis*.



**Figura 13:** Imagens das micrografias obtidas através da MEV dos pilares UCLA para implante cone Morse na presença de biofilme misto aos 7 dias. **A:** Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-C. **B:** Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-T. **C:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-C. **D:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. **E:** Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo CM-C. **F:** Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. Forma circular indica a presença do agente de vedação. Formas quadrangular indica o local de aproximação da imagem. Seta indica a presença de biofilme

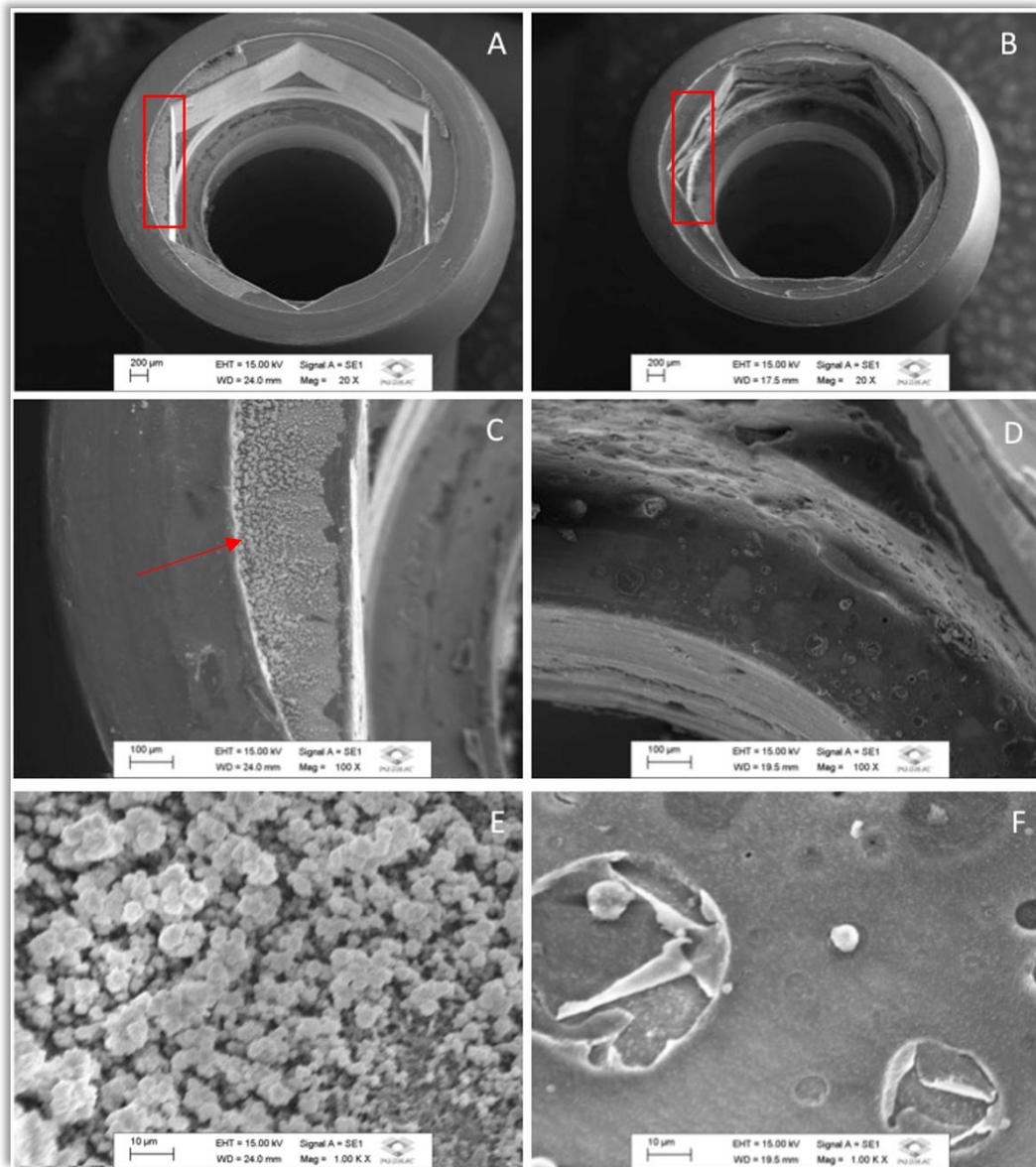
A **Figura 14** apresenta as micrografias obtidas por meio da MEV para os implantes do tipo cone Morse na presença de biofilme misto e no período de 7 dias. Na **Figura 14A**, é possível observar a plataforma e conexão do implante do espécime representativo do grupo

CM-C em aumento de 20X, no qual se observa a presença de biofilme na sua porção mais externa. Na **Figura 14B**, com a mesma magnificação anterior observa-se a imagem representativa da plataforma de implante do grupo CM-T, onde nota-se a presença de biofilme, porém em menor quantidade quando comparado ao controle. Na **Figura 14C**, temos imagem com maior magnitude (100X) para o grupo CM-C, em que se observa em maior escala e nitidez o biofilme formado na plataforma do implante. Na **Figura 14D e 14F**, também com magnificação de 100X, observa-se o biofilme formado com algumas células menores dispersas por toda a superfície e densa matriz extracelular. Já na **Figura 14E** (magnificação de 1000X), é possível observar em maior escala o biofilme formado na superfície do implante do grupo CM-C, na qual identifica-se biofilme pouco denso, disperso, com grande presença de matriz extracelular, presença de algumas células com características de *C. albicans* e presença de algumas células menores, características de *E. faecalis*.



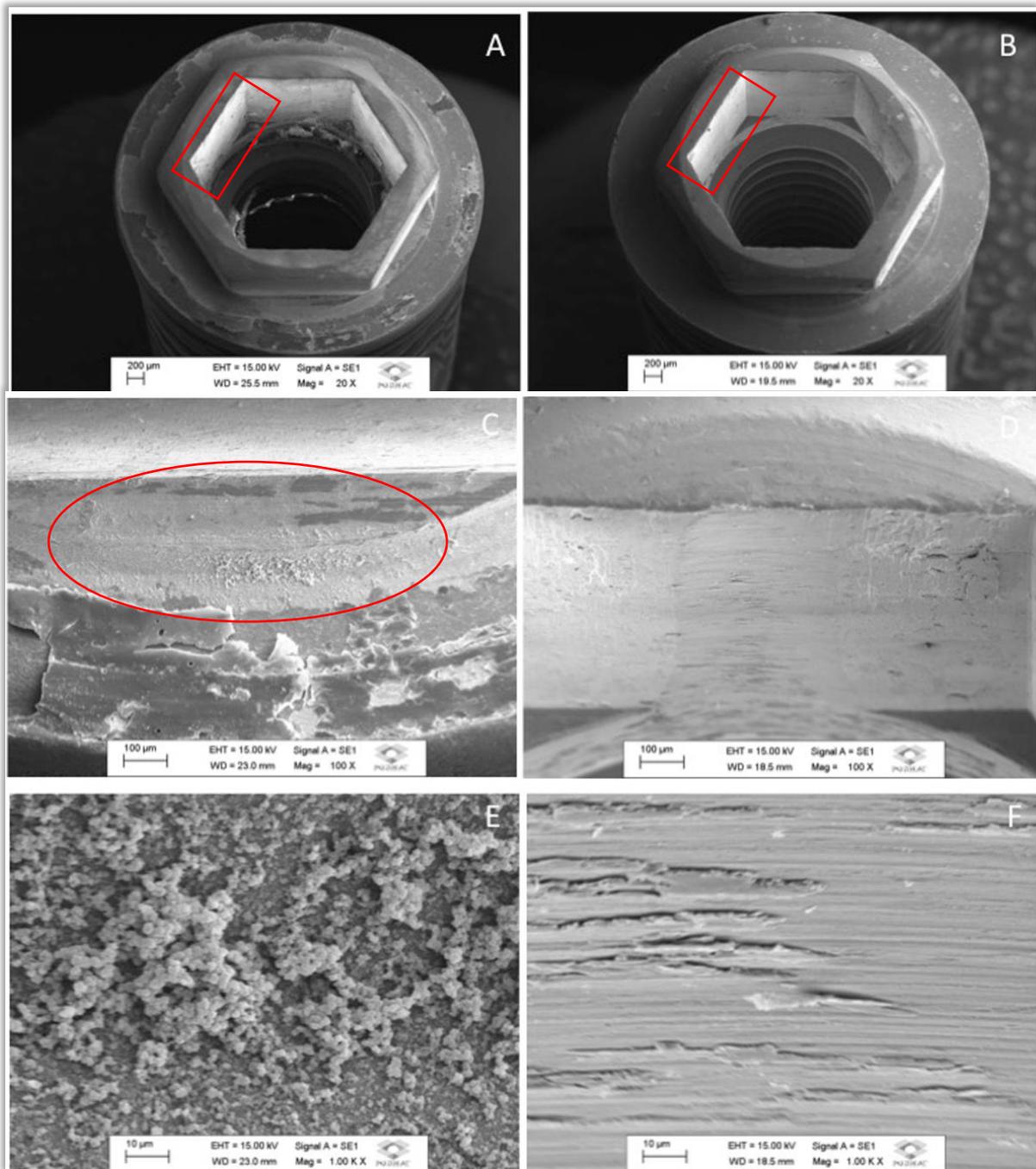
**Figura 14:** Imagens das micrografias obtidas por meio da MEV dos implantes cone Morse na presença de biofilme misto aos 7 dias. **A:** Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-C. **B:** Parte indexadora do pilar protético do grupo CM-T. **C:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-C. **D:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. **E:** Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo CM-C. **F:** Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo CM-T. Forma retangular indica o local de aproximação. Setas indicam alguns microrganismos dispersos.

