



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

ROSSANA REIM DEL' GAUDIO PIGNATARO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO EM PARAFUSO
PROTÉTICO DE IMPLANTES REVESTIDO COM FILME DE CARBONO
TIPO DIAMANTE DOPADO COM PRATA DEPOSITADOS POR PLASMA**

ROSSANA REIM DEL' GAUDIO PIGNATARO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO EM PARAFUSO PROTÉTICO DE
IMPLANTES REVESTIDO COM FILME DE CARBONO TIPO DIAMANTE DOPADO
COM PRATA DEPOSITADOS POR PLASMA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Desempenho de Materiais Reabilitadores Protéticos.

Orientador: Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Júnior
Coorientadora: Profa. Dra. Laura Soares Souto Lepesqueur

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pignataro, Rossana Reim Del' Gaudio

Avaliação do efeito antimicrobiano em parafuso protético de implantes revestido com filme de carbono tipo diamante dopado com prata depositados por plasma / Rossana Reim Del' Gaudio Pignataro. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.

94 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Laffayette Nogueira Júnior

Coorientadora: Laura Soares Souto Lepesqueur

1. Implante dentário. 2. Propriedades de superfície. 3. Prata. 4. Adesão bacteriana. I. Nogueira Júnior, Laffayette, orient. II. Lepesqueur, Laura Soares Souto, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Junior (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Luís Ronaldo Picosse

Universidade de São Paulo (USP)

Instituto de Ciências Biomédicas

Campus São Paulo

Prof^a. Dr^a. Ligia Ferreira Gomes

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus São Paulo

Prof.^a Subst. Nathália de Carvalho Ramos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de junho de 2023

DEDICATÓRIA

Essa minha jornada profissional, eu dedico à Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, que mesmo sem eu compreender o porquê das coisas, tem planos para mim, me guia pelos caminhos mais imprevisíveis. E é sempre meu socorro na hora de angústia. Eu confio em Ti!

Aos meus pais, que foram o início de tudo e sempre me ensinaram, que estudar nunca é demais, e é herança que ninguém pode tirar.

Ao amor da minha vida e companheiro, Murilo, por sempre estar ao meu lado, mesmo nos meus momentos mais insanos, sendo cúmplice, amoroso e incentivador e que sem dúvida foi essencial nessa jornada.

Aos meus filhos, Enzo e Giulia, por toda paciência e para quem quero ser exemplo de que nunca é tarde para conquistar, basta ter dedicação, foco e objetivo.

Aos meus irmãos, que são presentes de Deus na vida e que sempre tem uma palavra de carinho!!

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora na pessoa do coordenador Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges.

Ao meu orientador Prof. Assoc. Lafayette Nogueira Júnior, cujo exemplo de dedicação e sucesso profissional inspira a mais profunda admiração, meu muito obrigada pela oportunidade, orientação, amizade e paciência durante todo curso e por ter me mostrado diferentes caminhos na profissão.

À Prof^ª. Tit. Cristiane Yumi Koga-Ito, pelo carinho comigo e o amor com que se dedica aos trabalhos. Uma profissional como você não se encontra a todo momento e ainda tive a oportunidade de ter convivido com o seu grupo que é formado de pessoas especiais, sempre prontas para contribuir comigo e no desenvolvimento da minha pesquisa na Microbiologia.

Aos professores do Instituto de Tecnologia da Aeronáutica- ITA, Argemiro Soares da Silva Sobrinho e André Luís de Jesus Pereira que com o amplo conhecimento de ambos, me ajudaram na parte principal do meu trabalho e sempre tiveram disponibilidade, paciência para me ensinar sobre plasma e outros assuntos que eu desconhecia. Muito obrigada!

Quero agradecer também ao Prof. Titular Marco Antonio Bottino, por todo apoio, atenção, amizade e carinho comigo. Sua experiência profissional é ímpar tanto no

meio acadêmico como na vida clínica e está sempre pronto a dividir seus conhecimentos.

A Equipe da Pós-graduação em Odontologia Restauradora, onde fui acolhida com tanto carinho e onde adquiri toda a minha experiência em pesquisa científica. Tenho muito orgulho em participar deste grupo.

À Mariana Vegian, uma parceira doce e determinante neste trabalho, que realizou comigo todos os experimentos microbiológicos. Passamos juntas todas os desafios de uma pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos de microbiologia. Os frutos deste trabalho também são seus.

Aos demais amigos da Microbiologia: Clélia e Diego. Obrigada por prontamente me ajudarem quando precisei, e pela convivência tão agradável durante este tempo.

As minhas amigas da pós-graduação e da vida: Ana Beatriz, Nathália Ramos e Joyce pela amizade, parceria e exemplo na minha caminhada. Obrigada por toda ajuda, suporte e ensinamentos.

Aos meus colegas de pós-graduação. Não vou ousar citar o nome de todos pois seria injusto esquecer de alguém, mas todos aqueles que estiveram comigo em algum momento durante esses 5 anos e meio de Unesp.

Thaís Paradella e Márcio Marques que são o pilar para o funcionamento do laboratório, estando sempre atentos as minhas necessidades. Obrigada por toda dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de demanda social – Código de Financiamento 88887.613195/2021-00.

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

Os planos de Deus são maiores e melhores que os seus.

Ele vê infinitamente.

Nós somente vemos o que está diante dos nossos olhos.

Creia, os sonhos de Deus são maiores que os seus.

E jamais serão frustrados.

Rossana Pignataro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Intercorrências na parte protética do implante.....	20
2.1.1 Complicações mecânicas	20
2.1.2 Complicações biológicas	24
2.2 Revestimento da superfície com propriedades antibacterianas	26
2.2.1 Filme de carbono tipo diamante (DLC)	26
2.2.2 Filme de DLC na área médica e odontológica	28
2.3 Deposição de DLC	30
2.3.1 Dopagem de nanopartículas metálicas no DLC e efeito bactericida ..	30
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Fluxograma	33
4.2 Determinação do padrão adequado de deposição do filme de DLC sobre a liga Ti6Al4V em formato de discos	35
4.2.1 Preparo das amostras	35
4.2.2 Deposição do filme de DLC	36
4.2.2.1 Reator de PECVD	36
4.2.2.2 Processos de deposição.....	39
4.3 Caracterização dos filmes de DLC	41
4.3.1 Perfilometria mecânica dos filmes de DLC e DLC-Ag	42
4.3.2 Análise de aderência dos filmes de DLC pela técnica de <i>scratch test</i>	43
4.3.3 Análise dos filmes de DLC por Espectroscopia de Espalhamento Raman.....	44
4.3.4 Ângulo de contato (goniometria)	45

4.3.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	46
4.4 Teste microbiológico.....	47
4.4.1 Cepas e preparo de materiais.....	47
4.4.2 Avaliação da ação antimicrobiana do DLC e DLC-Ag	48
4.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura no disco (MEV).....	51
4.6 Análise de citotoxicidade dos filmes de DLC e DLC-Ag	51
4.7 Avaliação da ação antimicrobiana utilizando parafuso	54
4.7.1 Avaliação da ação antimicrobiana na placa de cultura.....	54
4.7.2 Avaliação da infiltração e adesão bacteriana na interface implante/pilar protético	56
4.8 Análise estatística	59
5 RESULTADO	60
5.1 Caracterização	60
5.1.1 Perfilometria mecânica dos filmes de DLC e DLC-Ag.....	60
5.1.2 Análise de aderência dos filmes de DLC pela técnica de <i>scratch test</i>	61
5.1.3 Análise dos filmes de DLC por Espectroscopia de Espalhamento Raman.....	62
5.1.4 Ângulo de contato (goniometria)	64
5.1.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	65
5.2 Teste microbiológico.....	66
5.2.1 Atividade antimicrobiana do filme de DLC e DLC-Ag depositado sobre disco de Ti6Al4V sobre <i>Enterococcus faecalis</i>	66
5.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
5.3.1 MEV dos discos	67
5.3.2 MEV dos parafusos	69
5.4 Análise de citotoxicidade dos filmes de DLC e DLC-Ag	71
5.5 Avaliação da ação antimicrobiana na placa de cultura.....	72
5.6 Análise da infiltração e adesão bacteriana na interface implante/pilar protético	73
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da caracterização do material.....	33
Figura 2 – Fluxograma da citotoxicidade.....	34
Figura 3 – Fluxograma ensaio in vitro.....	34
Figura 4 – Representação esquemática da deposição do filme de DLC por PECVD	36
Figura 5 – Reator para deposição dos filmes de DLC por PECVD.....	37
Figura 6 – Diagrama esquemático do sistema de plasma indicando os seus principais componentes.....	38
Figura 7 – Reator de PECVD.....	38
Figura 8 – Reator.....	40
Figura 9 – Perfilômetro.....	42
Figura 10 – Indentador, trilha e as forças atuantes no <i>scratch test</i>	43

Figura 11 – Tribômetro.....	44
Figura 12 – Espectrofotômetro Raman.....	45
Figura 13 – Goniômetro.....	46
Figura 14 – Esterilização dos discos e parafusos.....	47
Figura 15 – Ensaio microbiológico de formação de biofilme de <i>E. faecalis</i> sobre discos metálicos.....	49
Figura 16 – Processo de sonicação do disco imerso em solução fisiológica.....	50
Figura 17 – Diluição seriada para contagem de UFC/ml.....	50
Figura 18 – Células de linhagem Fibroblastos (3T3)	52
Figura 19 – Etapas do ensaio de viabilidade celular MTT.....	53
Figura 20 – Modelo do teste microbiológico na placa de cultura.....	55
Figura 21 – Agitador com temperatura controlada.....	55

Figura 22 – Ensaio microbiológico de formação de biofilme de <i>E. faecalis</i> no implante.....	57
Figura 23 – Preparo do parafuso para diluição seriada.....	58
Figura 24 – Perfilometria mecânica.....	60
Figura 25 – Resultados dos testes de <i>scratch</i> dos recobrimentos de DLC e DLC-Ag.....	61
Figura 26 – Espectro Raman.....	62
Figura 27 – Ângulo de contato.....	64
Figura 28 – Análise de EDS do recobrimento de DLC-Ag depositado sobre silício (100)	65
Figura 29 – Mapa de elementos obtidos por meio de medidas de EDS.....	65
Figura 30 – Colônias de <i>Enterococcus faecalis</i> crescidas no ágar brain heart infusion (BHI) após inoculação da suspensão resultante do tratamento de DLC e DLC-Ag.....	66
Figura 31 – Gráfico de UFC/ml de <i>Enterococcus faecalis</i> após incubação sobre discos metálicos funcionalizados.....	67

Figura 32 – Imagens das colônias de <i>E. faecalis</i> observadas na superfície dos discos.....	68
Figura 33 – Imagens dos parafusos.....	69
Figura 34 – Imagens das colônias de <i>E. faecalis</i> nos parafusos.....	70
Figura 35 – Imagem do parafuso com a deposição delaminada.....	71
Figura 36 –Gráfico da viabilidade celular frente ao fibroblasto.....	72
Figura 37 – Gráfico de UFC/ml de <i>Enterococcus faecalis</i> após incubação sobre o parafuso.....	72
Figura 38 – Gráfico de UFC/ml de <i>Enterococcus faecalis</i> após incubação sobre o parafuso no modelo implante/pilar.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ar	Argônio
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão Cérebro – Coração)
°C	Graus Celsius
CH ₄	Metano
CO ₂	Gás Carbônico
Cr-Ni	Níquel cromo
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> (Deposição Química a Vapor)
DLC	Carbono tipo diamante – (<i>Diamond like carbon</i>)
DLC-Ag	Carbono tipo diamante – prata (<i>Diamond like carbon – Silver</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Comprimento de onda
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
IBAD	<i>Ion Beam-Assisted Deposition</i> (Pulverização por feixe de íons e/ou deposição assistida por feixe de íons)
ITA	Instituto Tecnológico de Aeronáutica
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
kHz	Kilo-hertz
kW	Kilowatt
HMDSO	Hexametildisiloxano
λ	Comprimento de onda
LAS	Laboratório Associado de Sensores e Materiais
LPP	Laboratório de Plasmas e Processos – Divisão de Ciências Fundamentais do Instituto Tecnológico de Aeronáutica
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mV	Milivolts
N	Newton
NaCl	Cloreto de sódio
Ncm	Newton por centímetro
nm	Nanômetro
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Salino Fosfato)
PECVD	<i>Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition</i> (Deposição Química a Vapor Assistida por Plasma)
PVD	<i>Physical Vapor Deposition – magnetron sputtering</i> (Pulverização catódica por magnetron)
RPM	Rotação por minuto
s	Segundo
sccm	<i>Standard cubic centimeters per minute</i> (centímetros cúbicos por minuto)
SFB	Soro Fetal Bovino
SiC _x O _y	Filme a base de silício, carbono e oxigênio
UFC	Unidade formadora de colônia
Ti6Al4V	Liga de Titânio, Alumínio e Vanádio
Torr	Unidade de medida de pressão
w	Watts

Pignataro RRDG. Avaliação do efeito antimicrobiano em parafuso protético de implantes revestido com filme de carbono tipo diamante dopados com prata depositado por plasma [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

RESUMO

Apesar da confiabilidade, as falhas mecânicas e biológicas das reabilitações protéticas sobre implantes ainda são persistentes. A capacidade altamente adaptativa das bactérias e sua colonização na superfície dos implantes e componentes protéticos ainda hoje é um sério problema clínico, causando mucosite e peri-implantite. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano do fino filmes de carbono tipo diamante (DLC) dopado com nanopartículas de prata, depositado nos parafusos protéticos. Os filmes de DLC e DLC-Ag foram depositados pelo processo conhecido como PECVD (*Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*). A caracterização do material foi realizada em discos da liga Ti6Al4V pelas análises *scratch test*, espectroscopia de espalhamento Raman, perfilometria mecânica, goniometria e espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para avaliar a efetividade dos filmes depositados, foram realizados ensaios nos discos e nos parafusos (isolados e no modelo implante/pilar). Foram utilizados implantes hexágono externo de plataforma regular 4,1 mm com os respectivos pilares. Para todas as análises, as amostras foram divididas em 3 grupos de acordo com o tipo de tratamento: Grupo controle (sem tratamento); Grupo DLC, amostras revestidas com filme de DLC, Grupo DLC-Ag, amostras revestidas com filme de DLC com prata. As amostras foram analisadas por MEV. Também foi avaliada a citotoxicidade dos filmes frente a células de fibroblastos (3T3) através do ensaio de MTT. A caracterização dos filmes por espectroscopia de espalhamento raman e EDS, apresentaram resultados característicos ao DLC e DLC-Ag, como uma distribuição homogênea de carbono, prata e silício. As análises de *scratch test*, perfilometria mecânica e goniometria, apresentaram filmes com características hidrofóbicas, sendo DLC-Ag o grupo de maior rugosidade e coeficiente de atrito. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 9.0 (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*) e realizado os testes ANOVA e de Tukey para comparações entre os grupos (discos), e os testes Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn (parafusos). O nível de significância para todos os testes foi estabelecido em 5%. Os resultados demonstraram que a deposição do filme de DLC e DLC-Ag apresentaram redução de maneira significativa ($p < 0,05$) na contagem de UFC/ml nos discos e parafusos isolados. Porém a dopagem com prata não trouxe um resultado superior ao filme DLC e ambos os materiais se apresentaram como não citotóxico. Concluímos que o revestimento com DLC e DLC-Ag é um material promissor, com efeito antimicrobiano, porém com limitação de aplicação.

Palavras-chave: Implantes dentários. DLC. Tratamento de superfície. Propriedades de superfícies. *Enterococcus faecalis*.

Pignataro RRDG. Evaluation of antimicrobial action in prosthetic screws of implants with diamond-like carbon films doped with plasma deposited silver [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

ABSTRACT

*Despite the reliability, the mechanical and biological failures in rehabilitating implant-supported dental are still persistent. Mucositis and peri-implantitis are still severe clinical problems due to the high adaptive capacity of bacteria that colonize the surface of implants and prosthetic components. The present study aimed to evaluate, in vitro, the antimicrobial action of thin films of diamond-like carbon (DLC) doped with silver nanoparticles, deposited on prosthetic screws. The deposition of the films was performed by PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). The characterizations were performed of both deposited samples and control (Ti6Al4V) by scratch test analysis, raman scattering spectroscopy, mechanical profilometry, goniometry, and energy dispersive spectroscopy (EDS). The antimicrobial was evaluated activity against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). To evaluate the effectiveness of the deposited films, tests were performed on disks and screws (isolated and on the implant/abutment model) Using 30 regular platforms with 4.1 mm external hexagon implants with the respective abutments, distributed into 3 groups according to the type of prosthetic screw treatment (n=10): Group control screw (no treatment); Group screw coated with DLC film, Group screw coated with DLC film doped with silver nanoparticles (Ag-DLC). The samples were also analyzed by SEM The cytotoxicity of the films against (3T3) fibroblast cells was also assessed using the MTT assay. The characterization was performed from raman spectroscopy and EDS, showed results which are characteristics of DLC and Ag-DLC films, such as a homogeneous distribution of carbon, silver and silicon. The scratch test, mechanical profilometry and goniometry analyzes showed films with hydrophobic characteristics, with Ag-DLC being the group with the higher coefficient of friction values and roughness Data were statistically analyzed using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). ANOVA and Tukey tests were performed, followed by comparisons between groups (disks) and Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn (screw) tests The significance level for all tests was set at 5%. The results demonstrated that the deposition of the DLC and Ag-DLC film showed a significant reduction ($p<0.05$) in the CFU/ml count compared to the contro, disks and isolated screw. However, silver doping did not enhance the DLC films; both materials were non-cytotoxic. It concludes that titanium alloys coated with DLC and Ag-DLC are promising materials with antibacterial properties to prevent peri-implantitis.*

Keywords: Dental implants. DLC. Surface treatment. Surface properties. Enterococcus faecalis.

1 INTRODUÇÃO

O conceito de ter saúde evoluiu ao longo dos séculos de uma preocupação individual para uma meta social mundial e da ausência de doença e enfermidade para o completo bem-estar físico, mental e social (Veeraboina et al., 2022).

Em relação a saúde bucal, o cuidado e a manutenção dos dentes em boca estão associados à qualidade de vida do indivíduo, principalmente, devido ao seu papel na mastigação e em outras atividades diárias, como falar e até sorrir (Atanda et al., 2022). A manutenção do elemento dentário está intimamente relacionada a renda, educação e classe social no decorrer da vida, além da faixa etária, incluindo também o acesso a atendimento odontológico e fatores psicossociais (Celeste et al., 2022).

Como o envelhecimento da população em todo o mundo que está numa taxa crescente, e com isso o aumento da expectativa média de vida da população, espera-se que até 2050, aproximadamente, um quarto da população mundial será composta por idosos (Xu et al., 2019). Os estudos, então, buscam pelo desenvolvimento de novas tecnologias na área da saúde que impactem positivamente na manutenção da qualidade de vida da população (Jaul, Barron, 2017).

Em especial, na odontologia, a reabilitação oral com o uso de implantes dentários vem justamente para atender à crescente demanda dessa evolução em restabelecer funcionalmente os pacientes desdentados (Cosco et al., 2017). O surgimento e aprimoramento de técnicas como o emprego de novos materiais têm corroborado para o desenvolvimento de novos sistemas de implantes.

Ainda que tais avanços tecnológicos e científicos tornem a técnica da implantodontia, cada vez mais segura e previsível, esse tipo de tratamento ainda apresenta complicações e não são raros os casos de insucessos e intercorrências (Katsavochristou et al., 2019; Sheridan et al., 2016; Wennerberg et al., 2018).

A natureza dessas falhas pode ser mecânica, e está relacionada com o desenho do componente protético, geometria da conexão, ajuste mecânico e físico entre o pilar e a plataforma do implante e aplicação de torque (Binon, 1995). Além de que, quando associado a carga cíclica mastigatória, gera a complicação mais relatada que é a instabilidade, que resulta no afrouxamento e ou fratura por fadiga do parafuso (Huang, Wang, 2019; Katsavochristou et al., 2019; Vinhas et al., 2020), levando a

desadaptação e falha da prótese (Katsavochristou et al., 2019; Pjetursson et al., 2012; Vinhas et al.; 2020).

Embora o afrouxamento do parafuso do pilar, seja ajustado com o retorque ou mesmo a substituição, a incidência de tensões sobre o parafuso pode gerar alterações na micro geometria do parafuso ou a fadiga do metal (Barbosa et al., 2008), além das forças mastigatórias constantes, que provocam deformações elásticas (Tey et al., 2017), e o recorrente afrouxamento do parafuso (Huang, Wang, 2019).