Na **Figura 15**, temos a apresentação das micrografias obtidas por meio da MEV para os pilares protéticos dos implantes hexágono-externo na presença de biofilme misto no período de 7 dias. Na **Figura 15A**, podemos observar a região indexadora do pilar do grupo HE-C, onde se observa a presença de um biofilme espesso em sua porção mais externa, próxima à região de contato com o hexágono, mas não na sua porção mais interna. Já na **Figura 15B**, representativa do grupo HE-T, observamos este biofilme em menor proporção. Na **Figura 15C**, grupo HE-C, observamos em maior magnificação o biofilme, que neste grupo é mais espesso do que o biofilme observado na **Figura 15D**, representativa do grupo HE-T, o qual demonstra não ter formado biofilme. Em maior aumento a **Figura 15E**, mostra o biofilme espesso formado no grupo HE-C e células dispersas no grupo HE-T observado na **Figura 15F**.



**Figura 15:** Imagens das micrografias obtidas através da MEV dos pilares UCLA para implante hexágono externo na presença de biofilme misto aos 7 dias. **A:** Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-C. **B:** Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-T. **C:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-C. **D:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-T. **E:** Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo HE-C. **F:** Magnificação de 1000X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-T. Forma retangular indica o local de aproximação. Setas indicam a presença de biofilme.

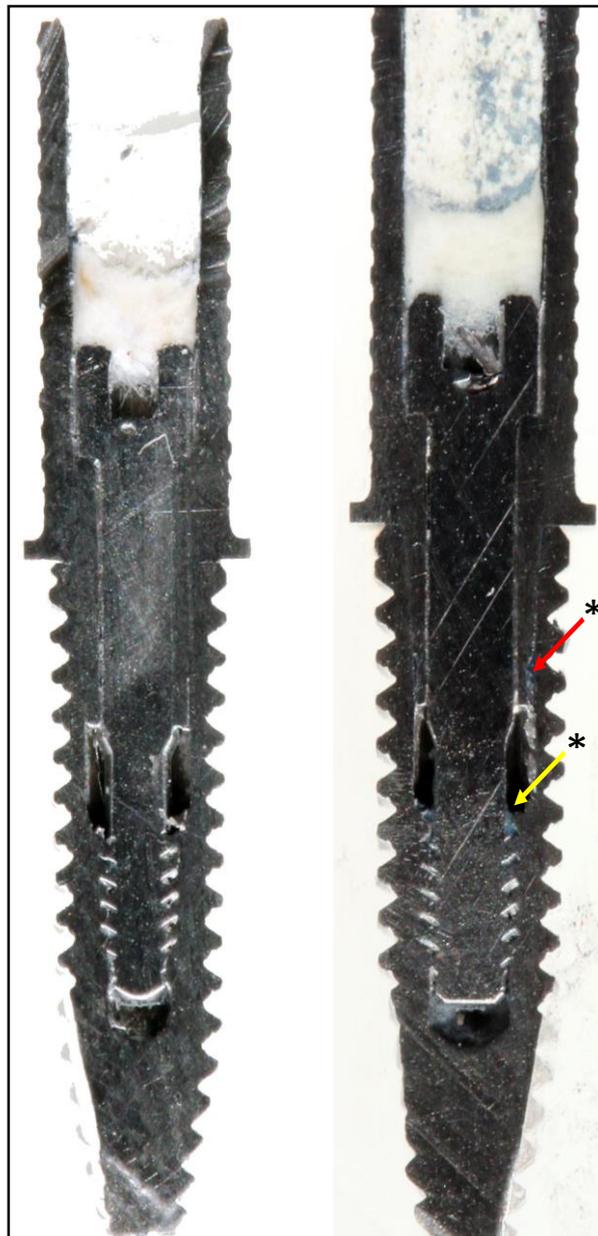
Na **Figura 16**, observamos a apresentação das micrografias obtidas através da MEV para os implantes hexágono-externo na presença de biofilme misto no período de 7 dias. Na **Figura 16A**, é possível observar a plataforma de conexão do implante do espécime representativo para o grupo HE-C em aumento de 20X. Na **Figura 16B**, observa-se a imagem representativa da plataforma do implante para o grupo HE-T. Na **Figura 16C**, temos imagem com magnificação de 100X para o grupo HE-C, na qual se observa com nitidez o biofilme formado no “espelho” do implante, demonstrando ser um biofilme espesso e extenso. Já na **Figura 16D**, obtida com a mesma magnificação (100X), observa-se que para o grupos HE-T não houve formação de biofilme. Na **Figura 16E**, é possível observar em maior magnificação (1000X), com detalhes, o biofilme formado. Podemos notar que para HE-C houve grande concentração de microrganismos demonstrando um biofilme bem consistente, enquanto na **Figura 16F**, representativa do grupo HE-T, não houve formação de biofilme.



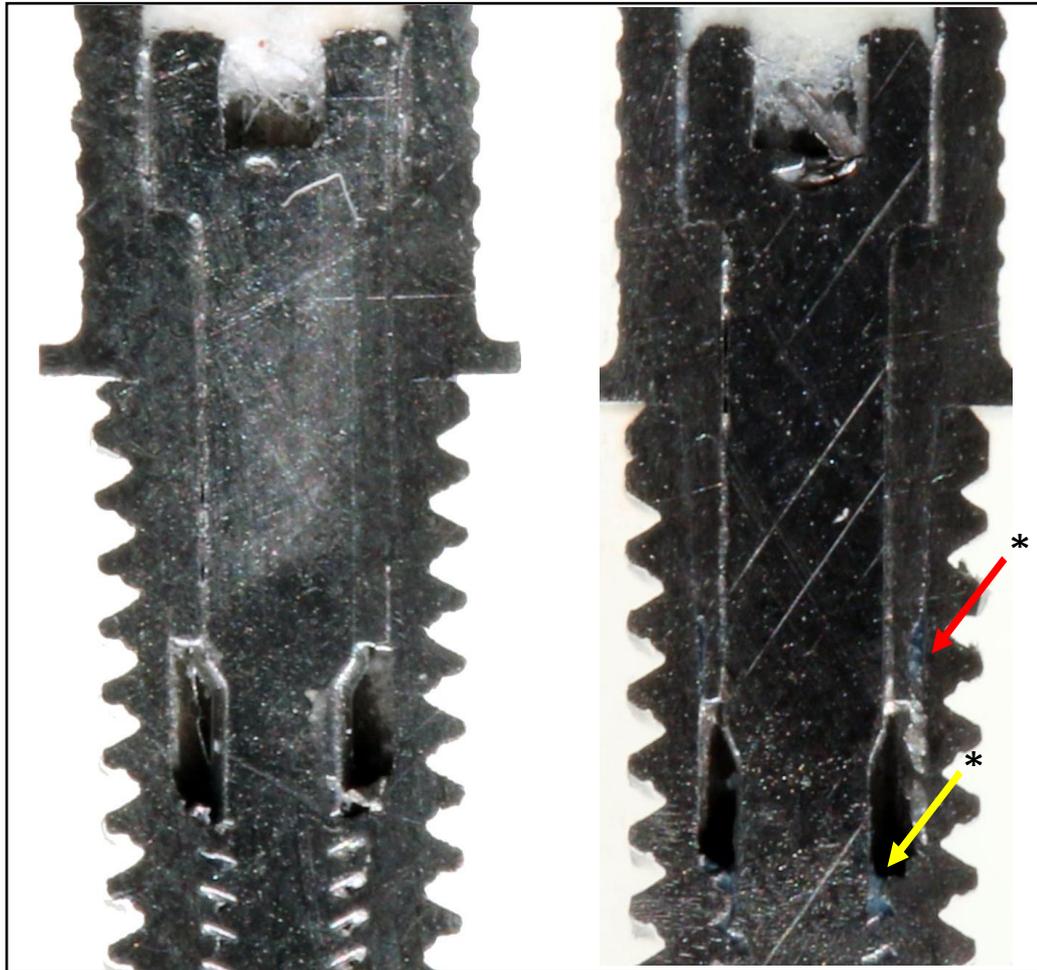
**Figura 16:** Imagens das micrografias obtidas por meio da MEV dos implantes hexágono externo na presença de biofilme misto aos 7 dias. **A:** Parte indexadora do pilar protético do grupo HE--C. **B:** Parte indexadora do pilar protético do grupo HE-T. **C:** Magnificação de 100X da região demonstrando a presença de biofilme no pilar do grupo HE-C. **D:** Magnificação de 100X da região demonstrando a superfície do pilar do grupo HE-T. **E:** Magnificação 1000X do biofilme formado no pilar do grupo HE-C. **F:** Magnificação de 1000X da região do pilar do grupo HE-T. Formas retangulares indicam o local de aproximação. Forma circular indica a presença de biofilme.

#### 4. Análise visual das junções parafusadas com e sem o agente de vedação

A **Figura 17** e **18** mostram as imagens obtidas dos espécimes com conexão CM seccionados longitudinalmente. Isto possibilitou visualizar o interior dessas conexões, a relação entre as estruturas e a presença do agente de vedação no grupo CM-T, indicado pela seta vermelha que mostra a presença do agente de vedação na interface pilar/implante, enquanto a seta amarela aponta o agente de vedação por entre as roscas do parafuso de retenção e a rosca interna do implante, na porção mais superior da junção parafusada. Já no CM-C, é possível verificar a ausência de material nessas interfaces.

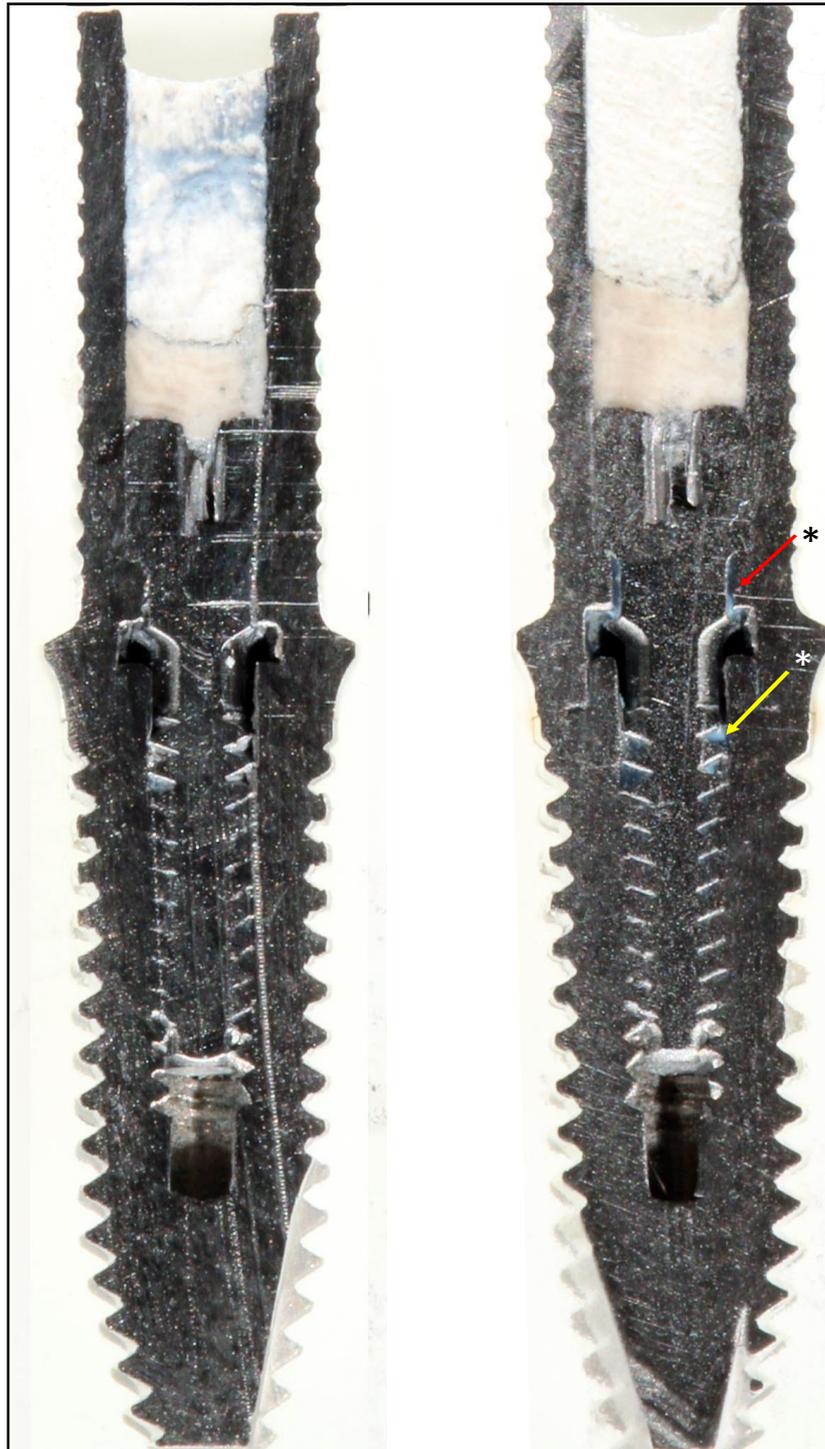


**Figura 17:** Imagens fotográficas dos cortes longitudinal do longo eixo dos espécimes CM-C e CM-T, no qual é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada.

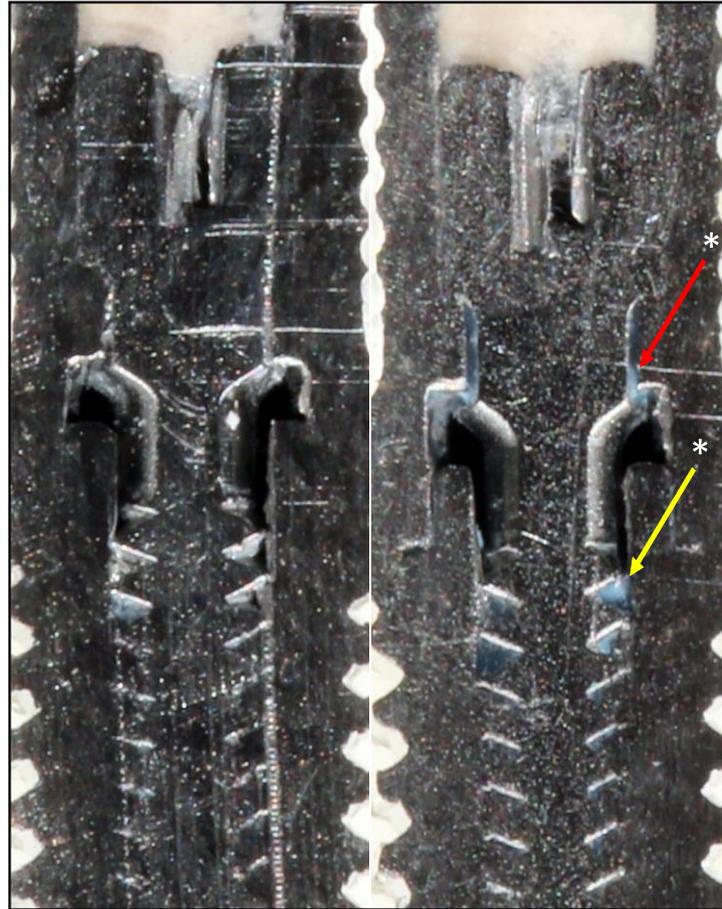


**Figura 18:** Imagens fotográficas dos cortes longitudinal do longo eixo dos espécimes CM-C e CM-T em maior aumento, no qual é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada.