Em relação aos fatores biomecânicos sobre implantes, à ausência do ligamento periodontal (Schwarz, 2000) torna o conjunto implante/pilar incapaz de se adaptar prontamente às tensões geradas pela mastigação, resultando no aumento da microfenda na região de união implante/pilar (Assunção et al., 2011; Huang, Wang, 2019; Quirynen et al., 1994; Sasada et al., 2017; Talebi Ardakani et al., 2019).

Essa desadaptação funciona como um nicho de bactérias, causando, muitas vezes, reações inflamatórias nos tecidos moles e duros periimplantares, pela colonização bacteriana, inclusive, no interior do implante (Carnovale et al., 2020; Liu, Wang, 2017; Chawhuaveang et al., 2021; Suárez-López et al., 2016). Quando associada ao micro movimento decorrente da mastigação, ocorre um efeito de bombeamento do infiltrado bacteriano com consequências mais prejudiciais para a estabilidade óssea marginal, pois promove uma maior infiltração de fluido, que é contaminado com endotoxinas, compostos ácidos e bactérias, no interior do conjunto implante pilar e na área peri-implantar adjacente (Liu, Wang, 2017; Lopes et al., 2018).

Na tentativa de minimizar esse conjunto de efeitos maléficos causados pelo destorque do parafuso associado a colonização bacteriana, estudos (Bulaqi et al., 2019; Park et al., 2010; Seloto et al., 2018) sugerem que o uso de lubrificantes, podem reduzir o coeficiente de atrito, o que leva a um resultado positivo na resistência ao afrouxamento dos parafusos. A redução do coeficiente de fricção entre as superfícies de contato, gera maiores valores de pré-carga e, conseqüentemente, maior estabilidade do sistema implante/pilar, logo, o coeficiente de atrito e a pré-carga são diretamente relacionados e inversamente proporcionais (Jorge et al., 2013).

O filme de carbono semelhante ao diamante (DLC), é um tipo de lubrificante sólido amplamente utilizado e composto de carbonos amorfos hidrogenados e não hidrogenados (a-C: H e a-C, respectivamente) com diferentes estruturas de acordo com sua composição química, que possui propriedades mecânicas altamente

desejáveis, além da biocompatibilidade (Grill, 2003; Kwok et al., 2007; Tiainen, 2001). Possui propriedades como baixo coeficiente de atrito, resistência ao desgaste e a corrosão, inércia química e a possibilidade de deposição em substratos metálicos com diferentes formas (Kim et al., 2005; Roy, Lee, 2007). E pode ser utilizado como revestimento protetor de superfícies expostas ao ambiente aeroespacial (Fraga et al., 2012; Hinüber et al., 2010; Tiainen, 2001).

Dentre as vantagens da aplicação do DLC está na diminuição da rugosidade superficial resultante do material, que leva à redução da adesão bacteriana (Vilarrasa et al., 2018), influenciando assim, na preservação dos tecidos mucosos. A rugosidade da superfície do material tem relação direta com a aderência bacteriana e maturação do biofilme (Bollen et al., 1996; Hu et al., 2019; Marciano et al., 2009; Roehling et al., 2017; Vilarrasa et al., 2018; Yang et al., 2022), sendo aliado na prevenção da doença periimplantar (Lutz et al., 2018; Preethanath et al., 2017; Quirynen et al., 1993).

Porém, independentemente das inúmeras propriedades do DLC, a falha de adesão é apontada como uma das principais limitações dos revestimentos. Entretanto, o uso de um dopante incorporado na matriz de carbono amorfo inicial, pode ajudar a resolver o problema (Liu et al., 2018; Meškinis et al., 2014). Diferentes elementos, como Ti, Cr, Co, Ni, Al, Ag e Si, podem ser adicionados aos revestimentos DLC (DLC dopado ou ligado) para reduzir as tensões internas e modificar propriedades como a energia superficial, estabilidade térmica, dureza, coeficiente de atrito, rugosidade da superfície, prevenção ou eliminação da adesão bacteriana e até biocompatibilidade (Cazalini et al., 2017; Harrasser et al., 2015; Liu et al., 2018).

Dentre essas associações promissoras está a utilização da prata (Ag) como dopante (Cardoso et al., 2016; Juknius et al., 2016). Estudos demonstraram que a prata incorpora características adicionais, melhorando as propriedades tribológicas do DLC, diminuindo as taxas de fragilidade, de modo a aumentar a tenacidade, além da ação antibacteriana, onde seu amplo espectro de ação atua contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (Nandi et al., 2018; Rezvani et al., 2019) que ampliam ainda mais as propriedades benéficas (Manninen et al., 2013; Schwarz et al., 2011; Yu et al., 2013).

O desenvolvimento e aprimoramento dos sistemas e componentes de implantes são fatores importantes na busca da qualidade e do sucesso das reabilitações dentárias. Considerando os fatores envolvidos nas falhas descritas bem

como, a possibilidade de aperfeiçoamento do conjunto pilar-parafuso, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do método de deposição do DLC (Diamond-like carbon) em parafusos de pilares (Lepesqueur et al., 2015) quanto a um melhor selamento da micro desadaptação e propriedades antibacterianas, reduzindo a infiltração e/ou aderência de micro-organismos por esta interface. A redução desta infiltração poderá reduzir a perda óssea ao redor do implante, evento comumente encontrados na clínica e que geram transtornos tanto aos profissionais como aos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O ponto de partida da implantodontia na odontologia, teve início com o pai da implantodontia moderna, através do professor Per-Ingvar Brånemark na Universidade de Gotemburgo (Brånemark et al., 1969), na Suécia, e com o professor André Schroeder na Universidade de Berna, na Suíça (Schroeder et al., 1976). O professor Brånemark foi o primeiro a observar que o titânio tinha a propriedade única que ele denominou de "osseointegração" (Brånemark et al., 1977).

A partir da observação da osseointegração por Brånemark, o titânio, devido as suas propriedades físicas e biológicas, passou a ser estudado em diversas áreas biomédicas e muitos pesquisadores contribuíram para o desenvolvimento dos implantes dentários, incluindo o professor André Schroeder (Schroeder et al., 1976) e o Dr. Fritz Straumann de Waldenburg, Suíça (Greenberg, 2015).

2.1 Intercorrências na parte protética do implante

2.1.1 Complicações mecânicas

Nos últimos quase 60 anos, a osteointegração mudou profundamente os tratamentos odontológicos restauradores e transformou a implantodontia num tratamento de sucesso (Ionescu et al., 2022). No entanto, a utilização de próteses sobre implantes sempre apresentou desafios para a reabilitação. Há bastante tempo o conhecimento sobre os fatores mecânicos das próteses sobre implante geram pesquisas a fim de solucioná-los e identificam o parafuso como sendo uma principal complicação para estabilidade do conjunto implante/pilar/prótese (Jemt et al., 1990; Jemt, 1991; Lang et al., 1999; Vinhas et al., 2020).

A indicação inicial era de que as reabilitações com implantes hexágono externo só deveriam ser utilizadas em situações clínicas de múltiplos implantes, por suportar as forças oclusais principalmente nos molares, apesar de principalmente a

higiene, além da estética, não serem favoráveis (Jemt, 1986). Alguns estudos também alertavam para o desenho da prótese e o posicionamento dos implantes, por possuírem grande influência na distribuição das forças mastigatórias sobre os implantes (Rangert et al., 1989; Rangert, 1993). Ainda fazia parte das indicações o uso de material que absorvesse as cargas oclusais como a resina acrílica, que por apresentar um menor módulo elástico, promovendo um amortecimento interno dessas forças (Jemt, 1986; Rangert et al., 1989; Shalak, 1983).

Atualmente, encontram-se disponíveis comercialmente vários sistemas de implantes, com diferentes formatos, superfícies, tamanhos e distâncias entre as roscas, assim como diferentes possibilidades de conexão entre implantes e conectores protéticos. O sistema mais utilizado, e talvez por ser o primeiro proposto, também o mais bem documentado, é o sistema de conexão hexagonal externa proposto por Branemark et al. (1969). Entretanto Jemt relatou que não havia componente que garantisse a estabilidade rotacional entre o pilar e uma coroa e sugeriu modificações no desenho do pilar para permitir a restauração de espaço edêntulo único com implante (Jemt, 1986). Hoje há uma plataforma de conexão hexagonal que age como um mecanismo anti-rotacional, sendo, juntamente com o parafuso protético, o responsável pela estabilidade mecânica do conjunto implante-conector protético.

Os aspectos biomecânicos, principalmente na distribuição das cargas verticais e/ou laterais da prótese sobre implante foram estudados em 1983 (Skalak, 1983). Skalak concluiu que o implante e componente protético por passarem a formar um corpo único, é necessário cuidado para que não ocorram pontos de sobrecarga nem nos componentes nem no tecido ósseo subjacente, para que nenhuma das estruturas ultrapassem a capacidade de fadiga a longo prazo, comprometendo a longevidade do tratamento (Skalak, 1983).

Já na década de 90, Sorensen et al. (1991) avaliaram a adaptação nas interfaces de próteses unitárias, com implantes com conexão hexagonal externa, para verificar se a adaptação das interfaces poderia interferir no acúmulo de biofilme e consequente no desenvolvimento de inflamação gengival. Foram comparadas as interfaces implante-conector protético e conector protético-prótese. Porém a análise só foi feita por meio de observação direta, com auxílio de um microscópio, não apresentando diferença estatística significativa entre os grupos (Sorensen et al., 1991).

Binon e MacHugh, em 1996, avaliaram a influência da liberdade rotacional em implantes de hexágono externo de dimensões diferentes, na estabilidade da união parafusada. Seus resultados mostraram uma média de liberdade rotacional de 5°, e uma correlação direta entre a liberdade rotacional do conjunto implante/pilar e o afrouxamento do parafuso, sendo que esta união é mais resistente ao afrouxamento quanto menor é a liberdade rotacional.

Durante toda a década de 90 diversos estudos foram desenvolvidos na tentativa de avaliar os aspectos biomecânicos relacionados a longevidade dos implantes dentários em função e relataram que sob cargas oclusais, o hexágono externo pode permitir micromovimentos do pilar, causando instabilidade, o que pode resultar no afrouxamento do parafuso da coroa ou do pilar ou até mesmo em fraturas por fadiga (Adell et al., 1990; Avivi-Arber, Zarb, 1996; Jemt, 1991; Sakaguchi, Borgersen, 1993). As complicações com os parafusos, foram estudadas tanto em situações de boca totalmente desdentada (Jemt, 1991; Kallus, Bessing, 1994; Schmitt, 1990) quanto para boca parcialmente desdentada (Becker, Becker, 1995; Jemt et al., 1992; Lekholm et al., 1994).

Ainda na década de 90, mesmo sendo considerado baixo número de falhas, foram propostas medidas preventivas como o ajuste passivo da oclusão, o retorque dos parafusos com um intervalo frequente e *cantilevers* mais curtos para reduzir as forças de alavanca (Avivi-Arber, Zarb, 1996; Jemt, 1991; Naert et al., 1992; Sakaguchi, Borgersen, 1993).

Em 1999, Goodacre et al. realizaram uma revisão de literatura, com todos os estudos clínicos disponíveis de 1981 a 1997 compilando todas as complicações clínicas dos implantes osseointegrados e observaram que o afrouxamento do parafuso foi a complicação mecânica mais frequentemente relatada. A incidência de afrouxamento dos parafusos do pilar variou de 1% a 45%, com uma faixa de incidência comparável de 1% a 38% para o afrouxamento dos parafusos da prótese. Ocorreu mais afrouxamento do parafuso em coroas simples do que com qualquer outro tipo de prótese (Goodacre et al., 1999). Além de que os parafusos da prótese fraturaram com mais frequência (faixa de 1% a 19%) do que os parafusos do pilar (faixa de 0,5% a 8%) (Goodacre et al., 1999).

Segundo Lang et al. (1999), o meio intraoral não é a passivo, e o resultado dessas forças, que incluem contatos oclusais fora do eixo, contatos de excursão

lateral, contatos interproximais entre dentes naturais e restaurações implantossuportada, contatos protrusivos, forças parafuncionais e estruturas não passivas que se ligam aos implantes, uma vez que excedam a pré-carga do parafuso, tornam o conjunto implante/pilar/prótese instável, devido ao afrouxamento do parafuso (Lang et al., 1999).

A partir do final da década de 1990, os dados relatados mostraram uma queda significativa na incidência de complicações mecânicas à medida que novos designs protéticos, materiais e controle de torque foram utilizados (Simon, 2003).

Bakaeen et al., em 2001 corroboraram com outro estudo da época (Hass et al., 1995) e relataram a ocorrência de maior complicação para restaurações implantossuportadas nas regiões dos pré-molares e molares. A sobrecarga oclusal gerada, durante a mastigação, é maior na região de primeiro molar e depois na região de pré-molares (Bakaeen et al., 2001; Hass et al., 1995). Segundo a pesquisa (Bakaeen et al., 2001), onde testaram o comportamento do parafuso frente a várias disposições de mesa oclusal e/ou diâmetro do implante, concluíram que o estreitamento da mesa oclusal das restaurações de implantes unitários pode reduzir o grau de afrouxamento do parafuso (Bakaeen et al., 2001; Hass et al., 1995).

Estudos realizados descrevem que o parafuso responsável pela manutenção do sistema implante/pilar/prótese em posição, recebe uma pré-carga que introduz uma tensão de compressão à medida que os componentes são fixados (Siamos et al., 2002; Winkler et al., 2003). Uma das principais causas do afrouxamento do parafuso é a “perda de pré-carga”, afetando a estabilidade do parafuso, que está diretamente relacionada ao coeficiente de atrito, geometria do parafuso e propriedades dos materiais da superfície de contato (McGlumphy et al., 2003; Siamos et al., 2002; Winkler et al., 2003).

Nas décadas seguintes, os estudos têm tentado propor alterações na geometria do parafuso que favoreça a remoção, caso ocorra fratura (Melo-Filho et al., 2019); além da melhor manutenção do torque, o que inclui o uso de lubrificantes que reduzem o atrito no momento da inserção (Kim et al., 2005; Lepesqueur et al., 2015). Também, modificaram o protocolo de inserção do parafuso tanto com a força e o intervalo de aplicação de torque, na tentativa da manutenção da pré-carga após apertos múltiplos (Al-Otaibi et al., 2017; Bernardes et al., 2014; Cashman et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Kim et al., 2020).

2.1.2 Complicações biológicas

A colonização da cavidade bucal, nos seres humanos, inicia-se durante o nascimento e a presença de bactérias continua por toda a vida (Bowden, Edwardsson, 1995). São várias as espécies bacterianas que colonizam a cavidade bucal transitoriamente. Entretanto, se houver uma superfície favorável para sua aderência e permanência, essa colonização poder ser prolongada (Socransky, Manganiello, 1971).

Então, dentre as adversidades existentes na implantodontia, a adesão bacteriana é responsável por infecções e pela falta de integração tecidual bem-sucedida (Carnovale et al., 2020; Gristina, 1987). A capacidade de aderir às superfícies é uma propriedade geral de quase todas as bactérias e depende de uma série de eventos químicos e biológicos e às vezes específicos (Gristina, 1987, 2004).

A ligação de microrganismos a uma superfície é influenciada pelas características físicas e químicas do material, por exemplo, energia superficial, carga superficial, rugosidade, molhabilidade, topografia e composição química (Song et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Em condições bucais, a formação de biofilme é adicionalmente influenciada pela presença de fluidos corporais (Chawhuaveang et al., 2021; Hannig, 2002). Uma vez inseridos na cavidade oral, os componentes do implante são imediatamente expostos à saliva, sangue e fluidos sulculares, e uma película de proteínas absorvidas se forma nas superfícies (Chawhuaveang et al., 2021; Lendenmann et al., 2000).

E levando em consideração a complexidade dos procedimentos para o uso de um biomaterial, a ocorrência de infecção seja ela resistente ou recorrente, pode muitas vezes ser catastrófica e sempre onerosa no uso desses materiais (Welander et al., 2008).

2.1 Penetração bacteriana e de fluidos pela interface implante/pilar

Independentemente da existência de implantes, não há dúvida da relação de causa e efeito do biofilme dentário com os dentes naturais, a gengivite ou a doença periodontal (Chawhuaveang et al., 2021; Kligman et al., 2021; Meffert, 1996). As bactérias específicas da doença periodontal sempre foram relacionadas aos implantes dentários osseointegrados (Dhir, 2013; Eggert, Levin, 2018; Koka et al., 1993; Lorenz et al., 2019; Penarrocha-Oltra et al., 2016), porém revisões recentes sobre doença indicaram uma prevalência maior de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* em biofilmes de peri-implantite em comparação com outros biofilmes de periodontite ou implantes saudáveis (Sahrmann et al., 2020). Além de *Tannerella spp.*, *Parvimonas spp.*, *Fusobacterium spp.* e *Campylobacter spp.* indicando que a peri-implantite é causada por um biofilme complexo sendo um fator que precisa ser amplamente estudado, na tentativa de minimizar a ação deletéria do biofilme dentário sobre a estabilidade e sucesso do implante (Sahrmann et al., 2020).

A adesão bacteriana também depende das propriedades da célula bacteriana, porque diferentes espécies variam em tamanho celular, hidrofobicidade, potencial zeta (carga de superfície) e abundância de estruturas de fixação (Song et al., 2015; Zhang et al., 2015). A maioria das células bacterianas são carregadas negativamente, portanto, superfícies carregadas negativamente são geralmente menos propensas à adesão bacteriana (Hu et al., 2019). Uma vez aderidas, inicia-se a fase de acumulação, onde os microrganismos se multiplicam formando vários grupos de células em camadas na superfície do implante, denominada de biofilme (Dhir, 2013; Subramani et al., 2009).

Após o primeiro contato do implante com a cavidade bucal, proteínas e glicoproteínas salivares se ligam no implante formando um filme fino, a chamada película adquirida (Busscher et al., 1997; Dhir, 2013; Quirynen et al., 1994). Estas moléculas atuam, principalmente, promovendo a adesão e agregação de microrganismos. Sendo que o substrato também interfere nesse processo, em que superfícies mais ásperas, como o exemplo das superfícies dos implantes e dos pilares geralmente acumulam mais biofilme, enquanto substratos de baixa energia de

superfície e materiais hidrofóbicos e hidrofílicos podem minimizar a formação de biofilme (Dhir, 2013; Hu et al., 2019; Subramani et al., 2009; Yang et al., 2022).

Além da complexidade microbiológica do biofilme (Dhir, 2013; Eggert, Levin, 2018; Koka et al., 1993; Lorenz et al., 2019; Penarrocha-Oltra et al., 2016; Sahrman et al., 2020), a geometria do conjunto implante/pilar apresenta uma microfenda que permite micromovimentos entre o pilar e o implante e é incapaz de se adaptar às tensões geradas pela mastigação (Carnovale et al., 2020; Chawhuaveang et al., 2021; Ericsson et al., 1995; Gross et al., 1999; Liu, Wang, 2017; Quirynen et al., 1993; Quirynen et al., 1994; Suárez-López et al., 2016). Na maioria dos estudos, segundo Pereira et al. (2017), a discrepância marginal, implante-pilar considerada clinicamente usual é de cerca de 100 µm, antes de ser colocado em função, e essa microfenda tende a aumentar após o início do esforço mastigatório.

Com uma flora oral de mais de 700 espécies de microrganismos, a contaminação interna do implante ocorre facilmente através da microfenda, o que resulta na troca de biomateriais entre a cavidade interna do implante e o ambiente oral peri-implantar, promovendo um ambiente crítico para reabsorção óssea (Jansen et al., 1997; Listgarten, 1999; Quirynen et al., 1994; Scarano et al., 2005; Teixeira et al., 2011; Tsuruta et al., 2018). Além de alguns autores afirmarem que a contaminação já pode ocorrer durante o ato cirúrgico (Füst et al., 2007; Harder et al., 2010; Scarano et al., 2005) e/ou na instalação da prótese (Harder et al., 2010; Hou et al., 2013; Scarano et al., 2005).

2.2 Revestimento da superfície com propriedades antibacterianas

2.2.1 Filme de carbono tipo diamante (DLC)

Originalmente os filmes de carbono amorfo foram mencionados pela primeira vez em um trabalho em 1953 desenvolvido por Schmellenmeier, onde o principal objetivo da pesquisa era a formação de carbeto de tungstênio, também chamado de *Widia*, sobre a superfície desta liga. Durante a análise dos resultados dos

experimentos, ele constatou a formação de um filme duro de carbono amorfo sobre o cátodo, em temperaturas relativamente baixas e por meio de uma descarga incandescente em atmosferas de hidrocarbonetos. Porém também observaram filmes amorfos pretos e muito duros que foram depositados quando a corrente de descarga não foi muito alta (Bewilogua, Hofmann, 2014).

Em um segundo artigo publicado em 1956, Schmellenmeier relatou que esses filmes duros de alguns μm de espessura tinham estrutura amorfa e formavam estruturas cristalinas que através da difração de raios X foram caracterizados como diamante (Bewilogua, Hofmann, 2014).

A partir das descobertas de Schmellenmeier, várias pesquisas tiveram início na década de 60, com o objetivo de conhecer e melhorar a deposição ou modificação da superfície do metal visando aprimorar o desempenho do metal frente ao desgaste (Bewilogua, Hofmann, 2014; Sonntag et al., 2012; Tiainen, 2001). A busca era de um material que não deveria garantir a lubrificação só em condições fisiológicas, mas também deveria apresentar resistência mecânica, resistência à corrosão e biocompatibilidade adequadas (Bewilogua, Hofmann, 2014; Sonntag et al., 2012; Tiainen, 2001).

Já em 1971, Eisenberg e Chabot desenvolveram um trabalho com filmes amorfos de carbono e foram os precursores no uso do termo “Diamond-like Carbon”. Seus filmes eram depositados com o uso de um feixe iônico composto por argônio e carbono, sobre substratos à temperatura ambiente (Vetter, 2014). Estes filmes foram caracterizados como de alta resistência quando submetidos ao *scratch test*, eletricamente isolantes, opticamente transparentes e quimicamente resistentes. (Vetter, 2014).

O DLC é formado a partir de um arranjo de átomos de carbono podem ser organizados em diferentes estruturas multiatômicas (alótropos). Diamante e grafite são os alótropos mais conhecidos, porém existem muitos outros arranjos atômicos como: grafeno, carbono vítreo, carbono amorfo (Robertson, 2002; Vetter, 2014).

Como exemplo, o diamante tem 100% de hibridização de ligação de carbono sp^3 . A hibridização da ligação sp^3 de carbono leva a uma perfeita simetria da estrutura do diamante, que fornece propriedades como dureza extremamente alta, excelente condutividade térmica, alta resistividade elétrica, inércia química, transparência óptica, banda larga e baixa taxa de desgaste em vários sistemas tribológicos

(Robertson, 2002; Vetter, 2014). Já o grafite tem fortes propriedades anisotrópicas em uma direção, na qual há hibridização sp^2 dos átomos de carbono, enquanto na direção perpendicular há apenas uma fraca força de van der Waals atuando. A hibridização sp^2 resulta em baixa dureza, baixa resistividade elétrica e alta taxa de desgaste, combinada com baixo atrito (Robertson, 2002; Vetter, 2014).

E o DLC é carbono amorfo em uma rede desordenada de átomos de carbono com uma mistura de ligações coordenadas sp^3 e sp^2 . A família de filmes de carbono amorfo é chamada de diamante tipo carbono, ou DLC e provaram ser úteis em uma ampla gama de aplicações (Hinüber et al., 2010; Jones et al., 1999; Linder et al., 2002; Yang et al., 2003).

Ao longo dos anos, até a década de 90, a utilização do DLC já estava em escala industrial, porém concentrava-se na área de eletrônica, e depois expandiu para lâminas de barbear e sistemas de injeção de combustível a diesel (Yang et al., 2019).

Atualmente, os filmes de DLC são utilizados em larga escala na indústria, com o objetivo de melhorar o desempenho de ferramentas e componentes, nos sistemas de injeção de combustível, lâminas de corte para diferentes usos e a indústria eletrônica, para a proteção de discos rígidos e demais dispositivos de armazenamento de dados (Ferrari, 2004; Treutler, 2005). São empregados como filmes protetores em ferramentas de conformação, em embalagens plásticas como barreira protetiva na indústria de bebidas, em filmes anti-refletivos para a faixa de infravermelho e para uso biomédico, evitando a liberação de partículas para o organismo e melhorando a biointegração (Shirakura et al., 2006; Vetter, 2014).

2.2.2 Filme de DLC na área médica e odontológica

O emprego de filmes de DLC para o revestimento superficial de ligas metálicas utilizadas como biomateriais, tais como aço inoxidável, ligas de cromo-cobalto, zircônia e ligas de titânio tem se desenvolvido rapidamente proporcionando por exemplo, a redução do tempo de recuperação pós-cirúrgica (Amirtharaj Mosas et al., 2022; Bewilogua, Hofmann, 2014).

Com sua comprovada biocompatibilidade (Amirtharaj Mosas et al., 2022; Bewilogua, Hofmann, 2014; Hinüber et al., 2010; Linder et al., 2002; Love et al., 2013; Maas, 2016; Millan et al., 2020; Roy, Lee, 2007) a utilização dos filmes de DLC se deve principalmente em virtude de sua resistência aos fluídos corpóreos e da elevada adesão celular favorecendo o crescimento de fibroblastos, osteoblastos e macrófagos, sem inflamação e citotoxicidade, que pode ser obtida de acordo com os parâmetros do processo de deposição utilizados (Millan et al., 2020). Pode ser encontrado também em *stents* arteriais, agulhas de cirurgia oftalmológica, lentes de contato, aplicações ortopédicas, odontológicas entre outras (Dearnaley, Arps, 2005; Dowling et al., 1997).

O filme de DLC, além de minimizar a ocorrência de corrosão do substrato no ambiente orgânico, atende a uma demanda cada vez maior no sentido de impedir, ou minimizar, a liberação para o organismo de partículas metálicas provenientes dos substratos que podem gerar resultados indesejados como alergias, inflamações e outros efeitos danosos ao organismo em virtude de seu acúmulo (Dearnaley, Arps, 2005; Dowling et al., 1997).

Além de todas as características descritas até agora, o DLC apresenta também ação antibacteriana (Marciano et al., 2009a; Marciano et al., 2009b; Marciano et al., 2011; Mass, 2016), que se traduz numa ação anti adesiva, o que não permite ou dificulta a adesão bacteriana e a subsequente não são capazes de formar colônias no material (Al-Jumaili et al., 2017; Maas, 2016; Medina et al., 2012). Esse efeito antibacteriano, segundo os estudos acontece apenas para bactérias que se adsorvem na superfície sem influenciar significativamente as bactérias no meio circundante (Al-Jumaili et al., 2017; Maas, 2016; Medina et al., 2012).

O uso do DLC vem sendo estudado como uma alternativa para o tratamento de superfície de implantes dentários, na tentativa de melhorar os padrões de osseointegração comparados aos tratamentos já realizados comercialmente (De Maeztu et al., 2007; Jennes et al., 2021). Outra aplicação de filmes finos na odontologia está sendo realizada com filmes de sílica (SixOy), para tratamento da superfície de cerâmicas à base de zircônia, melhorando sua compatibilidade com os cimentos resinosos e aumentando a energia de superfície do material (Amirtharaj Mosas et al., 2022; Piascik et al., 2009; Piascik et al., 2011).

2.3 Deposição de DLC

Existem várias técnicas utilizadas na deposição de Carbono tipo diamante, e em geral, as mais utilizadas são: (Millan et al., 2020; Love et al., 2013; Robertson, 2002; Song et al., 2015)

- Pulverização catódica por magnetron (PVD- *Physical Vapor Deposition – magnetron sputtering*).
- Deposição química em fase de vapor (CVD- *Chemical Vapor Deposition*) ou reforçada com plasma (PECVD- *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*)
- Pulverização por feixe de íons e/ou deposição assistida por feixe de íons (IBAD- *Ion Beam-Assisted Deposition*).

2.3.1 Dopagem de nanopartículas metálicas no DLC e efeito bactericida

As bactérias aderem e crescem em praticamente qualquer superfície, formando comunidades multicelulares complexas, conhecidas como biofilmes, que são associados as doenças patogênicas (Cyphert, von Recum, 2017; Echeverria et al., 2020). Com isso há a possibilidade de infecções que geram complicações de diversos níveis, dependendo da resistência ao tratamento, além da dificuldade da remoção do biofilme (Cyphert, von Recum, 2017; Echeverria et al., 2020).

O controle e caracterização de infecções por biofilme é essencial, especialmente em superfícies onde o seu crescimento é favorável, o que inclui todo o tipo de dispositivos utilizados na área de saúde como, o aço inoxidável, ligas de titânio, materiais poliméricos, cerâmicas etc. (Malheiro, Simões, 2017; Percival et al., 2015; Stoica et al., 2017).

De forma a enfrentar este problema, além da deposição de filmes puros de DLC, existe a possibilidade de adição ao filme de elementos químicos específicos durante o processo de deposição, processo que é denominado dopagem (Anuta et al., 2022). E visa melhorar o desempenho que vai desde a potencialização de

características já presentes nos mesmos, até a obtenção de novas propriedades de interesse. (Al Meslmani et al., 2015; Anuta et al., 2022; Mandracci et al., 2015).

Apesar do DLC puro apresentar baixo coeficiente de atrito e alta dureza, possui tenacidade e propriedades de adesão inferiores. Com o intuito de melhorar essas características o DLC passou a ser dopado com vários elementos como N, F, Ni, Al entre outros para fornecer uma química de superfície adequada. A dopagem do DLC reduziu a tensão residual compressiva, aumentando assim a resistência à adesão do revestimento, além de boa resistência ao desgaste (Al Meslmani et al., 2015; Anuta et al., 2022; Mandracci et al., 2015; Ruy et al., 2020; Sharifahmadian et al., 2019).

Outro elemento químico que é utilizado para a dopagem do DLC é a prata (Ag), que além de melhorar as características mecânicas, atua como antibacteriano (Anuta et al., 2022; Manninen et al., 2013; Schwarz et al., 2011; Yu et al., 2013).

Uma série de estudos avaliaram o efeito antimicrobiano do filme de DLC e DLC dopado com prata, depositados sobre amostras de aço inoxidável e silício, e foi observado a redução na concentração bacteriana média para as amostras com filmes de DLC, sendo ainda mais marcante para os filmes dopados com prata (Maas, 2016; Marciano et al., 2009a; Marciano et al., 2009b; Marciano et al., 2011).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos do revestimento em parafusos protéticos com nanofilmes de DLC (*Diamond like carbono*) e DLC-Ag (dopado com nano-partículas de prata) depositados à plasma em implantes com plataforma do tipo hexágono externo.

Os objetivos específicos foram:

a) Avaliar o efeito antimicrobiano dos filmes de DLC e DLC-Ag e controle sobre *Enterococos faecalis* na infiltração bacteriana entre pilares protéticos e implantes de plataforma do tipo hexágono externo;

b) Avaliar a citotoxicidade de filmes de DLC e DLC-Ag e controle sobre fibroblastos (3T3) por MTT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi dividida em 2 etapas:

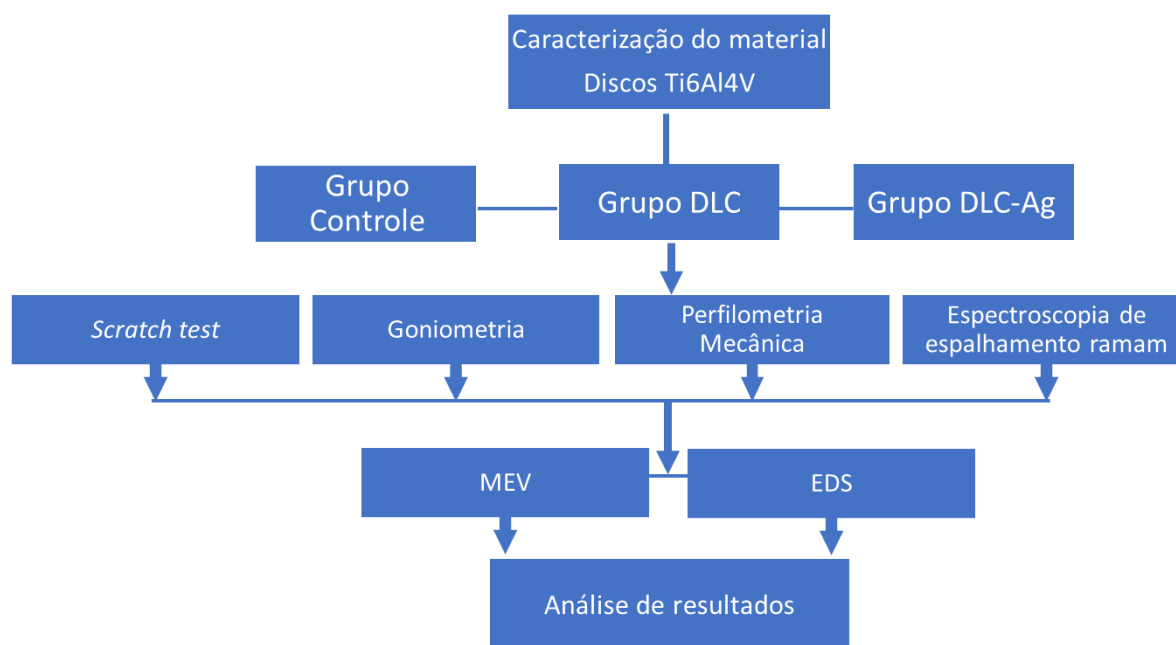
1ª etapa – Determinação do padrão adequado de deposição do filme de DLC sobre a liga Ti6Al4V em formato de discos;

– Estudo da efetividade antimicrobiana da deposição de DLC e DLC-Ag, caracterização do filme depositado e citotoxicidade;

2ª etapa – Avaliação microbiológica do filme depositado nos parafusos e testados no modelo real implante/pilar.

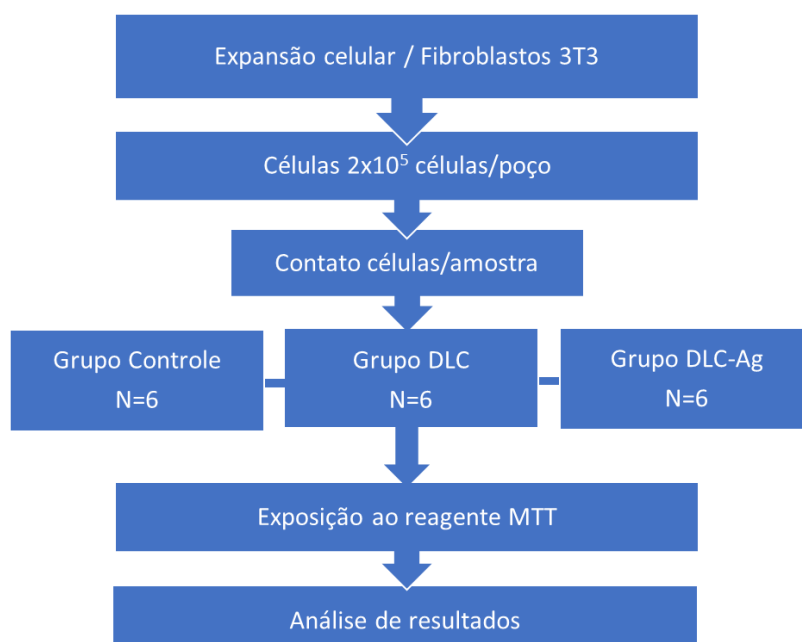
4.1 Fluxograma

Figura 1 - Fluxograma da caracterização do material

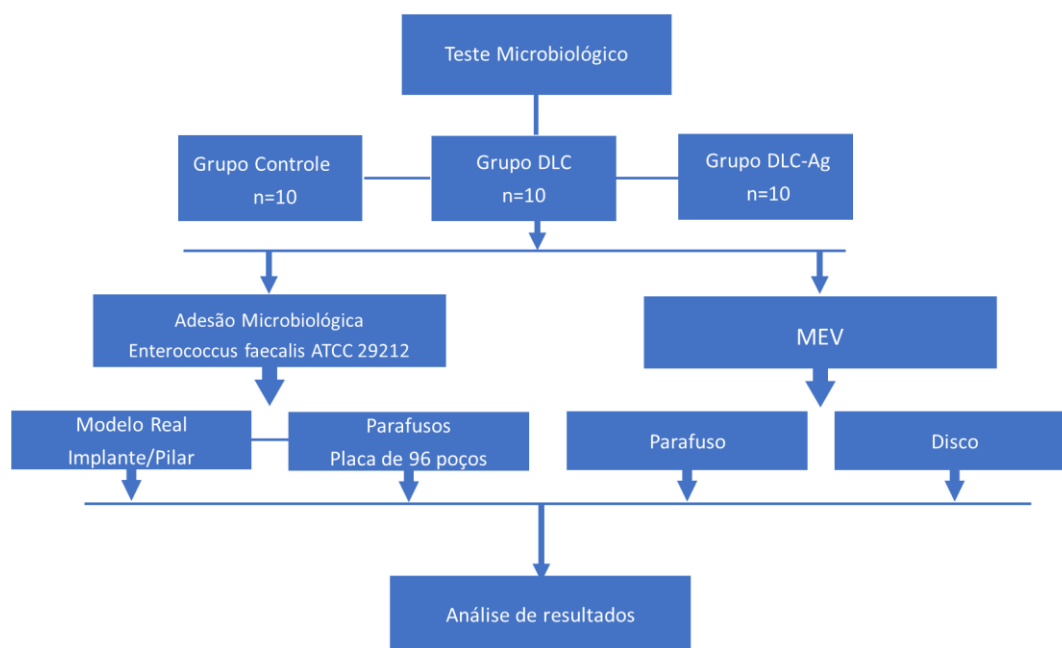


Legenda: Fluxograma caracterização do material.
Elaborada pelo autor.

Figura 2 - Fluxograma da citotoxicidade



Legenda: Fluxograma citotoxicidade.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 - Fluxograma ensaio *in vitro*

Legenda: Fluxograma ensaio *in vitro*.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Determinação do padrão adequado de deposição do filme de DLC sobre a liga Ti6Al4V em formato de discos

4.2.1 Preparo das amostras

Foram utilizados discos da liga discos de Ti6Al4V para a padronização da metodologia de deposição do DLC e DLC-Ag.

As amostras para deposição dos filmes de DLC foram obtidas através do corte por usinagem de barras redondas com 19 mm de diâmetro e 1 mm de espessura da liga de titânio Ti6Al4V.

Após o corte, os seguintes procedimentos foram realizados previamente à deposição do filme:

Lixamento da superfície que receberá o filme com o uso de lixas de carbetto de silício de granulometrias de 600, 1.200 e 2.000;

Polimento com pasta de polimento universal - Ivoclar Vivadent.

Limpeza das amostras com o auxílio de cuba ultrassônica imersas em álcool durante 15 minutos e secagem.

Esta preparação é necessária para a obtenção de uma superfície com a menor rugosidade possível, em virtude de o DLC não apresentar boa aderência quando depositado diretamente sobre substratos metálicos, e foi realizada a deposição de uma intercamada de um filme a base de silício, carbono e oxigênio, denominado aqui por SiCxOy (Figura 1) (Bonetti et al., 2006).

Figura 4 – Representação esquemática da deposição do filme de DLC por PECVD



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Deposição do filme de DLC

A deposição dos filmes de DLC e de DLC-Ag sobre os discos de Ti6Al4V e sobre os parafusos protéticos de Ti6Al4V foram realizados no Laboratório de Plasmas e Processos – LPP da Divisão de Ciências Fundamentais do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), São José dos Campos, SP, Brasil.

4.2.2.1 Reator de PECVD

Para a deposição do DLC e DLC-Ag foi utilizado um reator que contém duas fontes para geração de plasmas: uma fonte de corrente pulsada (Advanced Enegy Pinacle Plus+ 5 kW x 5 kW), operando em 25 kHz que foi utilizada para a geração de plasma no catodo principal utilizado como porta amostra, e uma fonte de corrente (Supplier Power Supply, modelo FFCT 1000-100i) para a geração de plasma em um cátodo oco de prata que foi utilizada para fazer a dopagem de prata nos filmes DLC-Ag.