A **Figura 19 e 20**, mostram as imagens obtidas dos implantes HE seccionados ao meio, o que foi possível visualizar que no grupo HE-T, a seta vermelha mostra a presença do agente de vedação no pilar protético na interface pilar/implante, enquanto a seta amarela aponta o local onde é possível visualizar o agente de vedação por entre as roscas na porção mais superior da junção parafusada. Já no HE-C, nestes espaços não é possível identificar a presença de nenhum material.



**Figura 19:** Imagens fotográficas dos cortes coronais do longo eixo dos implantes HE-C e HE-T onde é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada



**Figura 20:** Imagens fotográficas em maior aumento dos cortes coronais do longo eixo dos implantes HE-C e HE-T onde é possível observar a presença do agente de vedação na junção parafusada e interface pilar/implante. \*Seta vermelha identifica a presença do material na interface pilar/implante e seta amarela na junção parafusada

## ***Discussão***

A primeira hipótese deste estudo de que não haveria diferença estatisticamente significativa na infiltração microbiana no interior de implantes osseointegráveis, independentemente do tipo de conexão avaliada foi negada

Comparando os grupos controles das duas conexões avaliadas (cone Morse e hexágono externo) quando da inoculação na forma isolada dos dois biofilmes (*E. faecalis* e *C. albicans*), foi observado infiltração sem que houvesse diferença significativa entre eles nos dois períodos avaliados (7 e 14 dias) (**Figuras 10 e 11**). Ou seja, nenhuma das conexões avaliadas foi capaz de impedir a infiltração dos biofilmes quando não foi usado o agente de vedação.

Entretanto, quando os microrganismos foram inoculados em conjunto na forma mista, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de conexão hexagonal externa em relação aos grupos de conexão do tipo cone Morse (**Figura 12**). Nessa análise, não houve crescimento microbiano e infiltração destes para o interior do implante, quer seja nos grupos controles ou testes, tanto aos 7 quanto aos 14 dias.

É sabido que diferentes geometrias na interface pilar-implante podem interferir na penetração de microrganismos ao interior dos implantes (Koutouzis, Wallet et al. 2011). Neste sentido, o presente resultado, difere de relatos da literatura (Steinebrunner, Wolfart et al. 2005, Aloise, Curcio et al. 2010, do Nascimento, Miani et al. 2012, Canullo, Penarrocha-Oltra et al. 2015) que afirmam que a conexão do tipo cone Morse é superior no que se diz respeito à infiltração microbiana.

Entretanto, em um estudo que avalia a infiltração de água associada com corante a base de violeta genciana na interface pilar-implante com diferentes conexões (Gross, Abramovich et al. 1999), foi observado que o grupo de implantes com conexão interna cone Morse apresentou o maior valor referente à infiltração, enquanto a conexão externa, apresentou

valor significativamente inferior ( $0.071 \pm 0.028$ ). Ricomini Filho (2010), avaliaram a infiltração de *Streptococcus sanguinis* no interior de implantes de conexão hexagonal externa e cone Morse submetidos à ciclagem mecânica. Relataram que no grupo de conexões cone Morse, houve diferença significativa mostrando infiltração bacteriana até 67% maior comparado aos grupos de conexões hexagonal externa, independentemente se foram submetidos à ciclagem mecânica ou não. Enquanto no grupo hexágono externo não foi observada a presença de bactérias em nenhuma parte do implante ou em seu componente protético, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

Podemos inferir que este resultado deve-se ao fato de que o hexágono externo presente na plataforma de conexão do implante possa ter agido como barreira física, o que possivelmente impediu que os microrganismos da interface penetrassem no implante (Ricomini Filho, Fernandes et al. 2010) e ainda, o fato do presente estudo *in vitro* ter sido conduzido de forma estática, pode ter dificultado a movimentação dos microrganismos em direção ao interior do implante. Essa pode ser considerada uma limitação do presente estudo, pois esta situação estática não mimetiza o que de fato ocorre na cavidade bucal com variações de temperatura e forças que incidem direta e indiretamente sobre o conjunto pilar/implante.

Outro aspecto a considerar diz respeito ao torque aplicado no parafuso de retenção do pilar. Diversos estudos têm abordado esse tema e demonstrado a importância do valor de torque aplicado para a manutenção da integridade das junções parafusadas (McGlumphy, Mendel et al. 1998, Bulaqi, Mousavi Mashhadi et al. 2015). Isto porque, uma vez aplicado, este torque desenvolve uma força compressiva de aperto entre as partes que mantêm os componentes unidos, chamada pré-carga (McGlumphy, Mendel et al. 1998, Byrne, Jacobs et al. 2006). Quando o valor de forças externas, como a força da mastigação, excede o valor da pré-carga, ocorre o afrouxamento do parafuso de retenção e, por conseguinte, à perda da justa adaptação

do pilar protético fazendo com que ocorra o aumento do *gap* na interface pilar/implante (Byrne, Jacobs et al. 2006), podendo ser determinante na infiltração de microrganismos nesta interface.

Um fato observado e que pode ter influenciado os resultados é a diferença no valor de toque recomendado pelo fabricante e aplicado nos parafusos de retenção do pilar para conexão HE e para CM (30N.cm e 20N.cm, respectivamente). Estes valores são, de modo geral, utilizados por diversas marcas de implantes. Entretanto, o estudo de Silva-Neto (2012) avaliou a infiltração de quantidades variadas de *Escherichia coli* (0,5µl, 1,0µl e 1,5µl) em implantes de hexágono-externo associados a pilares parafusados com diferentes valores de torque (10N/cm, 20N/cm e 32N/cm). Observaram que nos implantes cujos pilares foram parafusados com torque de 32N/cm, nenhum dos espécimes apresentou infiltração microbiana. Este valor de torque é próximo do valor que foi utilizado no presente para os grupos de HE, podendo ter sido suficiente para manter o contato ideal e embricamento das peças.

Ao contrário, a conexão cone Morse apresentou infiltração e formação de biofilme, indicando que mesmo tendo sido aplicado o torque indicado pelo fabricante este pode não ter sido suficiente para o selamento da interface. Esse resultado contraria parte importante da literatura científica que tem demonstrado a eficácia dessa conexão na contenção da infiltração microbiana em sua interface (do Nascimento, Miani et al. 2012, Koutouzis, Mesia et al. 2014, Prado, Pereira et al. 2017)

No caso de biofilmes mistos, os microrganismos estabelecem interações que podem favorecer ou não sua proliferação e atividade metabólica. Garsin e Lorenz (2013), avaliaram biofilmes mistos de *C. albicans* e *E. faecalis* e afirmaram que ocorrem interações específicas entre estes dois patógenos que resultam em relação potencialmente sinérgica, ou seja, uma ação cooperativa entre os microrganismos o que faz com que, na presença de um o outro é mais favorecido do que quando isolado e vice-versa.