A temperatura das amostras foi medida por um termopar, tipo k, inserido no

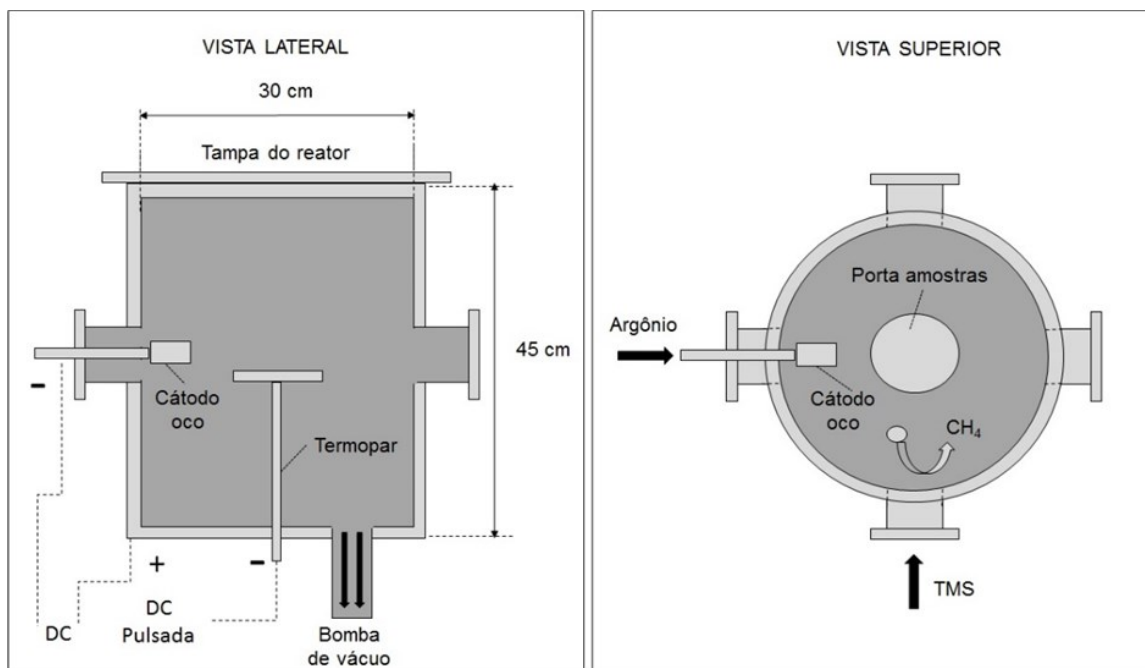
interior do porta amostras. O fluxo de argônio (Ar) e metano (CH_4) foram controlados e medidos através de controladores de fluxo e fluxímetros da marca MKS, modelos 247C e 1179, respectivamente. Já o fluxo de hexametildisiloxano (HMDSO) foi medido através da pressão parcial deste vapor na câmara do reator a plasma (Figuras 5,6 e 7).

Figura 5 – Reator para deposição dos filmes de DLC por PECVD



Fonte: Elaborada pelo autor.

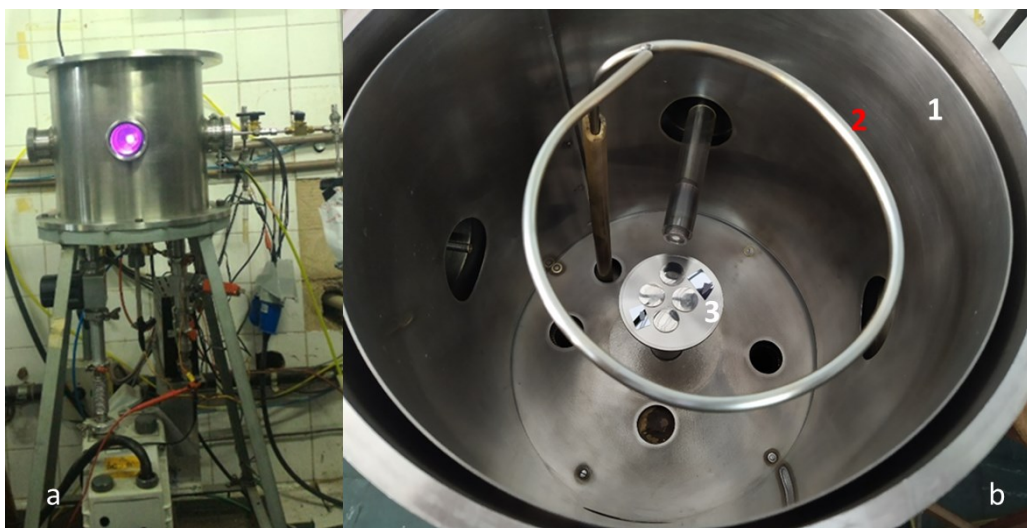
Figura 6 – Diagrama esquemático do sistema de plasma indicando os seus principais componentes



Legenda: Diagrama esquemático da vista lateral e superior do reator de PECVD com suas dimensões, principais componentes e fluxo de precursores.

Fonte: Elaborada Oliveira AD, 2018.

Figura 7 – Reator de PECVD



Legenda: a) visão da câmara e do sistema de bombeamento; b) componentes no interior da câmara do reator: 1) camisa de aço inoxidável; 2) tubo distribuidor de gases; 3) porta amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

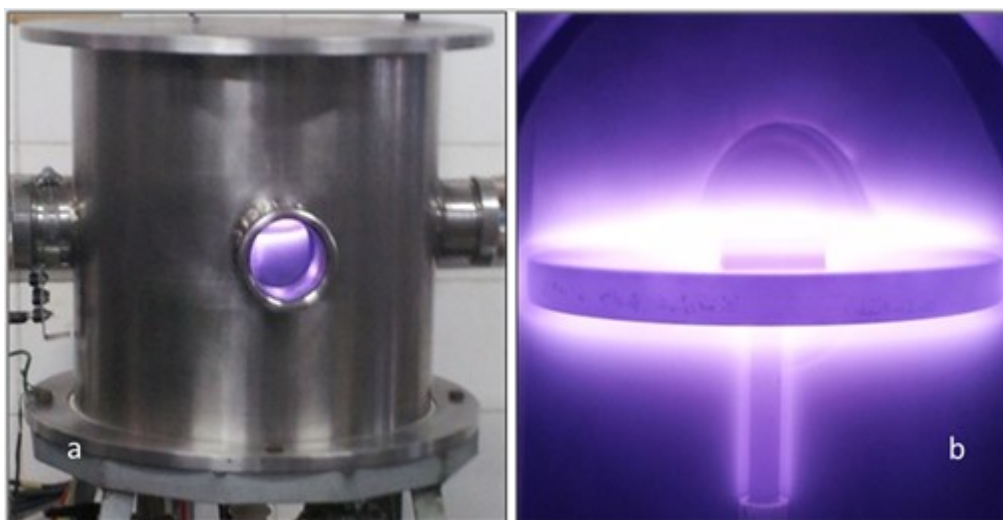
4.2.2.2 Processos de deposição

As deposições foram realizadas utilizando a técnica de deposição química a vapor assistida por plasma (PECVD - *Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition*), em um reator a plasma constituído por uma câmara cilíndrica de 30 cm de altura por 30 cm de diâmetro (Figura 5). A pressão de fundo na câmara de plasma é de $1,0 \times 10^{-3}$ Torr e manteve-se esta condição por 30 min, de forma a limpar a rede e minimizar a presença de gases, umidade e partículas estranhas ao processo. Essa pressão é atingida com o auxílio de uma bomba de vácuo mecânica de dois estágios (Edwards Vacuum, modelo E2M18). A pressão é medida por sensores de pressão (Pirani, modelo APG-100X, da Edwards Vacuum).

A partir deste momento, foram feitos incrementos moderados de tensão de forma a elevar a temperatura até 530 °C e ajustou-se a pressão da câmara para 3 Torr. O tempo total decorrido desde o início do vácuo até o atingimento desta temperatura foi de 45 min.

Atingidas estas condições, manteve-se o fluxo de argônio em 30 sccm e iniciou-se a admissão do precursor líquido de silício (TMS) na câmara por um período de 10 min, de modo a possibilitar a formação de uma intercamada, que pode atingir uma espessura de até 0,3 µm (Figura 8). Esta intercamada, é realizada em virtude de o DLC não apresentar boa aderência quando depositado diretamente sobre substratos metálicos, e o silício viabiliza o ancoramento do filme.

Figura 8 – Reator



Legenda: a) reator; b) formação do plasma em torno do porta amostras.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a deposição da camada de silício (SiC_xO_y) o plasma foi desligado e aguardado (aproximadamente 60 minutos) o resfriamento da amostra até 175°C em fluxo de argônio com o sistema de vácuo ligado, mantendo uma pressão de 0,3 Torr, tendo sido elevado para 5 sccm após 5 min de processo, sendo que esta etapa teve uma duração de 15 minutos, onde encontra-se a melhor condição para o início da deposição do filme de DLC. Ao atingir os 175°C ligou-se também a fonte de potência do cátodo oco energizando-o com valores fixos de potência de acordo com os objetivos de cada experimento.

No caso da camada de DLC, a deposição foi realizada utilizando um fluxo de 60 sccm de Ar e 3,8 sccm de metano (CH_4) numa pressão de 0,6 Torr e 18 w de potência na fonte DC pulsada (25 kHz), durante 20 minutos. Ao final do processo, o fluxo de metano foi interrompido, a fonte foi desligada e por fim, interrompeu-se o fluxo de argônio. A câmara do reator foi mantida sob vácuo até que a temperatura atingisse 80°C . Atingida esta condição, a câmara foi aberta para a retirada das amostras do seu interior.

No caso da deposição de DLC-Ag, foi utilizado os mesmos parâmetros e condições utilizados para a deposição do DLC adicionando um plasma no catodo oco de prata para fazer a dopagem deste elemento no filme de DLC. Para geração do

plasma de catodo oco foi utilizado uma fonte dc com uma potência média de aproximadamente 190 W. de potência de acordo com os objetivos de cada experimento.

O quadro 1 apresenta os valores utilizados para a deposição dos filmes de SiC_xO_y (interface para melhoria da aderência dos filmes de DLC e DLC-Ag, assim como dos filmes de DLC e DLC/Ag.

Quadro 1 – Parâmetros e condições de posição dos filmes de DLC e DLC/Ag

Atividade	Fluxo argônio (sccm)	Fluxo HMDSO (Torr)	Potência DC pulsada (W)	Potência DC (W)	Temperatura (C)	Tempo (minutos)	Pressão (Torr)
Aquecimento	60		190		25 - 550	~ 40	0,9 – 1,0
Interface (SiC _x O _y)	60	0,02	60		550	15	0,6
Resfriamento 1	60				550 - 175	~60	0,3
Deposição DLC	60		18		175	20	0,6
Deposição DLC/Ag	60		18	190	175	20	0,6
Resfriamento 2	60				175 - 30	~210	0,3

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização dos filmes de DLC

A caracterização foi realizada nos filmes de DLC e DLC-Ag depositados sobre disco da liga discos de Ti6Al4V.

4.3.1 Perfilometria mecânica dos filmes de DLC e DLC-Ag

Para a realização deste teste nos filmes obtidos foi utilizado um perfilômetro mecânico (P-7 Stylus Profilometer KLA Tencor, USA), disponível Laboratório de Plasmas e Processos – LPP da Divisão de Ciências Fundamentais do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) (Figura 9). Para a execução dessa técnica, a leitura é realizada por uma ponta de diamante que percorre a superfície da amostra, realizando uma leitura da topografia da amostra (Bonetti, 2008).

Nesse estudo foram utilizadas amostras de silício para realização da leitura em perfilômetro. Para isso, durante o processo de deposição dos filmes, um substrato de silício foi colocado no porta amostra juntamente com os discos de titânio em cada deposição realizada. Esse substrato de silício foi parcialmente coberto por um outro fragmento de silício, para formar um degrau entre a superfície exposta, na qual o filme se depositou, e a parte coberta que ficou sem o filme, permitindo, assim, a leitura da espessura do filme e a taxa de deposição quando a ponta de diamante do perfilômetro deslizesse sobre a superfície da amostra de silício.

Figura 9 – Perfilômetro



Legenda: Perfilômetro utilizado para medir a espessura dos filmes de DLC.
Fonte: Elaborada pelo autor.

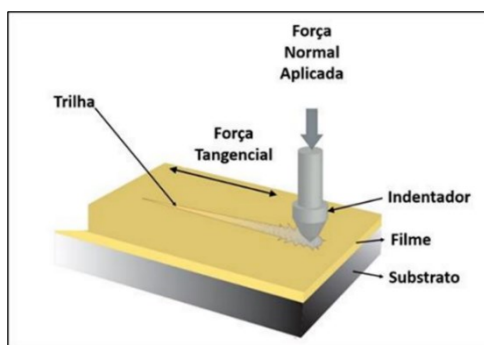
4.3.2. Análise de aderência dos filmes de DLC pela técnica de *scratch test*

A qualidade da aderência do filme ao substrato é uma informação de grande interesse quando se trata de processos de deposição, para garantir que os benefícios provenientes das suas propriedades, como resistência ao desgaste e inércia química estejam disponíveis.

As propriedades físicas das amostras foram analisadas pela técnica *scratch test*, também conhecido como teste de riscamento, na qual se verifica a adesão do filme ao substrato, pois há a necessidade de espessuras mínimas do filme, para garantir a máxima adesão. Através desta técnica, uma ponta de elevada dureza, também denominada indentador, desliza a uma velocidade constante por uma distância pré-definida sobre a superfície a ser caracterizada, exercendo uma força normal que pode ser constante ou variável (Figura 10). Os resultados podem variar desde um sulcamento com presença apenas de deformação plástica para materiais dúcteis à geração de trincas e debris em materiais frágeis, bem como a delaminação do revestimento sobre o substrato (Jardret et al., 1998).

Esta análise gera resultados de carga crítica (L_c) que é aquela em que o filme começa a se quebrar e/ou delaminar, o que é indicado pelo aumento repentino no coeficiente de atrito (pois o coeficiente de atrito do substrato é maior do que o do filme) e/ou pelo aumento da intensidade do sinal acústico (Bonetti, 2008).

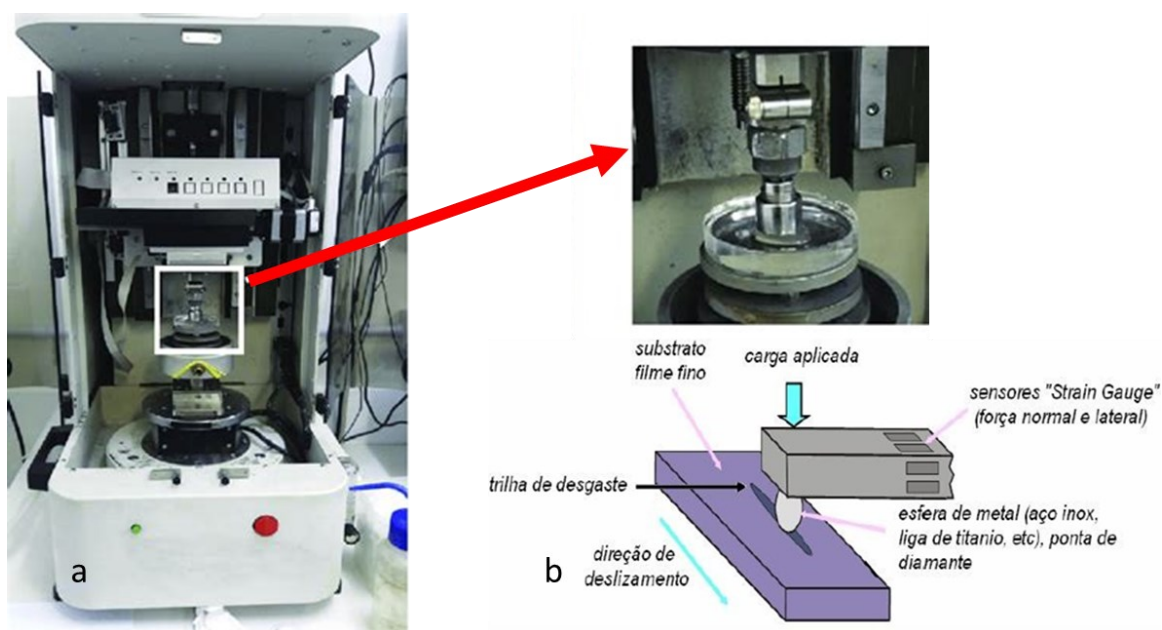
Figura 10 – Indentador, trilha e as forças atuantes no *scratch test*



Legenda: Indentador, sua região de atuação, a trilha produzida e as forças atuantes.
Fonte: Oliveira, 2018.

Os testes de *scratch* foram realizados em um tribômetro CETR-UMT-2. Foram realizados quatro testes por amostra, utilizando uma faixa de força de 0 a 40 N, uma distância de 5 mm, e uma taxa de deslocamento de 0,1 mm/s. As medidas foram realizadas em colaboração com o LAS do INPE (Figura 11).

Figura 11 – Tribômetro

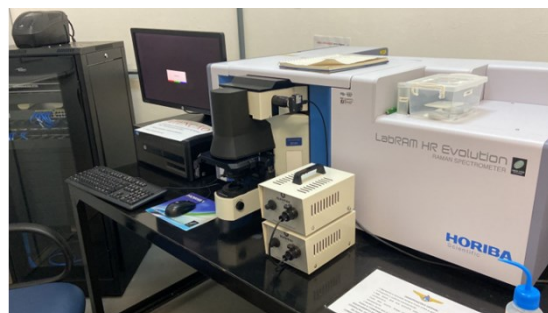


Legenda: a) tribômetro utilizado para os testes de coeficiente de atrito e aderência dos filmes; b) esquema representativo do funcionamento de um tribômetro típico (Bonetti, 2008).
Fonte: Oliveira, 2018.

4.3.3 Análise dos filmes de DLC por Espectroscopia de Espalhamento Raman

A avaliação da qualidade dos filmes DLC e CD-DLC foi realizada por meio da espectroscopia de espalhamento Raman, utilizando um espectrômetro Raman equipamento Horiba Evolution do Departamento de Engenharia Mecânica /LPP-ITA. Para avaliar as bandas D e G do DLC, as medidas foram realizadas em um range de $800 - 2000 \text{ cm}^{-1}$, utilizando um laser de 532 nm (potência $< 10 \text{ mW}$), grade de difração de 600 linhas/mm, tempo de aquisição de 30s, e três acumulações por medida (Figura 12).

Figura 12 – Espectrofotômetro Raman



Legenda: Espectrofotômetro Raman.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A espectroscopia Raman trata-se de um método amplamente utilizado por ser não destrutivo e de execução relativamente simples. O método fornece informações relativas à estrutura dos materiais como os filmes de DLC e das quantidades relativas de híbridos do tipo sp^2 e sp^3 . Para a análise do substrato o aparelho deve ser calibrado a partir de uma amostra de diamante.

4.3.4 Ângulo de contato (goniometria)

Uma das formas para se medir a energia de superfície é a partir de medidas experimentais do ângulo de contato, que é uma quantidade macroscópica facilmente medida em laboratório e é utilizado como um indicador de molhabilidade (Voronov et al., 2008).

As medidas de ângulo de contato das superfícies foram realizadas com um Goniômetro Ramé-Hard modelo 500 – Advanced Goniometer, do Departamento de Física do ITA (Figura 13), utilizando um volume de líquido de teste de 5 μ l e amostras depositadas sobre o substrato de Ti6Al4V. O ângulo de contato foi determinado tanto com água destilada (líquido polar) quanto com diiodometano (líquido apolar). As medições foram feitas com dois conjuntos de tubos diferentes para água destilada e diiodometano e foram realizadas três medições em cada amostra. Os ângulos de contato e a energia de superfície foram determinados/calculados pelo software

DROPImage Advanced (versão 2.4).

Figura 13 – Goniômetro



Legenda: Goniômetro utilizado para medida do ângulo de contato.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A técnica de EDS se utiliza do princípio de que todo elemento químico emite raios-x característicos ao ser atingido por um feixe de elétrons. A detecção destes raios-x permite identificar os elementos químicos presentes em uma amostra, quantificá-los e determinar sua distribuição relativa.

Amostras representativas foram analisadas a fim de avaliar a concentração de prata incorporada nos recobrimentos. As medidas foram realizadas utilizando um microscópio Oxford – SOB 3 TESCAN XMU do Departamento de Engenharia. Mecânica /LPP-ITA.

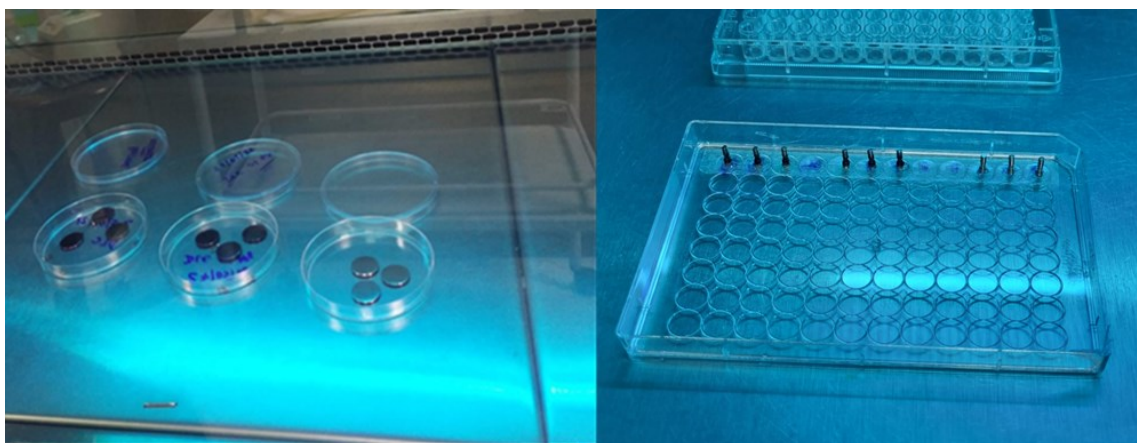
4.4 Teste Microbiológico

4.4.1 Cepas e preparo de materiais

Para as análises foram utilizadas cepas padrão de bactérias da espécie *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), armazenadas em caldo BHI com 20% de glicerol a -80°C. No momento dos ensaios, os inóculos foram obtidos a partir da cultura dos microrganismos em ágar BHI por 24 h a 37°C, sob aerobiose.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico. Todo o instrumental, as soluções e os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave. Os discos e parafusos depositados com DLC e DLC-Ag foram esterilizados em luz UV (interior da câmara de fluxo laminar), por 10 minutos e toda a manipulação foi realizada com luvas estéreis. Discos, implantes e pilares foram fornecidos pelo fabricante (Conexão Sistemas de Prótese) (Figura 14).

Figura 14 – Esterilização dos discos e parafusos



Legenda: Discos na luz UV interior de fluxo laminar.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Avaliação da ação antimicrobiana do DLC e DLC-Ag

Para determinar a eficácia antimicrobiana do filme de DLC e DLC-Ag, os testes microbiológicos foram realizados sobre os discos de Ti6Al4V. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com quadro 2.

Quadro 2 – Divisão dos grupos

Grupos	N de Amostras	Material	Tratamento de superfície	Marca comercial
Grupo Controle	9	disco de Ti6Al4V	Sem tratamento	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil
Grupo DLC	9	disco de Ti6Al4V	deposição de filme DLC	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil
Grupo DLC-Ag	9	disco de Ti6Al4V	deposição de filme DLC-Ag	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil

Legenda: Grupos experimentais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os procedimentos foram adaptados da metodologia de Cazalini et al. (2017) para a determinação da efetividade do material.

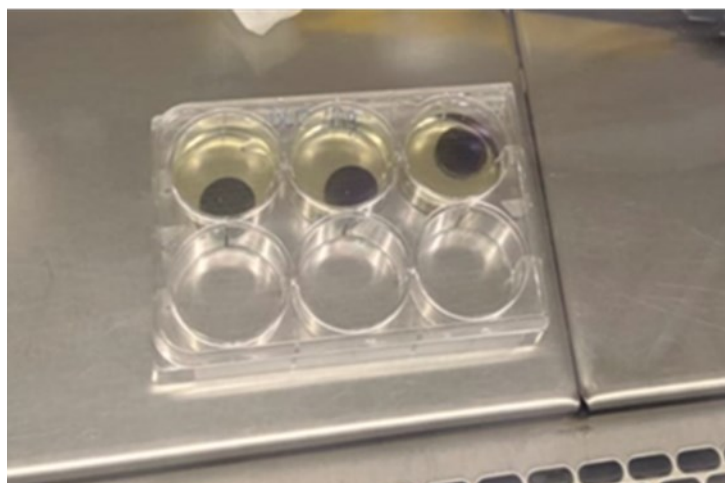
A partir da cultura de 24 h dos microrganismos da espécie *E.faecalis*, foi preparada uma suspensão padronizada em espectrofotômetro digital (Modelo B582, Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 760 nm ($DO = 1,278 \pm 0,02$), na concentração de 1×10^{10} UFC por mililitro (UFC/ml) em solução fisiológica (NaCl, 0,9%). Em seguida, a suspensão foi diluída em caldo BHI para atingir a concentração de 1×10^6 UFC/ml.

Os discos foram acrescentados em placas de 6 poços (um em cada poço) e,

para todos os grupos, foram acrescentados 3 ml de suspensão por poço (Figura 15). As placas foram, então, deixadas para pré-adesão do biofilme, sob agitação de 120 rpm, por 90 minutos a 37°C, sob aerobiose.

Em seguida, os sobrenadantes foram removidos dos poços, os poços foram lavados com 3 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e 3 ml de caldo BHI foi acrescentado em cada poço. As placas foram, então, incubadas sob agitação de 120 rpm, por 48 horas a 37°C, com troca do meio de cultura após 24 horas.

Figura 15 – Ensaio microbiológico de formação de biofilme de *E. faecalis* sobre discos metálicos



Legenda: Discos imersos em caldo BHI estéril.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o período de incubação, os discos foram removidos das placas, posicionados acima de um poço vazio, com auxílio de uma pinça metálica estéril e lavados com 1 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%).

Após serem lavados, os discos foram colocados individualmente em tubos falcon de 50 ml, contendo 5 ml de solução fisiológica, e levados para sonicação (sonicador Sonics Vibra-Cell VCX 500) de três ciclos de 20 segundos com 10 segundos de pausa entre eles. Os tubos falcons ficaram mantidos em gelo para garantir que *Enterococcus faecalis* estivessem viáveis (Figura 16).

Figura 16 – Processo de sonicação do disco imerso em solução fisiológica

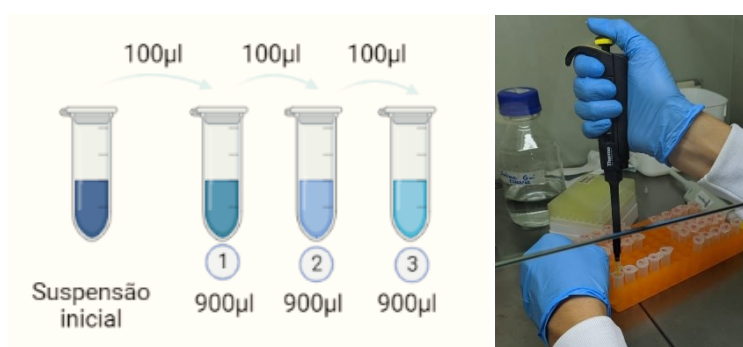


Legenda: Tubos falcon, contendo disco e solução fisiológica, mantidos no gelo, e levados para sonicação para recuperação das bactérias aderidas ao disco.

Fonte: Elaborada pelo autor com o auxílio no BioRender.

Foi retirado, então, 100 μ l da suspensão do tubo falcon e feita a diluição seriada até 10^{-5} em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Figura17). Uma alíquota de 10 μ l de cada suspensão inicial e de suas diluições foi semeada em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI, pela técnica da gota.

Figura 17 – Diluição seriada para contagem de UFC/ml



Legenda: Diluição seriada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Depois de 24 h de incubação a 37°C, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas e os resultados foram descritos em UFC/ml.

4.5 Análise por microscopia eletrônica de varredura no disco (MEV)

Para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi utilizado um disco e um parafuso de cada material, incubado com suspensão de *E. faecalis* da mesma forma que foi mencionado na análise antimicrobiana, para avaliação da adesão bacteriana nas amostras após o teste microbiológico. Discos e parafusos foram lavados com 1 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril e submersos em solução de glutaraldeído 2,5% tamponado, por 24 horas para a fixação dos microorganismos e após esse período, foram imersos em solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M por 10 minutos.

Em seguida, foi realizado o processo de desidratação das amostras com a imersão dos discos e dos parafusos em solução álcool etílico em diferentes concentrações (30%; 50%; 70%; 80%; 90%; 100% e novamente 100%), por 10 minutos em cada etapa. Ao final, os discos e os parafusos foram deixados em estufa a 65°C, por 24 horas.

As amostras já fixadas foram colocadas numa metalizadora (*Sputter Coater* SC7620), na qual foram submetidas à vácuo e receberam uma camada de ouro 12 nm. A seguir as amostras foram colocadas no MEV (microscópio eletrônico de varredura, Inspect S50, FEI, República Tcheca) e submetidas a alto vácuo. Com o filamento do ligamento de tungstênio é obtido o feixe de elétrons que varreu a amostra. As imagens foram produzidas com o aumento de 3000x e 5000x.

4.6 Análise de citotoxicidade dos filmes de DLC e DLC-Ag

A análise de citotoxicidade foi realizada para avaliar os efeitos do filme de DLC e DLC-Ag na viabilidade de células da linhagem de fibroblastos (3T3) (Figura 18), utilizando o ensaio com MTT (Figura 19) de acordo com a ISO 10993-5/2009, a qual determina que a redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico.

Inicialmente, as células foram deixadas em garrafas de cultura com meio

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% SFB (Soro fetal bovino) e 1% de penicilina/estreptomicina para confluência. Ao atingir a quantidade adequada, as células foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços na concentração de 2×10^5 células/poço em 3 ml de meio DMEM em cada poço, e as placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ para adesão inicial das células. Após esse período, meio foi retirado e foram acrescentados 3 ml de Tampão Salina Fosfato (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) para lavagem dos poços, sendo removido posteriormente. Os discos com tratamento foram posicionados com a superfície tratada sobre as células e 3 ml de meio de cultura foram adicionados em cada poço, com incubação das placas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Os discos sem tratamento foram utilizados como controle e a superfície polida foi colocada em contato com as células. Também foram acrescentados poços com células que não foram expostas ao material como controle do crescimento.

Figura 18 – Células de linhagem Fibroblastos (3T3)



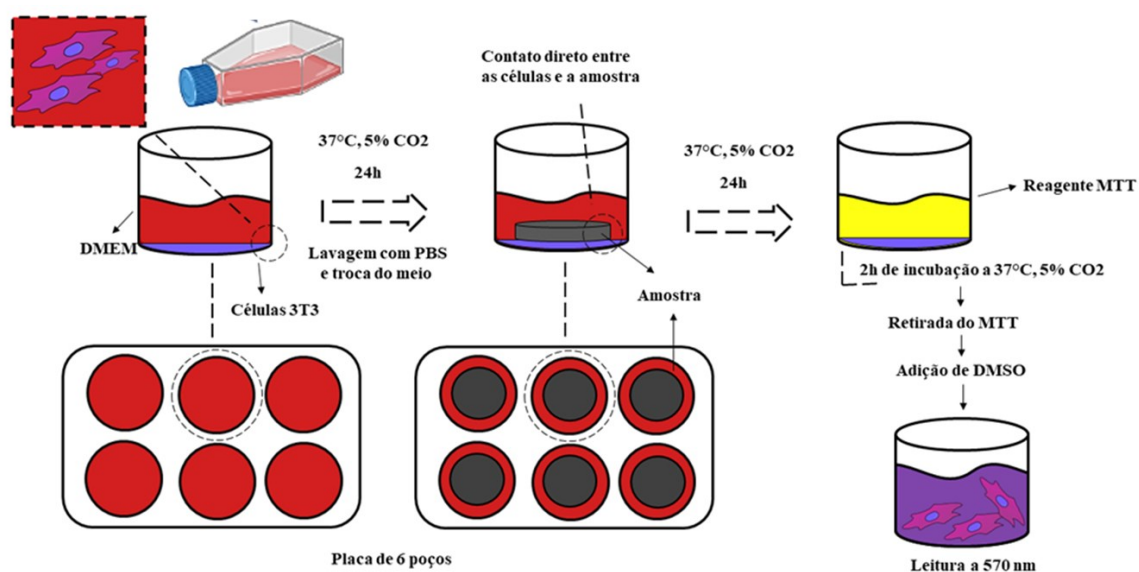
Legenda: Fibroblastos expandidos para teste de viabilidade celular.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após cada período experimental, os poços das placas de cultura foram lavados com 1 ml de Tampão Salino Fosfato (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) e receberam 1 ml de solução de MTT (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

diluída na concentração de 0,5 mg/ml em PBS. As placas foram incubadas por 3 horas em estufa de cultura a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, para que ocorresse a formação dos cristais de formazan. Decorrido o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e os cristais formados foram dissolvidos com 1 ml de DMSO (Dimethyl Sulfoxide). As placas foram deixadas no shaker sob baixa agitação (Biomixer TS-2000A) por 10 minutos.

Em seguida, foram retirados 100 µl de cada poço e distribuídos em placa de 96 poços. A absorbância foi lida a 570 nm usando um leitor de microplacas (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Figura 19 – Etapas do ensaio de viabilidade celular MTT



Legenda: Etapas do ensaio MTT.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Avaliação da ação antimicrobiana utilizando parafuso

Para determinar a eficácia antimicrobiana do filme de DLC e DLC-Ag nos parafusos de Ti6Al4V, os grupos experimentais foram divididos conforme o quadro 3.

Quadro 3 – Divisão dos grupos

Grupos	N de Amostras	Material	Tratamento de superfície	Marca comercial
Grupo Controle	10	Parafuso de Ti6Al4V	Sem tratamento	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil
Grupo DLC	10	Parafuso de Ti6Al4V	deposição de filme DLC	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil
Grupo DLC-Ag	10	Parafuso de Ti6Al4V	deposição de filme DLC-Ag	Conexão Sistema de Prótese, São Paulo, Brasil

Legenda: Grupos experimentais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

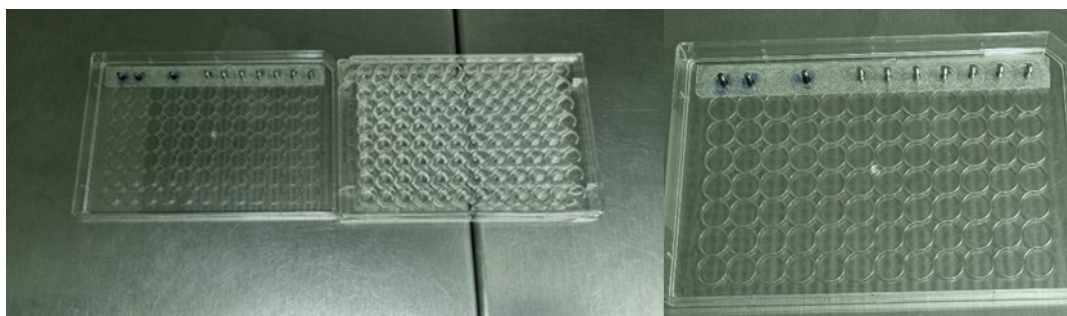
4.7.1 Avaliação da ação antimicrobiana na placa de cultura

Uma suspensão de *E. faecalis* foi padronizada a partir da cultura de 24 horas em solução fisiológica estéril na concentração de 1×10^{10} UFC/ml ($\lambda = 760$ nm, DO = $1,278 \pm 0,02$), por espectrofotometria, e diluída em caldo BHI.

Os parafusos, com deposição de DLC, DLC-Ag e sem deposição, foram fixados, pela parte superior na tampa da placa de 96 poços, com o auxílio de uma fita dupla face e todo o conjunto foi esterilizado em luz UV por 10 minutos (Figura 14 e

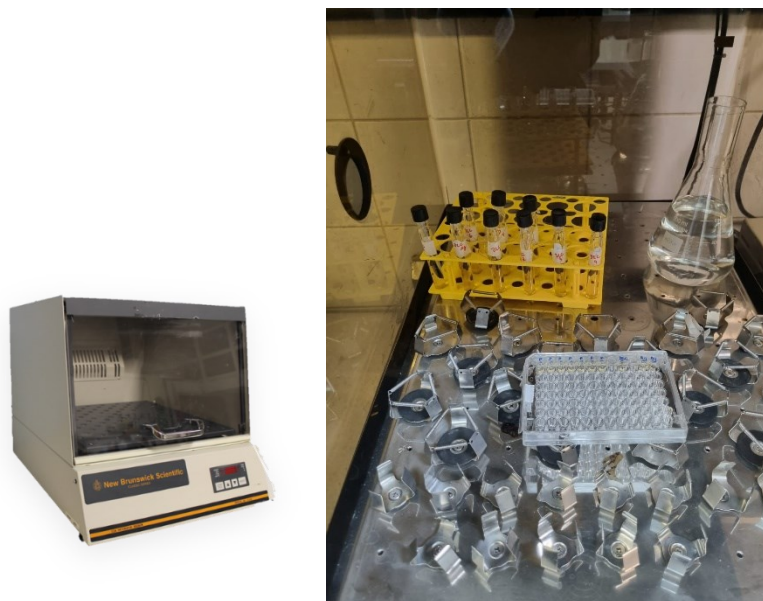
Figura 20). Após, os parafusos foram mergulhados em 297 μ l de caldo BHI e 3 μ l da suspensão bacteriana foram acrescentados em cada poço, atingindo a concentração final de 1×10^7 UFC/ml. A placa foi vedada com Parafilm® e incubada a 37°C sob aerobiose por 120h, sob agitação (90 rpm) (Figura 21).

Figura 20 - Modelo do teste microbiológico na placa de cultura



Legenda: Parafusos fixados na placa de 96 poços.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 – Agitador com temperatura controlada



Legenda: Agitador com temperatura controlada (*Shaker*).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após o período de incubação, os parafusos foram removidos da tampa e lavados com 100 µl de solução fisiológica, e colocados em tubo cônico para agitação em vórtex (Vixar, Plymouth, EUA) por 3 min. A suspensão obtida foi diluída em série em solução fisiológica e uma alíquota de 10 µl de cada suspensão foram distribuídos em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI, pela técnica da gota. Após 24 h de incubação a 37°C, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas e os resultados foram descritos em UFC/ml. Os procedimentos foram realizados em dois dias diferentes, totalizando n=10.

4.7.2 Avaliação da infiltração e adesão bacteriana na interface implante/pilar protético

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

Para esse ensaio, foi utilizada a padronização já descrita em estudos anteriores, realizados pelo grupo de pesquisa, com padronização da suspensão de *E. faecalis* em caldo BHI contendo 1×10^7 UFC/ml, por espectrofotometria ($\lambda = 760$ nm e $DO = 0,060 \pm 0,02$).

No interior do implante foi colocado 1 µl do inóculo e 1 µl de BHI estéril. O pilar protético foi instalado com torque de 30Ncm, de acordo com a recomendação do fabricante, com auxílio de um torquímetro manual (Figura 22).

Figura 22 – Ensaio microbiológico de formação de biofilme de *E. faecalis* no implante



Legenda: a) inóculo colocado no interior do implante; b) aplicação de 30N de torque no parafuso.
Fonte: Elaborada pelo autor.