Neste estudo também foi possível avaliar períodos de tempo diferentes e sua influência na infiltração microbiana em implantes dentários. Quando isolados, os microrganismos avaliados apresentaram comportamento diferente em relação à sua capacidade de infiltrar na interface pilar/implante e no interior do implante em comparação aos ensaios com inoculação mista. No período de 7 dias (**Figuras 10 e 11**), houve crescimento de microrganismos apenas nos grupos controle (CMC e HEC para *C. albicans* e para *E. faecalis*) e os grupos testes (CMT e HET para *C. albicans* e CMT e HET para *E. faecalis*) se mantiveram livres da formação de biofilmes no interior dos implantes. Dessa forma, ficou evidente a eficácia do material de vedação no selamento da interface pilar/implante no período de 7 dias para biofilmes isolados de *C. albicans* e *E. faecalis*. O que nega a segunda hipótese deste estudo de que não haveria diferença estatística significativa para infiltração microbiana e formação de biofilmes entre os grupos testes e os controles, independente da conexão e período avaliado.

No período de 14 dias, o grupo CMT para *E. faecalis* apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo CMC. O resultado indica que houve crescimento bacteriano para CM-T, ainda que em menor escala (**Figura 10**) (CM-T:  $5,45 \pm 0,49$  e CM-C:  $0,98 \pm 1,95$ ). Isso mostra que houve efeito do material na contenção da infiltração de *E. faecalis*, porém em menor escala quando comparado ao grupo HE-T. O que é justificável pelo que já foi abordado anteriormente em relação às diferentes designs e propriedades de cada conexão. Dessa forma, fica evidente que houve eficácia do material na vedação da interface pilar-implante, independente do período de avaliação para *E. faecalis*.

Entretanto, no que diz respeito ao grupo *C. albicans* aos 14 dias, não foi observado crescimento de colônias nos grupos teste, independente da conexão (**Figura 11**). Demonstrando que houve melhor eficácia do material de vedação para *C. albicans* comparado ao *E. faecalis*. Estes fatos negam a primeira hipótese de nulidade deste estudo de que não haveria diferença

significante na infiltração de *C. albicans* e *E. faecalis* quando inoculados isoladamente, independente da conexão e do período avaliado.

Em 1997, Jansen e Conrads (1997) demonstraram que o tamanho do gap na interface pilar/implante varia de acordo com o tipo de conexão e as características estruturais do *abutment* protético. Além disso, verificaram que a média da distância vertical entre os componentes é de aproximadamente 0 a 10  $\mu\text{m}$  (Jansen, Conrads et al. 1997, Bondan, Oshima et al. 2009) e que a distância horizontal é de 60  $\mu\text{m}$  (Byrne, Houston et al. 1998, Kano, Binon et al. 2006). Apesar disso, a não formação de biofilme nos grupos teste para *C. albicans* não surpreende devido à morfologia do fungo, uma vez que *C. albicans* são fisicamente grandes (4 a 6  $\mu\text{m}$ ) (Silva, Pires et al. 2013) e possuem altas quantidades de hifas e pseudo-hifas em sua forma, o que pode ter limitado sua mobilidade por entre as peças nos grupos teste, pois nestes havia, além do embricamento das peças da junção parafusada, a presença do agente de vedação que contribuiu evitando a entrada dos microrganismos no interior do implante. (Fidel, Vazquez et al. 1999, Silva, Pires et al. 2013)

Este fato pode ser comprovado pelas fotografias (**Figuras 17, 18, 19 e 20**) que mostram que o agente de vedação ocupa um espaço importante na interface pilar/implante e na junção parafusada, o que funciona como barreira física, impedindo a entrada de microrganismos maiores como a *C. albicans*. As imagens fotográficas (**Figura 17, 18, 19 e 20**) corroboram com as análises de MEV (**Figura 13, 14, 15, 16**), as quais apresentam biofilmes na região mais externa do implante, ainda que não tenha sido observado o crescimento (UFC/mL) do que foi coletado do interior do implante, mesmo em biofilmes mais espessos. Assim, mesmo que a infiltração no *gap* formado entre o implante e o pilar seja inevitável (Smith and Turkyilmaz 2014), é possível impedir que microrganismos adentrem à câmara do implante, auxiliando na prevenção da doença peri-implantar.

Biofilmes multiespécies são caracterizados pelo alto nível de organização microbiana, incluindo sinalização em resposta ao número e identidade das células presentes e dos arredores, além de grande deposição de matriz extracelular (Subramani, Jung et al. 2009, Dhir 2013). A formação do biofilme trata-se de um processo complexo e pode alojar diversos tipos de relações de cooperação entre os microrganismos que o compõem (Garsin and Lorenz 2013). Sendo assim, é natural que este biofilme se torne cada vez mais espesso, como ocorreu com os biofilmes mistos de *C. albicans* e *E. faecalis*, que se acentuou pela relação sinérgica existente entre eles (Garsin and Lorenz 2013).

Na análise com biofilmes isolados, houve diferença significativa entre os grupos CMT-7 dias e CMT-14 dias para *E. faecalis*, com crescimento microbiano apenas aos 14 dias (**Figura 10**). Na análise com biofilme misto para este microrganismo, também houve diferença estatística significativa entre estes grupos, com crescimento microbiano apenas aos 7 dias. Acredita-se que devido à espessura do biofilme misto aos 14 dias, os microrganismos não conseguiram atravessar a interface pilar/implante e penetrar no implante na presença do agente de vedação, ao contrário do que aconteceu aos 14 dias no biofilme isolado de *E. faecalis*.

É importante ressaltar ainda, que o agente de vedação utilizado mantém uma das principais características e vantagens das próteses parafusadas, a reversibilidade, o que torna possível realizar o afrouxamento da peça protética com o auxílio de um torquímetro manual, o que permite modificações, reparos, ajustes e manutenções das próteses parafusadas (Crespi, Cappare et al. 2014, Seloto CB\*, Silva EA et al. 2015, Seloto, Strazzi Sahyon et al. 2017)

Considerando os resultados e sua variabilidade para biofilme isolado ou misto, fica evidente que o uso do agente de vedação foi eficaz para conter a infiltração dos microrganismos testados. No entanto, são necessárias outras pesquisas testando outros microrganismos e combinações, análises mecânicas, assim como avaliação das propriedades desse material em relação à sua biocompatibilidade celular e resposta tecidual a fim de verificar as reações do organismo quando em contato com este produto. Uma vez que apresente adequados resultados

biológicos seu uso e acompanhamento odontológico do paciente é de fundamental importância para o bom funcionamento biomecânico e avaliação tecidual peri-implantar a fim de aumentar a previsibilidade dos tratamentos com implantes osseointegrados reabilitados com próteses que usam junções parafusadas.

## *Conclusão*

Com base nos resultados obtidos e respeitando as limitações do estudo foi possível concluir que a presença do agente de vedação interferiu positivamente na infiltração de biofilmes isolados de *E. faecalis* e *C. albicans* para o interior dos implantes independente do período avaliado, uma vez que as conexões por si só não foram capazes de impedir essa infiltração.

Para biofilmes mistos, a conexão hexagonal externa foi mais eficaz contra a infiltração microbiana, independente do microrganismo, tempo e uso do agente de vedação. Para a conexão cone Morse, o agente de vedação foi eficaz apenas no período de 14 dias.

## Referências

Akcali, A., A. Trullenque-Eriksson, C. Sun, A. Petrie, L. Nibali and N. Donos (2017). "What is the effect of soft tissue thickness on crestal bone loss around dental implants? A systematic review." Clin Oral Implants Res **28**(9): 1046-1053.

Aloise, J. P., R. Curcio, M. Z. Laporta, L. Rossi, A. M. da Silva and A. Rapoport (2010). Microbial leakage through the implant-abutment interface of Morse taper implants in vitro. Clin Oral Implants Res. Denmark. **21**: 328-335.

Berglundh, T., L. Persson and B. Klinge (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. J Clin Periodontol. Denmark. **29 Suppl 3**: 197-212; discussion 232-193.

Bondan, J. L., H. M. Oshima, R. M. Segundo, R. S. Shinkai, E. G. Mota and K. R. Meyer (2009). "Marginal fit analysis of premachined and castable UCLA abutments." Acta Odontol Latinoam **22**(2): 139-142.

Broggini, N., L. M. McManus, J. S. Hermann, R. Medina, R. K. Schenk, D. Buser and D. L. Cochran (2006). Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. J Dent Res. United States. **85**: 473-478.