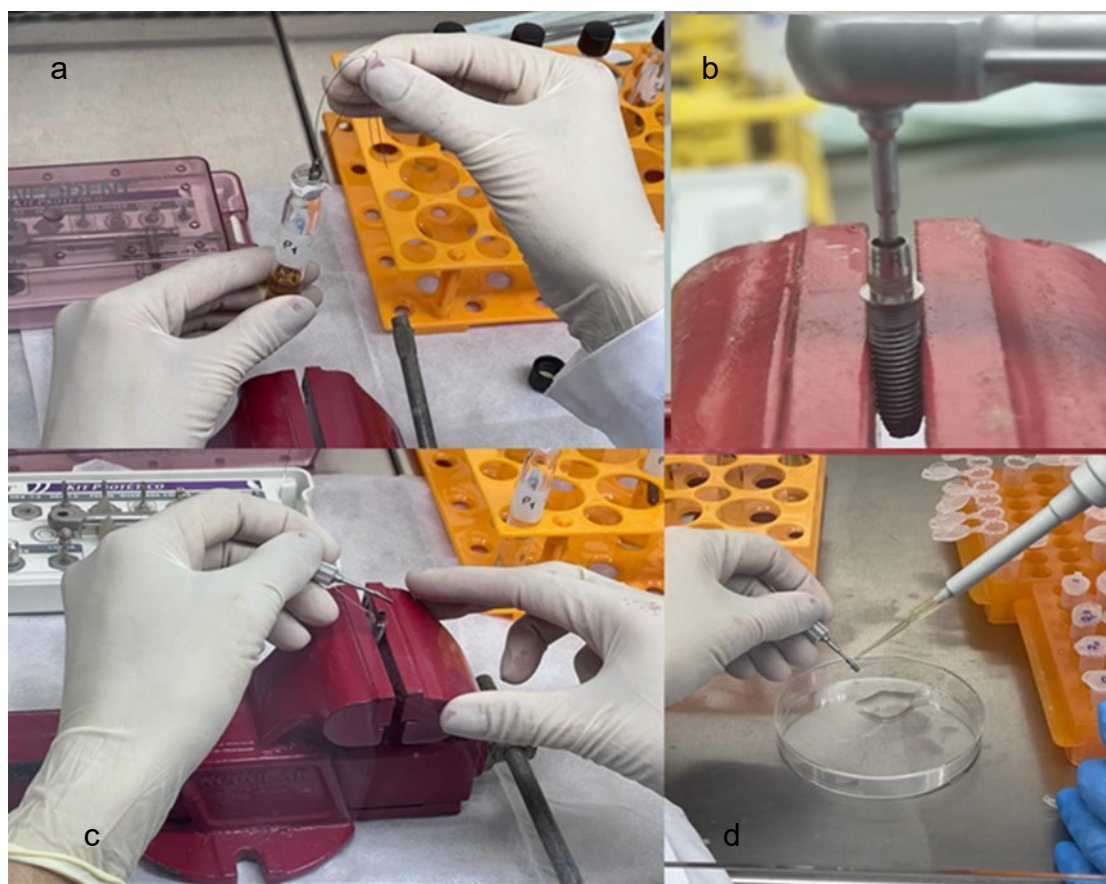
Cada conjunto foi envolto com fio para amarrilho de Cr-Ni de 0,12 mm de espessura, sendo por ele suspenso e estabilizado em um tubo de ensaio de vidro contendo 4 ml de caldo BHI para verificação da contaminação externa e possível extravasamento de microrganismos, identificados pela turvação do meio. Este procedimento foi realizado para que somente a região da interface implante/pilar se mantivesse em contato com o meio de cultura, descartando-se a possibilidade de contaminação do meio de cultura pelo orifício de acesso ao parafuso. Os tubos foram fechados com Parafilm® e a tampa do próprio tubo, para evitar a evaporação do caldo BHI. Os tubos foram então incubados a 37°C sob agitação de 90 rpm, por 5 dias. O tempo de acompanhamento foi determinado em estudo piloto anterior (Cazalini et al., 2017), no qual as amostras foram acompanhadas por 3, 5 e 7 dias, para determinar o tempo máximo em que todas as amostras apresentariam viabilidade bacteriana.

Foi realizado acompanhamento a cada 24h até completar 120 horas de incubação para verificação da possível passagem de bactérias do interior do implante para o caldo (contaminação secundária). O indicativo da ocorrência de infiltração pela interface foi a turvação do meio de cultura.

Após o período de incubação, os conjuntos foram abertos em ambiente estéril e os parafusos lavados com 100 µl de solução fisiológica (Figura 23). Os parafusos foram colocados em tubo cônico e agitado em vórtex (Vixar, Plymouth, EUA) por 3 min. As suspensões foram diluídas em série, como descrita anteriormente, em solução

fisiológica e uma alíquota de 10 μ l de cada suspensão foi distribuída em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI, pela técnica da gota. Após 24 h de incubação a 37°C, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas e os resultados foram descritos em UFC/ml.

Figura 23 – Preparo do parafuso para diluição seriada



Legenda: a) remoção do conjunto do interior do tubo de vidro; b) destorque do parafuso; c) remoção do parafuso; d) lavagem do parafuso com salina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises microbiológicas foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados obtidos no ensaio com os discos tiveram uma distribuição normal, verificada através do teste de normalidade Shapiro-Wilk. A partir desses resultados, os dados foram analisados pelos testes ANOVA e de Tukey para comparações entre os grupos.

Para as análises realizadas nos ensaios com os parafusos, em placas de cultura e no modelo implante/pilar, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e a comparação entre os grupos através do teste de Dunn. O nível de significância para todos os testes foi estabelecido em 5%.

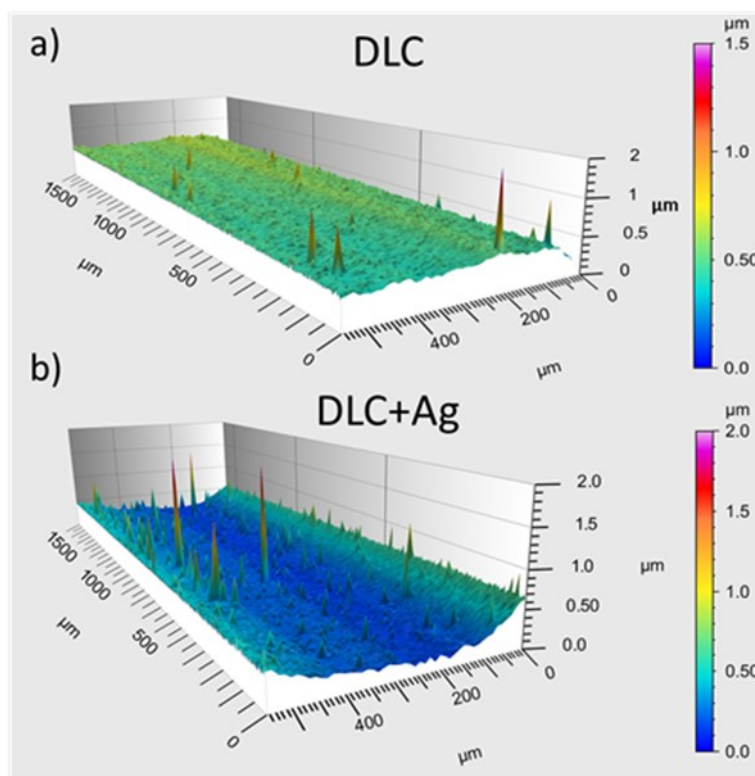
5 RESULTADOS

5.1 Caracterização

5.1.1 Perfilometria mecânica dos filmes de DLC e DLC-Ag

As medidas de espessura realizadas no perfilômetro mecânico indicam que os recobrimentos possuem espessura de 180 ± 20 nm.

Figura 24 – Perfilometria mecânica



Legenda: Imagens da superfície dos filmes de (a) DLC e (b) DLC-Ag obtidos por meio de medidas de perfilometria mecânica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na tabela 1 são apresentados os valores de R_p (Altura máxima do pico do perfil) e R_a (Altura média aritmética). Através da análise de perfilometria observa-se que a rugosidade do DLC com a prata incorporada, apresenta picos de intensidade maior, que é um dos fatores que leva a rugosidade maior que o DLC-Ag.

Tabela 1 – Parâmetros de rugosidade

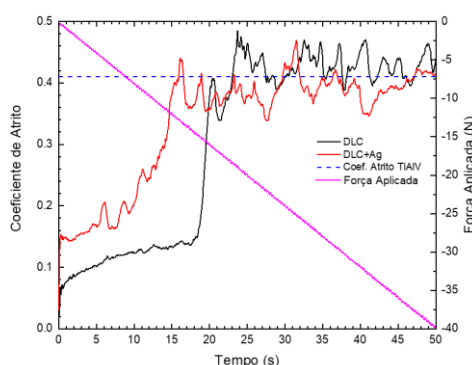
	R_p (μm)	R_a (μm)
DLC	0,100	0,0128
DLC-Ag	0,341	0,0138

Legenda: Parâmetros de rugosidade obtidos por meio de medidas de perfilometria mecânica. R_p : (é a média dos picos dentro da área escaneada de $1500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2. Análise de aderência dos filmes de DLC pela técnica de *scratch test*

Figura 25 – Resultados dos testes de *scratch* dos recobrimentos de DLC e DLC-Ag



Legenda: A curva rosa indica a força aplicada (eixo y da direita) em função do tempo. As curvas vermelha, preta e linha tracejada azul são relacionadas ao coeficiente de atrito (eixo y da esquerda). A linha azul indica qual o coeficiente de atrito dinâmico esperado para o Ti6Al4V (~0.41). Desta forma, quando as curvas preta e vermelha alcançam este valor, temos um indicativo de que o recobrimento de DLC descolou do substrato e estamos vendo apenas o Ti6Al4V.

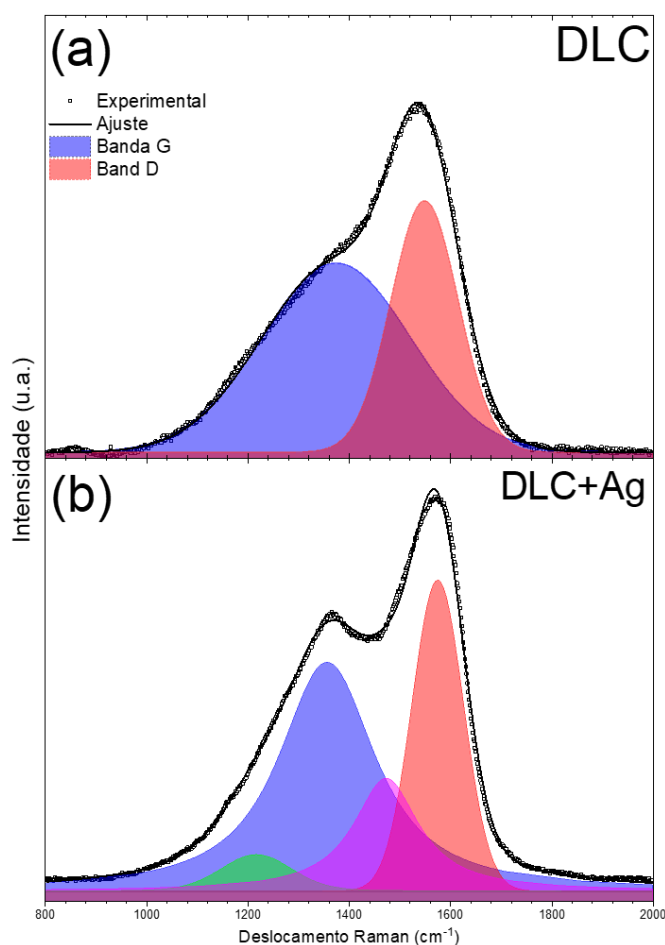
Fonte: Elaborado pelo autor.

Como descrito na literatura, os filmes de DLC possuem alta dureza, baixo coeficiente de atrito e são bem resistentes ao desgaste contra metais. O valor de coeficiente de atrito varia entre 0,01 e 0,28 sendo sensíveis as condições ambientes (Bewilogua, Hofmann, 2014), e o coeficiente de atrito dinâmico esperado para o Ti6Al4V (~ 0.41) (Fellah et al., 2014; Hatem et al., 2017; Segu et al., 2021).

Os resultados do teste apontaram o coeficiente de atrito do DLC-Ag $0,154 \pm 0,008$ e do DLC $0,12 \pm 0,1$.

5.1.3 Análise dos filmes de DLC por Espectroscopia de Espalhamento Raman

Figura 26– Espectro Raman



Legenda: Espectro Raman dos recobrimentos de (a) DLC e (b) DLC-Ag obtidos pela excitação com laser verde (532 nm). As deconvoluções das bandas G e D foram feitas utilizando funções de Voigt.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 26 apresenta os espectros Raman dos recobrimentos juntamente com as deconvoluções das bandas que foi realizado utilizando funções de Voigt. O espectro de espalhamento Raman para filmes de carbono amorfo, apresentam dois picos característicos, um próximo a 1580 cm^{-1} e outro próximo de 1360 cm^{-1} , conhecidos como banda G e D, respectivamente. O pico G ocorre devido modos de estiramento E_{2g} de ligações sp^2 dos anéis de carbono. Já a banda D normalmente é relacionada a modos breathing A_{1g} distorcidos de ligações sp^2 do carbono no anel.

Na amostra de DLC-Ag, além destas duas bandas, para realizar um ajuste satisfatório, foi necessário adicionar duas novas funções de Voigt centradas em 1215 cm^{-1} e 1476 cm^{-1} que podem estar relacionadas à modos vibracionais de estiramento C=C (verde) e modos wagging C-H (rosa), respectivamente.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos por meio da caracterização por Espectroscopia Raman para cada um dos filmes.

Adotou-se as seguintes nomenclaturas para estes resultados:

G Peak = Comprimento de onda do pico G;

FWHM_G = Largura a meia altura do pico G;

ID/IG = Razão entre as áreas dos picos D e G.

De acordo com Chu e Li (2006) a razão entre as intensidades das bandas D e G (ID/IG) nos dá indicativos do tamanho dos planos grafíticos nos recobrimento DLC.

Tabela 2 – Resultados dos ajustes das bandas G e D realizados nas medidas de espectroscopia Raman dos recobrimentos de DLC e DLC-Ag

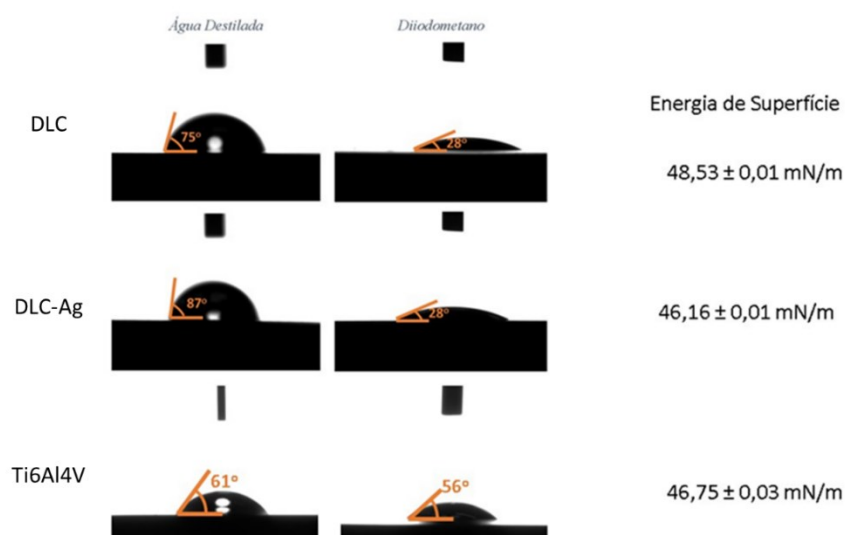
Amostra	Posição do Pico G(cm^{-1})	FWHM* (cm^{-1})	Posição do Pico D (cm^{-1})	FWHM (cm^{-1})	AD/AG**	ID/IG***
DLC	$1548,6 \pm 0,2$	156 ± 1	1374 ± 2	346 ± 3	$1,6 \pm 0,5$	0,75
DLC-Ag	$1574,5 \pm 0,7$	119 ± 1	1356 ± 3	226 ± 18	$2,0 \pm 0,5$	0,73

Legenda: * Largura à meia altura; ** Razão entre as áreas; *** Razão entre as intensidades.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.4 Ângulo de contato (goniometria)

Figura 27 – Ângulo de contato



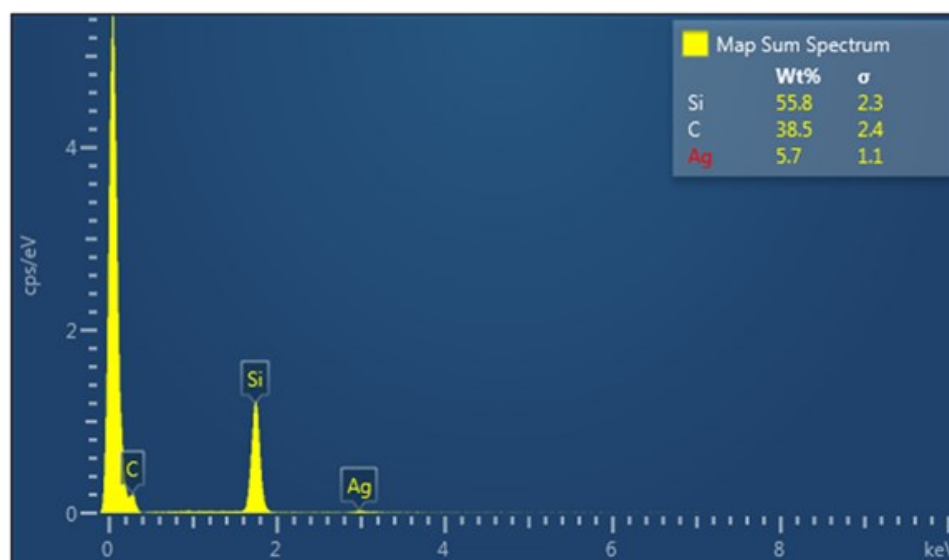
Legenda: gotas de água deionizada (esquerda) e diiodometano (direita) mostrando os ângulos de contato formados com os recobrimentos de DLC e DLC+Ag.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando apenas a água deionizada, há uma tendência de aumento da hidrofobicidade da superfície recoberta com DLC-Ag em relação ao recobrimento apenas com DLC. Este é um indicativo de que a presença da Ag é responsável por uma diminuição da energia de superfície dos recobrimentos.

Para comprovar esta hipótese, a mesma imagem foi obtida utilizando um líquido apolar (diiodometano), o que permitiu calcular a energia de superfície. Já é conhecido que a molhabilidade e, conseqüentemente, a energia de superfície, depende da composição química do recobrimento (Godoy et al., 2018; Han et al., 2018). Os cálculos de energia de superfície apresentam uma diminuição de ~2 mN/m quando adicionamos a prata.

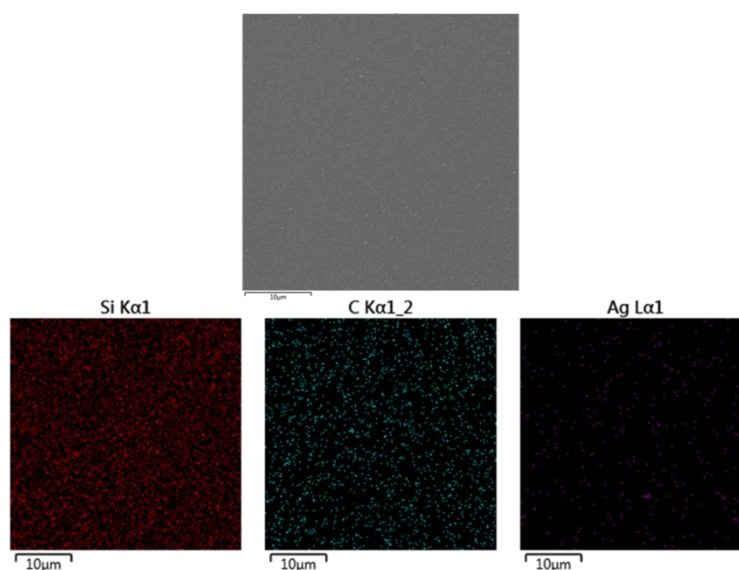
5.1.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Figura 28 – Análise de EDS do recobrimento de DLC-Ag depositado sobre Silício (100)



Legenda: O gráfico apresenta a concentração de Ag incorporada no recobrimento.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29 – Mapa de elementos obtidos por meio de medidas de EDS



Legenda: Mapa de elementos obtidos por meio de medidas de EDS.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

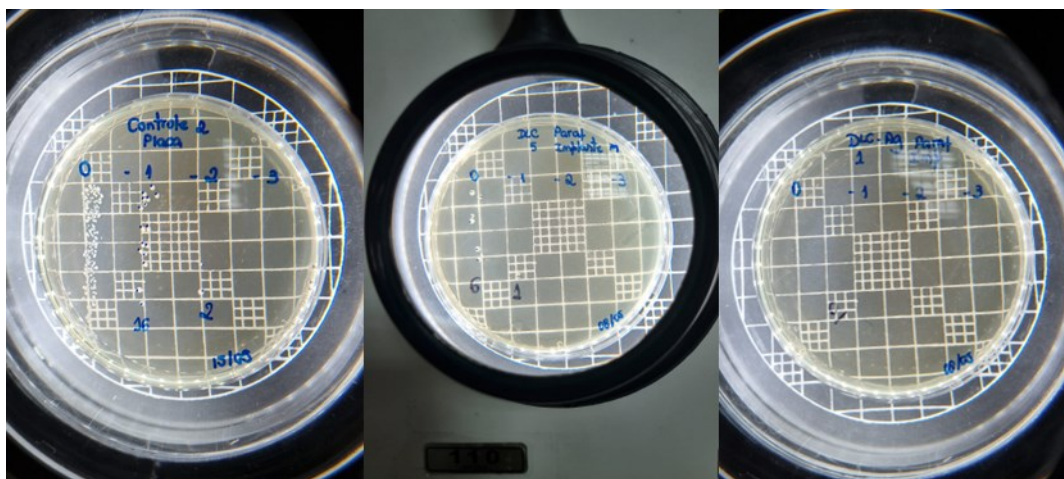
Pelas imagens obtidas no EDS, podemos observar a concentração de prata (Figura 28) e que está homogeneamente distribuída. Isso se repete nas imagens do silício e do carbono (Figura 29).