Broggini, N., L. M. McManus, J. S. Hermann, R. U. Medina, T. W. Oates, R. K. Schenk, D. Buser, J. T. Mellonig and D. L. Cochran (2003). "Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface." J Dent Res **82**(3): 232-237.

Bulaqi, H. A., M. Mousavi Mashhadi, H. Safari, M. M. Samandari and F. Geramipannah (2015). "Dynamic nature of abutment screw retightening: finite element study of the effect of retightening on the settling effect." J Prosthet Dent **113**(5): 412-419.

Busscher, H. J. and H. C. van der Mei (1997). "Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation." Adv Dent Res **11**(1): 24-32.

Byrne, D., F. Houston, R. Cleary and N. Claffey (1998). "The fit of cast and premachined implant abutments." J Prosthet Dent **80**(2): 184-192.

Byrne, D., S. Jacobs, B. O'Connell, F. Houston and N. Claffey (2006). Preloads generated with repeated tightening in three types of screws used in dental implant assemblies. J Prosthodont. United States. **15**: 164-171.

Calcaterra, R., M. Di Girolamo, C. Mirisola and L. Baggi (2016). "Effects of Repeated Screw Tightening on Implant Abutment Interfaces in Terms of Bacterial and Yeast Leakage in Vitro: One-Time Abutment Versus the Multiscrewing Technique." Int J Periodontics Restorative Dent **36**(2): 275-280.

Canullo, L., D. Penarrocha-Oltra, C. Soldini, F. Mazzocco, M. Penarrocha and U. Covani (2015). "Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading." Clin Oral Implants Res **26**(4): 426-434.

Canullo, L., P. H. Rossetti and D. Penarrocha (2015). "Identification of *Enterococcus Faecalis* and *Pseudomonas Aeruginosa* on and in Implants in Individuals with Peri-implant Disease: A Cross-Sectional Study." Int J Oral Maxillofac Implants **30**(3): 583-587.

Cavalcanti, A. G., F. T. Fonseca, C. D. Zago, R. B. Brito Junior and F. M. Franca (2016). "Efficacy of Gutta-Percha and Polytetrafluoroethylene Tape to Microbiologically Seal the Screw Access Channel of Different Prosthetic Implant Abutments." Clin Implant Dent Relat Res **18**(4): 778-787.

Cortelli, J. R., D. R. Aquino, S. C. Cortelli, G. C. Nobre Franco, C. B. Fernandes, C. V. Roman-Torres and F. O. Costa (2008). "Detection of periodontal pathogens in oral mucous membranes of edentulous individuals." J Periodontol **79**(10): 1962-1965.

Cortelli, S. C., J. R. Cortelli, R. L. Romeiro, F. O. Costa, D. R. Aquino, P. R. Orzechowski, V. C. Araujo and P. M. Duarte (2013). Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. Arch Oral Biol. England, 2012 Elsevier Ltd. **58**: 67-74.

Crespi, R., P. Cappare, G. Gastaldi and E. F. Gherlone (2014). "Immediate occlusal loading of full-arch rehabilitations: screw-retained versus cement-retained prosthesis. An 8-year clinical evaluation." Int J Oral Maxillofac Implants **29**(6): 1406-1411.

De Mori, R., C. F. Ribeiro, L. R. da Silva-Concilio and A. C. Claro Neves (2014). "Evaluation of castable and premachined metal base abutment/implant interfaces before and after cyclical load." Implant Dent **23**(2): 212-217.

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

Dias, E. C., E. D. Bisognin, N. D. Harari, S. J. Machado, C. P. da Silva, G. D. Soares and G. M. Vidigal, Jr. (2012). "Evaluation of implant-abutment microgap and bacterial leakage in five external-hex implant systems: an in vitro study." Int J Oral Maxillofac Implants **27**(2): 346-351.

do Nascimento, C., R. E. Barbosa, J. P. Issa, E. Watanabe, I. Y. Ito and R. F. Albuquerque, Jr. (2008). Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. Int J Oral Maxillofac Surg. Denmark. **37**: 177-180.

do Nascimento, C., P. K. Miani, V. Pedrazzi, R. B. Goncalves, R. F. Ribeiro, A. C. Faria, A. P. Macedo and R. F. de Albuquerque, Jr. (2012). "Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions." Int J Oral Maxillofac Implants **27**(3): 551-560.

do Nascimento, C., M. S. Pita, P. L. Calefi, T. S. de Oliveira Silva, J. B. Dos Santos and V. Pedrazzi (2016). "Different sealing materials preventing the microbial leakage into the screw-retained implant restorations: an in vitro analysis by DNA checkerboard hybridization." Clin Oral Implants Res.

Duarte, A. R., P. H. Rossetti, L. M. Rossetti, S. A. Torres and W. C. Bonachela (2006). "In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces." J Periodontol **77**(11): 1828-1832.

Ericsson, I., L. G. Persson, T. Berglundh, C. P. Marinello, J. Lindhe and B. Klinge (1995). "Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues." J Clin Periodontol **22**(3): 255-261.

Fernandes, C. B., D. R. Aquino, G. C. Franco, S. C. Cortelli, F. O. Costa and J. R. Cortelli (2010). "Do elderly edentulous patients with a history of periodontitis harbor periodontal pathogens?" Clin Oral Implants Res **21**(6): 618-623.

Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez and J. D. Sobel (1999). "Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans." Clin Microbiol Rev **12**(1): 80-96.

Flanagan, D. (2017). "Enterococcus faecalis and Dental Implants." J Oral Implantol **43**(1): 8-11.

Garsin, D. A. and M. C. Lorenz (2013). "Candida albicans and Enterococcus faecalis in the gut: synergy in commensalism?" Gut Microbes **4**(5): 409-415.

Gehrke, S. A. and A. Pereira Fde (2014). "Changes in the abutment-implant interface in Morse taper implant connections after mechanical cycling: a pilot study." Int J Oral Maxillofac Implants **29**(4): 791-797.

Gibbons, R. J. and J. van Houte (1973). "On the formation of dental plaques." J Periodontol **44**(6): 347-360.

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

Guiotti, A. M., B. G. Cunha, M. B. Paulini, M. C. Goiato, D. M. Dos Santos, C. Duque, K. S. Caiaffa, D. A. Brandini, D. T. Narciso de Oliveira, N. S. Brizzotti and M. T. Gottardo de Almeida (2016). Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. J Prosthet Dent. United States, 2016

Editorial Council for the Journal of Prosthetic Dentistry. Published by Elsevier Inc. **116**: 136-143.

Harriott, M. M. and M. C. Noverr (2010). "Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3746-3755.

Jansen, V. K., G. Conrads and E. J. Richter (1997). "Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface." Int J Oral Maxillofac Implants **12**(4): 527-540.

Kano, S. C., P. Binon, G. Bonfante and D. A. Curtis (2006). Effect of casting procedures on screw loosening in UCLA-type abutments. J Prosthodont. United States, 2006 by The American College of Prosthodontists. **15**: 77-81.

Koutouzis, T., H. Gadalla and T. Lundgren (2016). "Bacterial Colonization of the Implant-Abutment Interface (IAI) of Dental Implants with a Sloped Marginal Design: An in-vitro Study." Clin Implant Dent Relat Res **18**(1): 161-167.

Koutouzis, T., R. Mesia, N. Calderon, F. Wong and S. Wallet (2014). "The effect of dynamic loading on bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study." J Oral Implantol **40**(4): 432-437.

Koutouzis, T., S. Wallet, N. Calderon and T. Lundgren (2011). "Bacterial colonization of the implant-abutment interface using an in vitro dynamic loading model." J Periodontol **82**(4): 613-618.

Listgarten, M. A. (1999). "Microorganisms and dental implants." J Periodontol **70**(2): 220-222.

Lucena-Ferreira, S. C., A. P. Ricomini-Filho, W. J. Silva, J. A. Cury and A. A. Cury (2014). "Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm." Clin Oral Investig **18**(9): 2179-2185.

McGlumphy, E. A., D. A. Mendel and J. A. Holloway (1998). "Implant screw mechanics." Dent Clin North Am **42**(1): 71-89.