5.2 Teste microbiológico

5.2.1 Atividade antimicrobiana do filme de DLC e DLC-Ag depositado sobre disco de Ti6Al4V sobre *Enterococcus faecalis*

O plaqueamento em ágar BHI da suspensão bacteriana proveniente da lavagem da superfície dos discos resultou no crescimento de colônias típicas de *Enterococcus faecalis* (Figura 30).

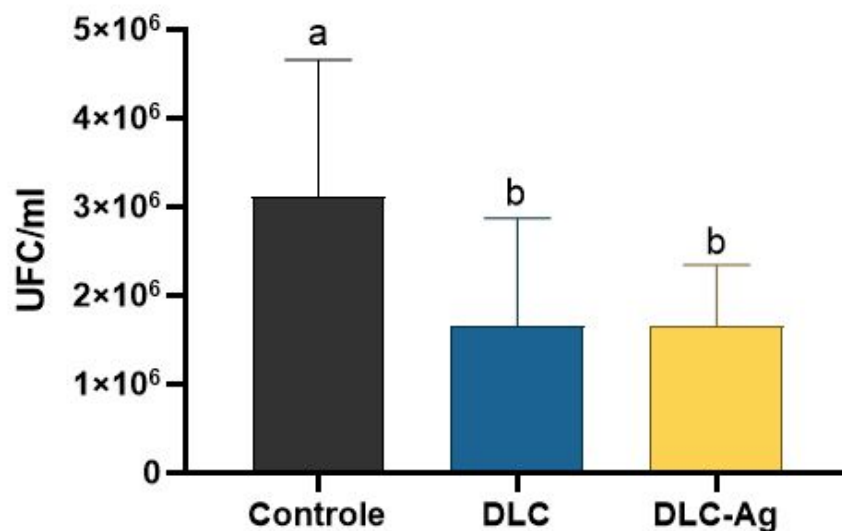
Figura 30 – Colônias de *Enterococcus faecalis* crescidas no ágar brain heart infusion (BHI) após inoculação da suspensão resultante do tratamento de DLC e DLC-Ag



Legenda: Contagem das colônias de *Enterococcus faecalis* após inoculadas em BHI da suspensão inicial P (puro) e diluições 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 – Gráfico de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* após incubação sobre discos metálicos funcionalizados



Legenda: Grupo controle= a; DLC= b; DLC-Ag= b. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultado na análise antimicrobiana demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o controle e os grupos DLC e DLC-Ag, porém não houve diferença estatística entre os grupos do DLC e DLC-Ag ($p < 0,05$).

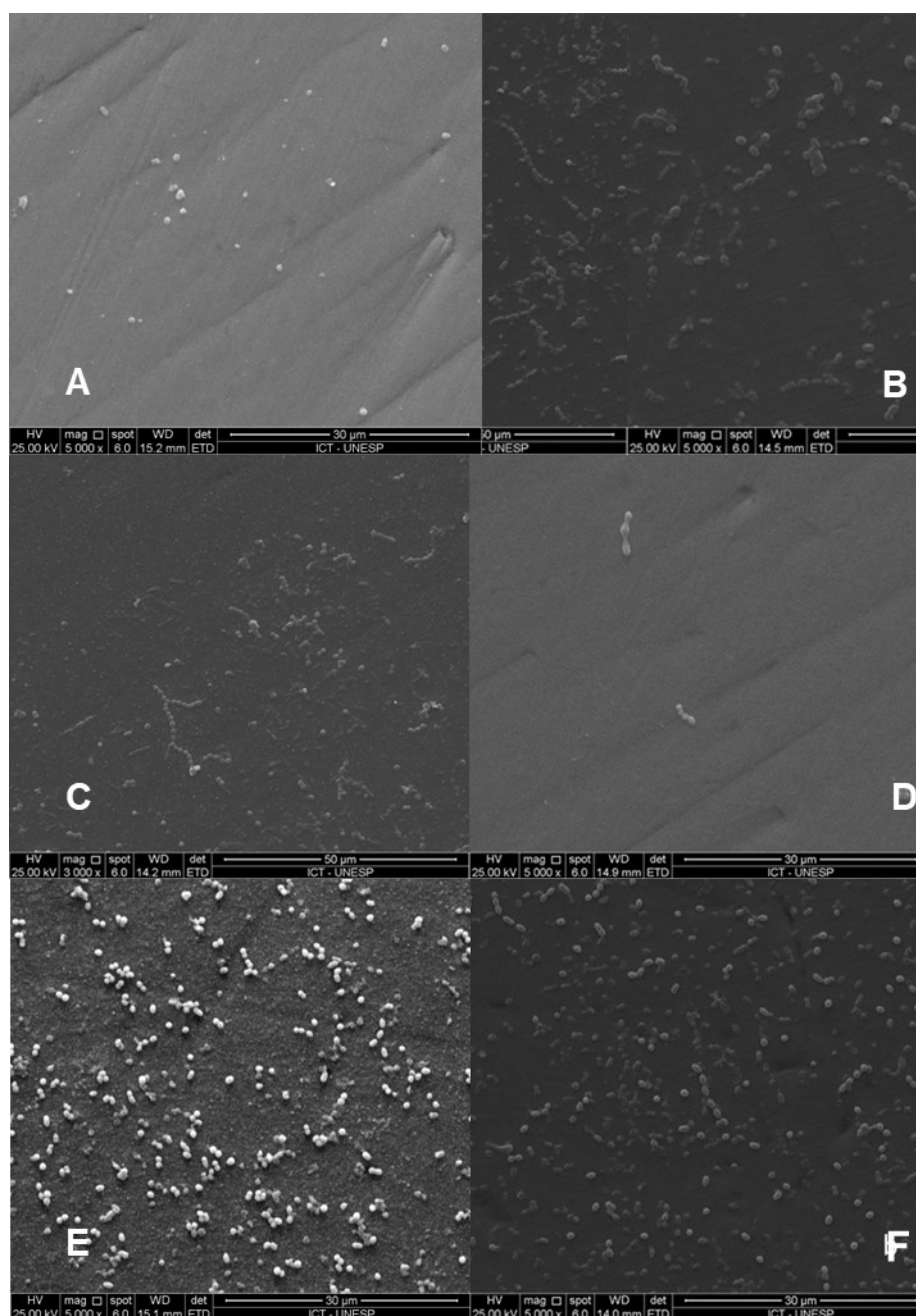
5.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

5.3.1 MEV dos discos

Nas imagens obtidas no MEV foi observada maior quantidade de bactérias na superfície do disco depositado com DLC-Ag, ocasionada pela possível maior rugosidade do material.

Nas imagens obtidas para o grupo controle e o grupo DLC demonstraram uma quantidade menor de células aderidas a superfície.

Figura 32 – Imagens das colônias de *E. faecalis* observadas na superfície dos discos



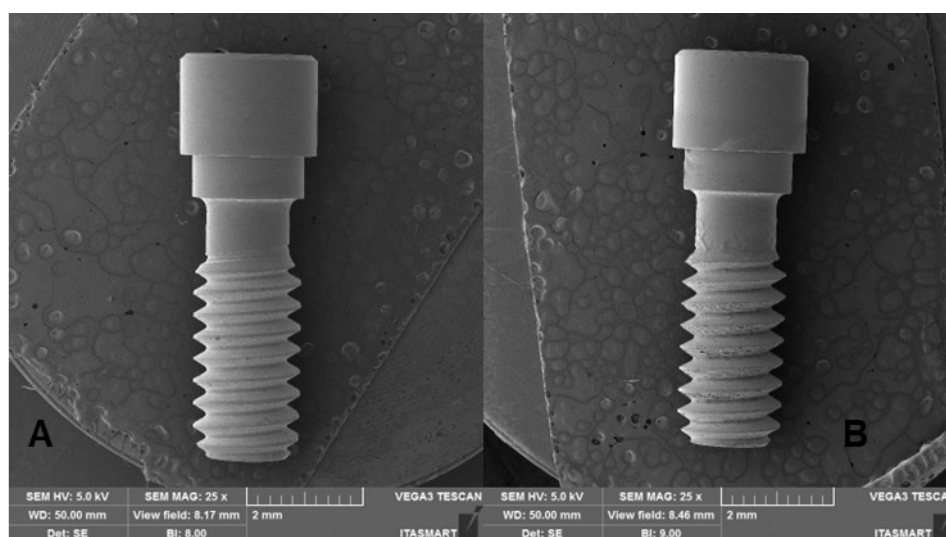
Legenda: A e B= colônias na superfície do disco controle, sem deposição; C e D=colônias na superfície do disco com deposição de DLC; E e F=colônias na superfície do disco com deposição de DLC-Ag. Imagens A, C e E estão com aumento de 3000x e imagens B, D e F, estão com aumento de 5000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2 MEV dos parafusos

Nas imagens obtidas no MEV não foi observada diferença na quantidade de colônias na superfície dos parafusos, seja depositado com DLC ou DLC-Ag. No entanto, nas imagens do grupo controle foi observada uma quantidade maior de células aderidas a superfície do parafuso.

Foi observado também, a delaminação do material quando submetido ao torque recomendado pelo fabricante.

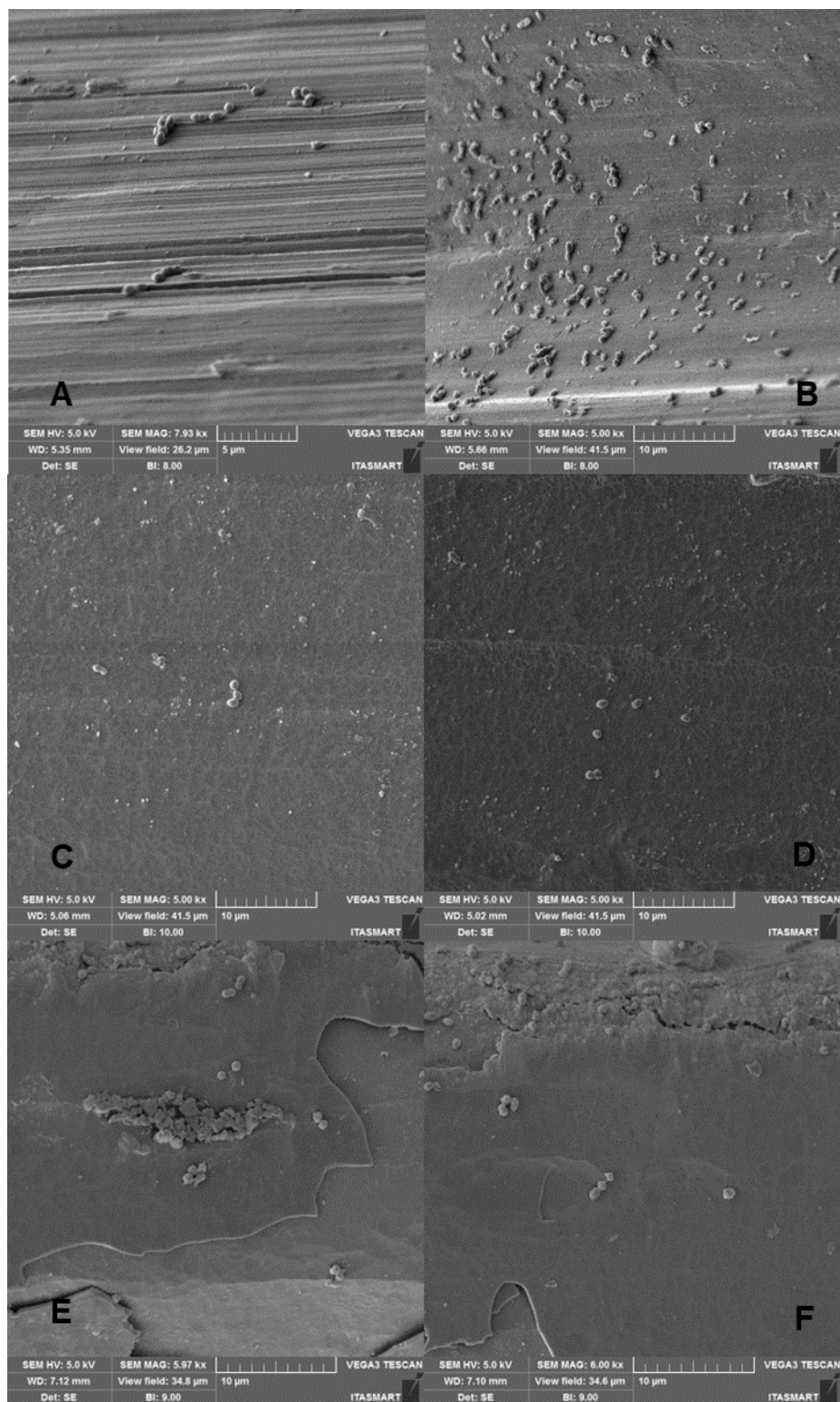
Figura 33 – Imagens dos parafusos



Legenda: A = parafuso controle, sem deposição; B = parafuso com deposição de DLC-Ag. Aumento de 3000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

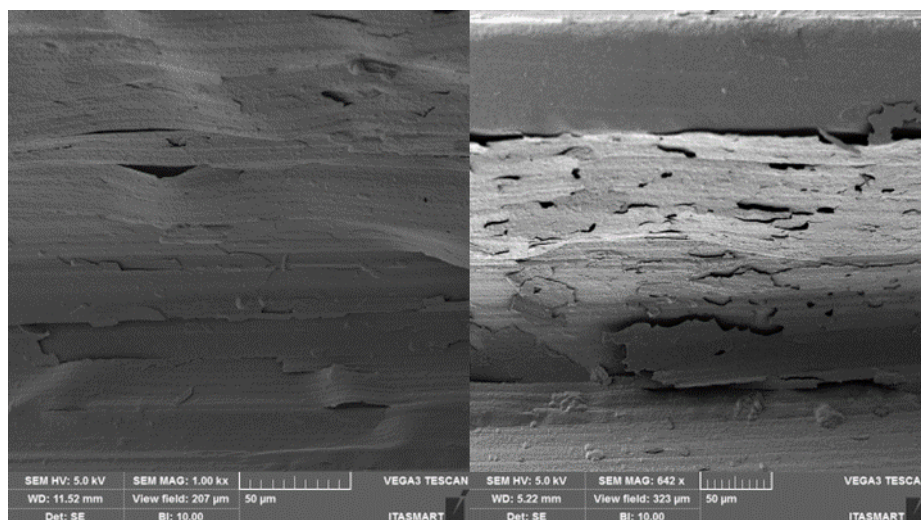
Figura 34 – Imagens das colônias de *E. faecalis* nos parafusos



Legenda: A e B=colônias observadas no parafuso controle, sem deposição; C e D=colônias observadas no parafuso com deposição de DLC; E e F= colônias observadas no parafuso com deposição de DLC-Ag. Aumento de 5000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

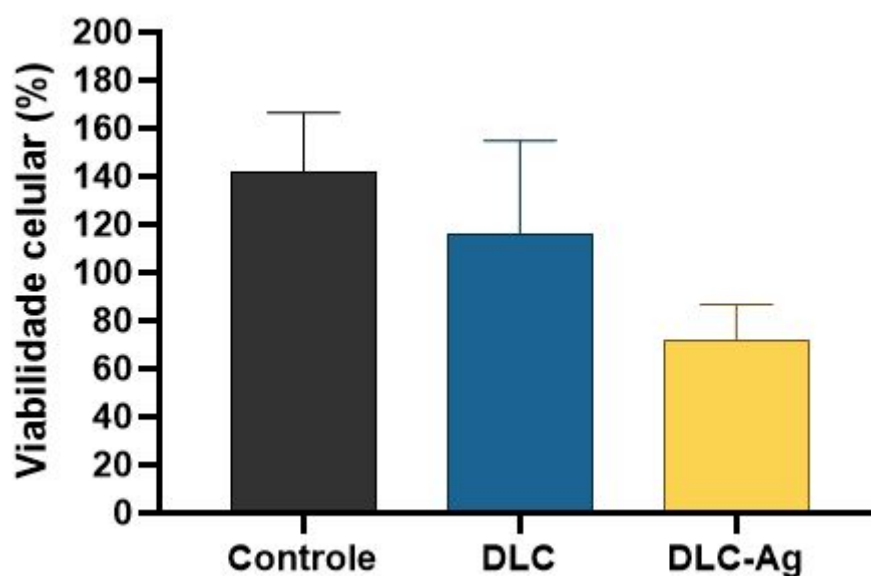
Figura 35 – Imagem do parafuso com a deposição delaminada



Legenda: Imagem de microscopia eletrônica.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Análise de citotoxicidade dos filmes de DLC e DLC-Ag

Figura 36– Gráfico da viabilidade celular frente ao fibroblasto



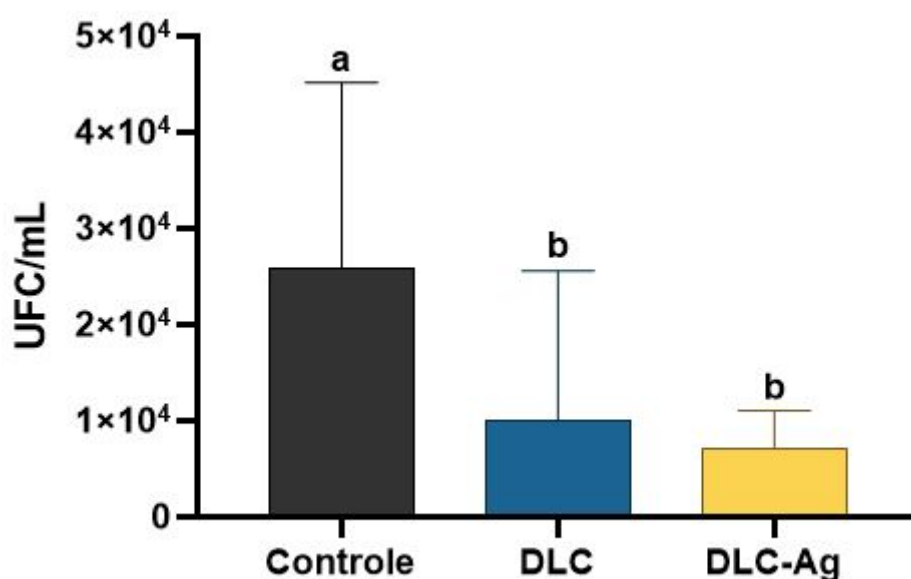
Legenda: Viabilidade do fibroblatos (3T3). Controle = 142%, DLC, 116% e DLC-Ag = 71,5%.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados do teste apontaram que as amostras não apresentaram efeito citotóxico após contato por 24 h com células da linhagem de fibroblastos (3T3). Os resultados do teste de MTT demonstraram porcentagens de viabilidade de 142% para o grupo controle, sem deposição, 116% para o grupo DLC e 71,5 para o grupo DLC-Ag. Os valores acima de 100% demonstram aumento na proliferação celular em comparação com o controle de crescimento sem exposição ao material. Apesar dos valores mais baixos, o grupo DLC-Ag ainda foi considerado como não citotóxico, de acordo com a ISO 10993-5/2009, que determina que quando a redução da viabilidade celular for menor que 30%, o material é considerado com efeito não citotóxico.

5.5 Avaliação da ação antimicrobiana na placa de cultura

A análise dos resultados foi realizada por meio da comparação entre os dados obtidos dos grupos avaliados, como descrito no tópico 5.2.