Nayak, A. G., A. Fernandes, R. Kulkarni, G. S. Ajantha, K. Lekha and R. Nadiger (2014). "Efficacy of antibacterial sealing gel and O-ring to prevent microleakage at the implant abutment interface: an in vitro study." J Oral Implantol **40**(1): 11-14.

Percival, S. L., S. M. McCarty and B. Lipsky (2015). "Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence." Adv Wound Care (New Rochelle) **4**(7): 373-381.

Pjetursson, B. E., K. Tan, N. P. Lang, U. Bragger, M. Egger and M. Zwahlen (2004). A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. Clin Oral Implants Res. Denmark. **15**: 667-676.

Prado, A. M., J. Pereira, F. S. Silva, B. Henriques, R. M. Nascimento, C. A. M. Benfatti, J. Lopez-Lopez and J. C. M. Souza (2017). "Wear of Morse taper and external hexagon implant joints after abutment removal." J Mater Sci Mater Med **28**(5): 65.

Quirynen, M., G. Alsaadi, M. Pauwels, A. Haffajee, D. van Steenberghe and I. Naert (2005). "Microbiological and clinical outcomes and patient satisfaction for two treatment options in the edentulous lower jaw after 10 years of function." Clin Oral Implants Res **16**(3): 277-287.

Quirynen, M., C. M. Bollen, H. Eyssen and D. van Steenberghe (1994). "Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study." Clin Oral Implants Res **5**(4): 239-244.

Quirynen, M., R. Vogels, W. Peeters, D. van Steenberghe, I. Naert and A. Haffajee (2006). Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. Clin Oral Implants Res. Denmark. **17**: 25-37.

Ricomini Filho, A. P., F. S. Fernandes, F. G. Straioto, W. J. da Silva and A. A. Del Bel Cury (2010). "Preload loss and bacterial penetration on different implant-abutment connection systems." Braz Dent J **21**(2): 123-129.

Safii, S. H., R. M. Palmer and R. F. Wilson (2010). "Risk of implant failure and marginal bone loss in subjects with a history of periodontitis: a systematic review and meta-analysis." Clin Implant Dent Relat Res **12**(3): 165-174.

Sanchez, M. C., A. Llama-Palacios, E. Fernandez, E. Figuero, M. J. Marin, R. Leon, V. Blanc, D. Herrera and M. Sanz (2014). 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. England, 2014 Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Ltd. **30**: 1161-1171.

Schou, S. (2008). "Implant treatment in periodontitis-susceptible patients: a systematic review." J Oral Rehabil **35 Suppl 1**: 9-22.

Seloto, C. B., H. B. Strazzi Sahyon, P. H. Dos Santos, J. A. Delben and W. G. Assuncao (2017). "Efficacy of Sealing Agents on Preload Maintenance of Screw-Retained Implant-Supported Protheses." Int J Oral Maxillofac Implants.

Seloto CB\*, Silva EA, Danieletto CF, Sahyon HBS, Rodrigues FI, Oliveira B, Pereira JC and A. WG (2015). Eficácia de materiais de vedação na manutenção da pré-carga em junções parafusadas, Brazilian Oral Research. **29**: 485.

Silva, S., P. Pires, D. R. Monteiro, M. Negri, L. F. Gorup, E. R. Camargo, D. B. Barbosa, R. Oliveira, D. W. Williams, M. Henriques and J. Azeredo (2013). "The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic." Med Mycol **51**(2): 178-184.

Silva-Neto, J. P., M. S. Prudente, A. Carneiro Tde, M. A. Nobilo, M. P. Penatti and F. D. Neves (2012). "Micro-leakage at the implant-abutment interface with different tightening torques in vitro." J Appl Oral Sci **20**(5): 581-587.

Small, P. N. and D. P. Tarnow (2000). "Gingival recession around implants: a 1-year longitudinal prospective study." Int J Oral Maxillofac Implants **15**(4): 527-532.

Smith, N. A. and I. Turkyilmaz (2014). Evaluation of the sealing capability of implants to titanium and zirconia abutments against *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* under different screw torque values. J Prosthet Dent. United States,

2014 Editorial Council for the Journal of Prosthetic Dentistry. Published by Elsevier Inc. **112**: 561-567.

Steinebrunner, L., S. Wolfart, K. Bossmann and M. Kern (2005). "In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems." Int J Oral Maxillofac Implants **20**(6): 875-881.

Subramani, K., R. E. Jung, A. Molenberg and C. H. Hammerle (2009). "Biofilm on dental implants: a review of the literature." Int J Oral Maxillofac Implants **24**(4): 616-626.

Swierkot, K., P. Lottholz, L. Flores-de-Jacoby and R. Mengel (2012). "Mucositis, peri-implantitis, implant success, and survival of implants in patients with treated generalized aggressive periodontitis: 3- to 16-year results of a prospective long-term cohort study." J Periodontol **83**(10): 1213-1225.

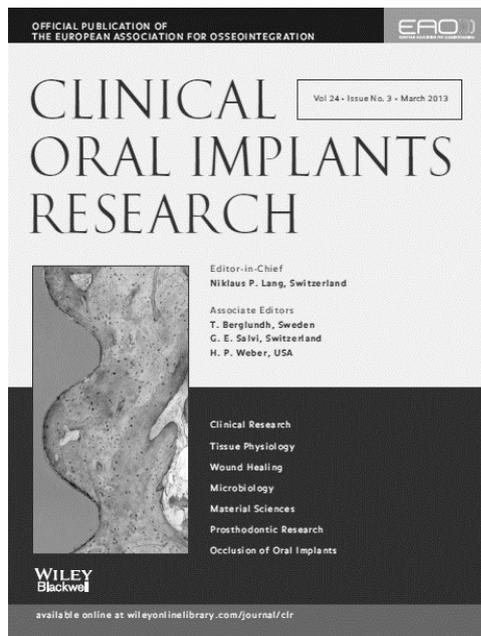
Tripodi, D., G. Vantaggiato, A. Scarano, V. Perrotti, A. Piattelli, G. Iezzi and S. D'Ercole (2012). An in vitro investigation concerning the bacterial leakage at implants with internal hexagon and Morse taper implant-abutment connections. Implant Dent. United States. **21**: 335-339.

Yoda, I., H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda and M. Osaki (2014). "Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion." BMC Microbiol **14**: 234.

Zago, C. E., S. Silva, P. V. Sanita, P. A. Barbugli, C. M. Dias, V. B. Lordello and C. E. Vergani (2015). "Dynamics of biofilm formation and the interaction between Candida albicans and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant Staphylococcus aureus (MRSA)." PLoS One **10**(4): e0123206.

## Anexos

### ANEXO A - Normas para publicação no periódico pretendido



#### “Clinical Oral Implants Research”

**ISSN: 1600-0501**

*Clinical Oral Implants Research* conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

#### ***Clinical Oral Implants Research* publisher:**

- Original research articles
- Review articles
- Case reports and case series
- Novel developments
- Short communications of important research findings
- Treatment rational by experts

**Impact fator:** 3.624

**Qualis CAPES:** A1

**Endereço eletrônico:**

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600-0501/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600-0501/homepage/ForAuthors.html)

**ANEXO B - Análise estatística de biofilmes isolados**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Ef7d	Tukey HSD	CM controle	CM teste	4,94352*	,30291	,000	4,1228	5,7642
			HE controle	-,26498	,30291	,818	-1,0857	,5557
			HE teste	4,94352*	,30291	,000	4,1228	5,7642
		CM teste	CM controle	-4,94352*	,30291	,000	-5,7642	-4,1228
			HE controle	-5,20849*	,30291	,000	-6,0292	-4,3878
			HE teste	,00000	,30291	1,000	-,8207	,8207
		HE controle	CM controle	,26498	,30291	,818	-,5557	1,0857
			CM teste	5,20849*	,30291	,000	4,3878	6,0292
			HE teste	5,20849*	,30291	,000	4,3878	6,0292
		HE teste	CM controle	-4,94352*	,30291	,000	-5,7642	-4,1228
			CM teste	,00000	,30291	1,000	-,8207	,8207
			HE controle	-5,20849*	,30291	,000	-6,0292	-4,3878
	Bonferroni	CM controle	CM teste	4,94352*	,30291	,000	4,0916	5,7954
			HE controle	-,26498	,30291	1,000	-1,1169	,5869
			HE teste	4,94352*	,30291	,000	4,0916	5,7954
		CM teste	CM controle		,30291	,000	-5,7954	-4,0916
			HE controle	-5,20849*	,30291	,000	-6,0604	-4,3566
			HE teste	,00000	,30291	1,000	-,8519	,8519
		HE controle	CM controle	,26498	,30291	1,000	-,5869	1,1169
			CM teste	5,20849*	,30291	,000	4,3566	6,0604
			HE teste	5,20849*	,30291	,000	4,3566	6,0604
		HE teste	CM controle	-4,94352*	,30291	,000	-5,7954	-4,0916
			CM teste	,00000	,30291	1,000	-,8519	,8519
			HE controle	-5,20849*	,30291	,000	-6,0604	-4,3566
Ca7d	Tukey HSD	CM controle	CM teste	4,85456*	,35577	,000	3,8700	5,8391
			HE controle	,26851	,39716	,905	-,8305	1,3676
			HE teste	4,85456*	,35577	,000	3,8700	5,8391
		CM teste	CM controle	-4,85456*	,35577	,000	-5,8391	-3,8700
			HE controle	-4,58605*	,33023	,000	-5,4999	-3,6722

		HE teste		,00000	,27909	1,000	-,7723	,7723
	HE controle	CM controle		-,26851	,39716	,905	-1,3676	,8305
		CM teste		4,58605*	,33023	,000	3,6722	5,4999
		HE teste		4,58605*	,33023	,000	3,6722	5,4999
	HE teste	CM controle		-4,85456*	,35577	,000	-5,8391	-3,8700
		CM teste		,00000	,27909	1,000	-,7723	,7723
		HE controle		-4,58605*	,33023	,000	-5,4999	-3,6722
Bonferroni	CM controle	CM teste		4,85456*	,35577	,000	3,8277	5,8814
		HE controle		,26851	,39716	1,000	-,8778	1,4148
		HE teste		4,85456*	,35577	,000	3,8277	5,8814
	CM teste	CM controle		-4,85456*	,35577	,000	-5,8814	-3,8277
		HE controle		-4,58605*	,33023	,000	-5,5392	-3,6329
		HE teste		,00000	,27909	1,000	-,8055	,8055
	HE controle	CM controle		-,26851	,39716	1,000	-1,4148	,8778
		CM teste		4,58605*	,33023	,000	3,6329	5,5392
		HE teste		4,58605*	,33023	,000	3,6329	5,5392
	HE teste	CM controle		-4,85456*	,35577	,000	-5,8814	-3,8277
		CM teste		,00000	,27909	1,000	-,8055	,8055
		HE controle		-4,58605*	,33023	,000	-5,5392	-3,6329
Ef14d	Tukey HSD	CM controle	CM teste	,85401*	,30162	,039	,0339	1,6742
			HE controle	,11975	,30162	,978	-,7004	,9399
			HE teste	5,22930*	,29262	,000	4,4336	6,0250
		CM teste	CM controle	-,85401*	,30162	,039	-1,6742	-,0339
			HE controle	-,73426	,31037	,106	-1,5782	,1097
			HE teste	4,37530*	,30162	,000	3,5551	5,1954
	HE controle	CM controle		-,11975	,30162	,978	-,9399	,7004
		CM teste		,73426	,31037	,106	-,1097	1,5782
		HE teste		5,10956*	,30162	,000	4,2894	5,9297
	HE teste	CM controle		-5,22930*	,29262	,000	-6,0250	-4,4336
		CM teste		-4,37530*	,30162	,000	-5,1954	-3,5551
		HE controle		-5,10956*	,30162	,000	-5,9297	-4,2894
Bonferroni	CM controle	CM teste		,85401*	,30162	,049	,0020	1,7060
		HE controle		,11975	,30162	1,000	-,7322	,9717
		HE teste		5,22930*	,29262	,000	4,4027	6,0559
	CM teste	CM controle		-,85401*	,30162	,049	-1,7060	-,0020

Ca14d		HE controle		-,73426	,31037	,148	-1,6110	,1424	
		HE teste		4,37530*	,30162	,000	3,5233	5,2273	
		HE controle	CM controle		-,11975	,30162	1,000	-,9717	,7322
			CM teste		,73426	,31037	,148	-,1424	1,6110
			HE teste		5,10956*	,30162	,000	4,2576	5,9615
		HE teste	CM controle		-5,22930*	,29262	,000	-6,0559	-4,4027
	CM teste			-4,37530*	,30162	,000	-5,2273	-3,5233	
	HE controle			-5,10956*	,30162	,000	-5,9615	-4,2576	
	Tukey HSD	CM controle	CM teste		3,97461*	,80903	,000	1,7788	6,1704
			HE controle		,76296	,83393	,797	-1,5004	3,0263
			HE teste		4,70505*	,80903	,000	2,5093	6,9008
		CM teste	CM controle		-3,97461*	,80903	,000	-6,1704	-1,7788
			HE controle		-3,21165*	,83393	,003	-5,4750	-,9483
			HE teste		,73045	,80903	,803	-1,4653	2,9262
		HE controle	CM controle		-,76296	,83393	,797	-3,0263	1,5004
			CM teste		3,21165*	,83393	,003	,9483	5,4750
			HE teste		3,94209*	,83393	,000	1,6788	6,2054
		HE teste	CM controle		-4,70505*	,80903	,000	-6,9008	-2,5093
			CM teste		-,73045	,80903	,803	-2,9262	1,4653
			HE controle		-3,94209*	,83393	,000	-6,2054	-1,6788
	Bonferroni	CM controle	CM teste		3,97461*	,80903	,000	1,6945	6,2547
			HE controle		,76296	,83393	1,000	-1,5873	3,1132
			HE teste		4,70505*	,80903	,000	2,4250	6,9851
		CM teste	CM controle		-3,97461*	,80903	,000	-6,2547	-1,6945
HE controle				-3,21165*	,83393	,003	-5,5619	-,8614	
HE teste				,73045	,80903	1,000	-1,5496	3,0105	
HE controle		CM controle		-,76296	,83393	1,000	-3,1132	1,5873	
		CM teste		3,21165*	,83393	,003	,8614	5,5619	
		HE teste		3,94209*	,83393	,000	1,5918	6,2924	
HE teste		CM controle		-4,70505*	,80903	,000	-6,9851	-2,4250	
		CM teste		-,73045	,80903	1,000	-3,0105	1,5496	
		HE controle		-3,94209*	,83393	,000	-6,2924	-1,5918	

**ANEXO C - Análise estatística de biofilms mistos**

**T student test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Efm7d	Equal variances assumed	,307	,590	1,514	12	,156	,55772	,36848	-,24512	1,36056
	Equal variances not assumed			1,511	10,855	,159	,55772	,36910	-,25598	1,37142
Cam7d	Equal variances assumed	31,646	,000	23,593	9	,000	5,20885	,22078	4,70941	5,70829
	Equal variances not assumed			21,297	4,000	,000	5,20885	,24459	4,52977	5,88793
Efm14d	Equal variances assumed	22,994	,000	26,656	13	,000	5,45839	,20477	5,01601	5,90076
	Equal variances not assumed			33,063	8,000	,000	5,45839	,16509	5,07769	5,83908
Cam14d	Equal variances assumed	90,091	,000	26,029	12	,000	5,24246	,20141	4,80363	5,68129
	Equal variances not assumed			30,367	7,000	,000	5,24246	,17264	4,83424	5,65068

**Student test**

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
					95% Confidence Interval of the Difference				
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper			
Pair 1	Efm7d - Efm14d	-,99728	1,02786	,36340	-1,85659	-,13797	-2,744	7	,029
Pair 2	Cam7d - Cam14d	-,15894	,76314	,34128	-1,10649	,78862	-,466	4	,666
Pair 3	Efm7d - Cam7d	-,63868	1,00326	,44867	-1,88439	,60702	-1,424	4	,228
Pair 4	Efm14d - Cam14d	,28367	,72764	,25726	-,32466	,89199	1,103	7	,307