Figura 37 – Gráfico de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* após incubação sobre o parafuso



Legenda: Grupos controle= a; DLC= b; DLC-Ag= b. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

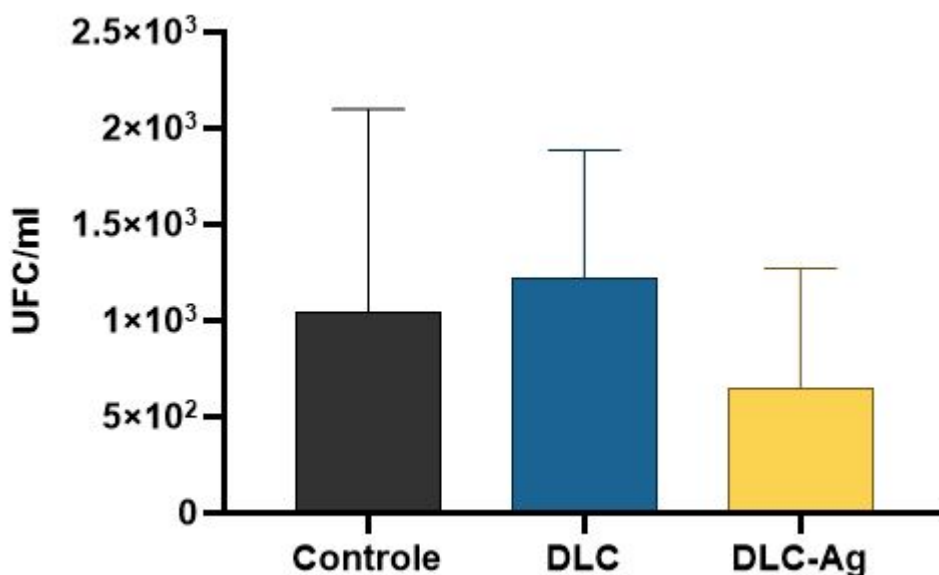
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultado na análise antimicrobiana demonstraram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o controle e os grupos DLC e DLC-Ag, o que demonstra redução no crescimento bacteriano nas amostras depositadas. Porém não houve diferença estatística entre os grupos do DLC e DLC-Ag ($p < 0,05$).

5.6 Análise da infiltração e adesão bacteriana na interface implante/pilar protético

A análise dos resultados foi realizada por meio da comparação entre os dados obtidos dos grupos avaliados, como descrito no tópico 5.2.

Figura 38 – Gráfico de UFC/ml de *Enterococcus faecalis* após incubação sobre o parafuso no modelo implante/pilar



Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar de observar uma ligeira redução nas colônias em contato com parafuso depositados com DLC-Ag, os resultado da análise antimicrobiana não demonstraram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Os avanços tecnológicos e científicos tornam a implantodontia, cada vez mais segura e previsível (Sheridan et al., 2016; Wennerberg et al., 2018; Katsavochristou et al., 2019). Entretanto, dentre as causas do insucesso do implante está a periimplantite que apresenta a mesma patogênese da doença periodontal e está associada a presença de patógenos semelhantes e contidos no biofilme, além de fungos orais e do componente imunológico, responsável pela resposta do hospedeiro (Albrektsson et al., 1994; Albrektsson et al., 2012; Dhir et al., 2013; Lindhe, Meyle, 2008; Retamal-Valdes et al., 2019; Zhao et al., 2011).

A importância deste trabalho reside justamente na proposta da deposição de finos filmes de DLC e DLC-Ag visando contribuir para a redução da adesão bacteriana, como o achado em estudos como Cazalini et al. (2017).

Ao analisar os resultados obtidos na caracterização físico-química do material através da espectroscopia Raman, foi possível investigar a composição molecular dos revestimentos DLC e DLC-Ag e analisar a estrutura e o grau de desordem do material, demonstrando que no filme depositado foram obtidos dois picos característicos, um próximo a 1580 cm^{-1} e outro próximo de 1360 cm^{-1} , conhecidos como banda G e D, e os espectros Raman em ambas as amostras consistiram em duas bandas características (D e G), indicando a formação da fase DLC, respectivamente, de acordo com a literatura (Reich, Thomsen, 2004; Chu, Li, 2006; Zhao et al., 2020; Arslan et al., 2022).

A razão entre as intensidades das bandas D e G (ID/IG) nos dá indicativos do tamanho dos planos grafíticos nos recobrimentos com DLC. Tuinstra, Koenig (1970) propõem que ID/IG é inversamente proporcional ao tamanho do *cluster* de grafite, logo o aumento da razão ID/IG indica que o filme é mais amorfo, ou seja, a matriz de carbono torna-se mais desordenada. E, não foi observada variações significativas nos valores de ID/IG (Tabela 2). Este é um indicativo de que a presença da prata não afeta significativamente a concentração, nem a organização do grafite no recobrimento.

De acordo com a Guillizzoni (2011), uma das características mais relevantes no material é a hidrofobicidade, onde a variável molhabilidade está ligada a quantidade com que uma superfície pode aderir ou repelir um líquido. Desta forma,

com base no ângulo de contato (AC) é possível caracterizar a capacidade de molhabilidade da superfície, quando AC for menor que 90° , caracteriza-se esta superfície como hidrofílica, ou seja, ela foi molhada pelo líquido. Quando a superfície de deposição não for molhada pela gota, caracteriza-se a mesma como hidrofóbica e o AC será maior que 90° resultando no formato esférico da gota (Guilizzoni, 2011). Em relação aos resultados obtidos no DLC e DLC-Ag do trabalho, considerando apenas a água deionizada, há uma tendência de aumento da hidrofobicidade da superfície recoberta com DLC-Ag em relação ao recobrimento apenas com DLC.

Este resultado da goniometria é um indicativo de que a presença da Ag é responsável por uma diminuição da energia de superfície dos recobrimentos, confirmado com o diiodometano (Godoy et al., 2018; Han et al., 2018). E sendo a energia livre da superfície um parâmetro relacionado a colonização microbiana, onde um alto ângulo de contato leva a uma baixa energia superficial e favorece as propriedades antibacterianas e um baixo ângulo de contato, ou seja, alta energia superficial favorece a adesão e colonização da superfície (Medina et al., 2012; Al-Jumaili et al., 2017), logo sugere-se que a Ag atingiu a propriedade desejada.

De acordo com os resultados obtidos com a perfilometria, analisando-se as alturas e profundidades dos picos e vales, a rugosidade apresentada pelo filme DLC-Ag é superior ao filme de DLC e esses resultados estão relacionados a aderência bacteriana. Isso demonstra que uma superfície áspera tem uma influência significativa na adesão bacteriana, favorecendo a colonização (Marciano et al., 2011; Medina et al., 2012). Em geral, uma superfície com baixa rugosidade superficial tem maior probabilidade de inibir a adesão bacteriana (Liu et al., 2008; Medina et al., 2012; Maas, 2016; Cazalini et al., 2017).

O resultado da perfilometria foi corroborado com o MEV do disco Ti6Al4V revestido com DLC-Ag que apresentou maior adesão bacteriana, mas com contagem de UFC/ml semelhante ao DLC, o que sugere que a prata associada teve efeito antimicrobiano.

O comportamento dos filmes de DLC e DLC-Ag apresentaram resultados no teste de riscamento (*scratch test*) de que a incorporação da Ag não melhora as qualidades de adesão e resistência mecânica. Segundo Segu et al. (2021), o coeficientes de atrito para as superfícies rugosas são ligeiramente menores do que para as superfícies lisas (Fellah et al., 2014; Hatem et al., 2017; Segu et al., 2021).

A análise da curva de coeficiente de atrito dinâmico x distância demonstrou que os 2 filmes apresentaram um desempenho dentro do esperado para os parâmetros de processo utilizados. O filme de DLC-Ag rompeu com uma força menor que o DLC puro, indicando que a presença da prata induz a formação de um filme mais frágil. Além disso, o DLC-Ag ($0,154 \pm 0,008$) apresenta um coeficiente de atrito maior que o DLC ($0,12 \pm 0,1$) e pode estar relacionado à maior rugosidade apresentada nas amostras de DLC-Ag.

Além dos parâmetros físicos, a química da superfície também influencia a resposta biológica do material. E para o estudo da distribuição e confirmação da presença dos elementos químicos na superfície dos discos de Ti6Al4V foi realizado o mapeamento por Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), apresentado na Figura 28 (Zhao et al., 2020). E através da avaliação dos parâmetros utilizados no feixe de elétrons do EDS foram obtidas imagens com as quais foi possível confirmar a presença de prata no filme de DLC e que a prata está homogeneamente distribuída. Isso se repetiu nas imagens obtidas para a caracterização do silício e do carbono (Figura 29) (Mazare et al., 2018; Zhao et al., 2020).

Nesse estudo, uma vez caracterizado o material depositado como DLC e DLC-Ag, tinha-se como principal objetivo estabelecer a capacidade antimicrobiana desse lubrificante sólido frente a bactéria *Enterococcus faecalis*, com baixa toxicidade para as células do hospedeiro. *Enterococcus faecalis* é um dos microrganismos, com maior capacidade de se multiplicar em condições extremas como privação nutricional, em condições anaeróbias e com pH elevado (Park et al., 2015).

Analisando os resultados dos ensaios microbiológicos *in vitro* realizados nos discos, observamos uma efetiva redução ($p < 0,05$) na contagem de UFC/ml em relação a amostra sem deposição. O comportamento do DLC corrobora com outras pesquisas (Harrasser et al., 2015; Juknius et al., 2016; Cazalini et al., 2017; Juknius et al., 2020), e com o esperado frente a caracterização do material utilizado no trabalho, onde a rugosidade superficial e a goniometria demonstraram uma superfície mais lisa e hidrofóbica do DLC em relação ao controle.

O DLC é uma classe de materiais em que sua estrutura e ligações químicas influenciam diretamente na adesão bacteriana (Marciano et al., 2009; Marciano et al., 2011). O desempenho antibacteriano do DLC foi relacionado a vários mecanismos, e

está principalmente associado aos danos físicos do contato direto com o material causando comprometimento da membrana e liberação de metabolitos intracelulares.

Baseados nos resultados microbiológicos obtidos nos discos, foi analisada a ação antimicrobiana da deposição de DLC e DLC-Ag nos parafusos, e foi obtido um resultando efetivo, com redução significativa ($p < 0,05$) nas análises do crescimento bacteriano nos parafusos isolados, fixados nas microplacas. Porém, quando os testes foram realizados utilizando o modelo implante/pilar, onde o parafuso recebeu o torque de 32N, o comportamento do material não reproduziu os resultados anteriores sem diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Foi observado nas imagens do MEV, que a força aplicada no torque, provocou a delaminação do material depositado e acúmulo de bactérias na região com a superfície do titânio exposta. Além disso, o destorque pode ter promovido a desorganização de parte da estrutura do biofilme, que foi eliminada durante a lavagem do parafuso com solução fisiológica.

Através das imagens de MEV dos discos, foi possível observar que o filme de DLC apresentou um comportamento coincidente aos resultados obtidos na contagem de UFC/ml, onde era esperado uma menor adesão bacteriana, o que confirma com os resultados de outras pesquisas (Juknius et al., 2016; Cazalini et al., 2017; Juknius et al., 2020). Porém nem todos os trabalhos apresentam o mesmo resultado e isso pode ser atribuído às diferentes resistências das cepas bacterianas ao Ag ou a concentração de prata depositada (Cardoso et al., 2016; Prat et al., 2021).

Entretanto, as imagens de MEV do DLC-Ag nos discos, apresentou uma superfície com grande acúmulo de bactérias, o que também endossa o resultado de maior rugosidade da superfície. Apesar disso, a contagem de UFC/ml apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) dos resultados obtidos nas amostras de DLC e DLC-Ag, em relação ao controle, sugerindo que bactérias observadas no MEV não apresentaram capacidade de proliferação no meio de cultura e que houve ação antimicrobiana efetiva da deposição com DLC e DLC-Ag.

Segundo Velioglu et al. (2016), existem duas explicações possíveis para o mecanismo antibacteriano do revestimento DLC. Primeiro, a superfície altamente lisa desse revestimento pode impedir a aderência e a colonização dessas bactérias; em segundo lugar, o revestimento com DLC pode cobrir a superfície da liga de Ti6Al4V que é adequada para o crescimento bacteriano. O que corrobora com os nossos resultados, inclusive quando os parafusos que receberam torque.

A citotoxicidade *in vitro*, foi realizada nos discos de Ti4Al6V usando o método colorimétrico MTT, onde avaliamos a capacidade das células viáveis de converter o sal MTT em cristais de formazan (ISO 10993-5/2009). Nos resultados obtidos na pesquisa os dois tipos de tratamento se comportaram como não citotóxico, conforme o aceito na literatura, que determina que quando a redução da viabilidade celular for menor que 30%, o material é considerado com efeito não citotóxico (ISO 10993-5/2009). Mesmo o DLC-Ag apresentando um resultado em percentual mais baixo que o DLC, ainda se mantém dentro dos parâmetros aceitáveis calculados considerando o controle negativo como 100% de viabilidade celular.

Esses resultados obtidos corroboram com a literatura que relata que a prata sendo incorporada a materiais como DLC não apresentam citotoxicidade quando colocados em contato direto com células e tecidos (Calazani et al., 2017; Zhang et al., 2018; Odatsu et al., 2020).

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista a totalidade dos resultados obtidos por meio deste trabalho, é possível concluir que a liga de Ti6Al4V foi devidamente revestida por filmes de DLC e DLC-Ag. A intercamada de silício se mostrou efetiva para garantir uma boa aderência de ambos os filmes à liga. Além disso, a inserção da prata não alterou de forma significativa a organização do grafite no recobrimento.

O revestimento com DLC e DLC-Ag nos discos da liga Ti6Al4V apresentaram um comportamento promissor demonstrado com propriedades antibacterianas frente aos biofilmes formados por *Enterococcus faecalis*, quando comparados à liga sem recobrimento.

Os parafusos revestidos com DLC e DLC-Ag apresentaram comportamento antimicrobiano semelhante ao dos discos, quando testados isoladamente. No entanto, quando submetidos ao torque recomendado pelo fabricante, no modelo implante/pilar, os resultados demonstraram delaminação de ambos os filmes e a efetividade não foi verificada nesse estudos

São necessários mais estudos para desenvolvimento de um protocolo que permita a utilização desses lubrificantes com ação antimicrobiana, na implantodontia.

REFERÊNCIAS

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Brånemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990 Winter;5(4):347-59. PMID: 2094653.

Al-Jumaili A, Alancherry S, Bazaka K, Jacob MV. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials (Basel)*. 2017 Sep 11;10(9):1066. doi: 10.3390/ma10091066. PMID: 28892011; PMCID: PMC5615720

Al Meslmani BM, Mahmoud GF, Sommer FO, Lohoff MD, Bakowsky U. Multifunctional network-structured film coating for woven and knitted polyethylene terephthalate against cardiovascular graft-associated infections. *Int J Pharm*. 2015; 485(1-2):270-6. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.041

Amirtharaj Mosas KK, Chandrasekar AR, Dasan A, Pakseresht A, Galusek D. Recent advancements in materials and coatings for biomedical implants. *Gels*. 2022 May 21;8(5):323. doi: 10.3390/gels8050323. PMID: 35621621; PMCID: PMC9140433

Arslan ME, Kurt MŞ, Aslan N, Kadi A, Öner S, Çobanoğlu Ş, et al. Structural, biocompatibility, and antibacterial properties of Ge-DLC nanocomposite for biomedical applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022 Jul;110(7):1667-74. doi: 10.1002/jbm.b.35027. PMID: 35112784.

Assunção WG, Barão VA, Delben JA, Gomes ÉA, Garcia IR Jr. Effect of unilateral misfit on preload of retention screws of implant-supported prostheses submitted to mechanical cycling. *J Prosthodont Res*. 2011 Jan;55(1):12-8. doi: 10.1016/j.jpor.2010.05.002. PMID: 20627771.

Bakaeen LG, Winkler S, Neff PA. The effect of implant diameter, restoration design, and occlusal table variations on screw loosening of posterior single-tooth implant restorations. *J Oral Implantol*. 2001;27(2):63-72. doi:10.1563/1548-1336(2001)027<0063: TEOIDR>2.3.CO;2

Barbosa GA, Bernardes SR, das Neves FD, Fernandes Neto AJ, de Mattos Mda G, Ribeiro RF. Relation between implant/abutment vertical misfit and torque loss of abutment screws. *Braz Dent J*. 2008;19(4):358-63. doi: 10.1590/s0103-64402008000400013. PMID: 19180328.

Bewilogua K; Dieter H. History of diamond-like carbon films—from first experiments to worldwide applications. *Surf Coat Technol* 2014; 242: 214-25. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.01.031

Binon PP. Evaluation of machining accuracy and consistency of selected implants, standard abutments, and laboratory analogs. *Int J Prosthodont*. 1995 Mar-Apr;8(2):162-78. Erratum in: *Int J Prosthodont* 1995 May-Jun;8(3):284. PMID: 7575968.

Binon PP, McHugh MJ. The effect of eliminating implant/abutment rotational misfit on screw joint stability. *Int J Prosthodont*. 1996 Nov-Dec;9(6):511-9. PMID: 9171488.

Bollen CM, Papaioanno W, Van Eldere J, Schepers E, Quirynen M, van Steenberghe D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clin Oral Implants Res*. 1996;7(3):201-11. doi:10.1034/j.1600-0501.1996.070302.x

Bonetti LF, Capote G, Santos LV, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Adhesion studies of diamond-like carbon films deposited on Ti6Al4V substrate with a silicon interlayer. *Thin Solid Films*. 2006; 515(1):375-79. doi:10.1016/j.tsf.2005.12.154

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

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100. doi: 10.3109/02844316909036699. PMID: 4924041.

Bulaqi HA, Barzegar A, Paknejad M, Safari H. Assessment of preload, remaining torque, and removal torque in abutment screws under different frictional conditions: A finite element analysis. *J Prosthet Dent*. 2019;121(3):548.e1-e7. doi: 10.1016/j.prosdent.2018.10.035

Cardoso M, Sangalli J, Koga-Ito CY, Ferreira LL, da Silva Sobrinho AS, Nogueira L Jr. Abutment coating with diamond-like carbon films to reduce implant-abutment bacterial leakage. *J Periodontol*. 2016;87(2):168-74. doi:10.1902/jop.2015.150362. PubMed PMID: 26513267

Carnovale F, Patini R, Peñarrocha-Oltra D, Muzzi M, Pistilli R, Canullo L. Measurement of gap between abutment and fixture in dental conical connection implants. A focused ion beam SEM observation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(4):e449-54. doi:10.4317/medoral.23281

Cazalini EM, Miyakawa W, Teodoro GR, Sobrinho ASS, Matieli JE, Massi M, et al. Antimicrobial and anti-biofilm properties of polypropylene meshes coated with metal-containing DLC thin films. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Jun;28(6):97. doi: 10.1007/s10856-017-5910-y. Epub 2017 May 17. PMID: 28560581.

Chawhuaveang DD, Yu OY, Yin IX, Lam WY, Mei ML, Chu CH. Acquired salivary pellicle and oral diseases: a literature review. *J Dent Sci*. 2021 Jan;16(1):523-29. doi: 10.1016/j.jds.2020.10.007. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33384841; PMCID: PMC7770358

Chu PK, Li L. Characterization of amorphous and nanocrystalline carbon films. *Mater Chem and Phys* 2006;96(2-3):253-77. doi:10.1016/j.matchemphys.2005.07.048.

Cosco TD, Howse K, Brayne C. Healthy ageing, resilience and wellbeing. *Epidemiol Psychiatr Sci.* 2017;26(6):579-83. doi:10.1017/S2045796017000324

Cyphert EL, von Recum HA. Emerging technologies for long-term antimicrobial device coatings: advantages and limitations. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242(8):788-98. doi:10.1177/1535370216688572

Dowling DP, Kola PV, Donnelly K, Kelly TC, Brumitt K, Lloyd L, et al. Evaluation of diamond-like carbon-coated orthopaedic implants. *Diam Relat Mater* 1997;6(2-4):390-3. doi.org/10.1016/S0925-9635(96)00687-5

Echeverria C, Torres MT, Fernández-García M, de la Fuente-Nunez C, Muñoz-Bonilla A. Physical methods for controlling bacterial colonization on polymer surfaces. *Biotechnol Adv.* 2020 Nov 1; 43:107586. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107586. PMID: 32663616.

Fellah M, Labaiz M, Assala O, Dekhil L, Taleb A, Rezag H, Iost A. Tribological behavior of Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys for total hip prosthesis. *Adv Tribol.* 2014;1-13. doi.org/10.1155/2014/4513

Ferrari AC. Diamond-like carbon for magnetic storage disks. *Surf Coat Technol.* 2004; (180–81):190-206. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2003.10.146>

Godoy A, Carlucci FG, Leite DMG, Miyakawa W, Pereira ALJ, Massi M, et al. Plasma nanotexturing of amorphous carbon films by reactive ion etching. *Surf Coat Technol* 2018;354:153-60 doi: 10.1016/j.surfcoat.2018.09.024.

Goodacre CJ, Kan JY, Rungcharassaeng K. Clinical complications of osseointegrated implants. *J Prosthet Dent* 1999;81(5):537-52. doi:10.1016/s0022-3913(99)70208-8

Greenberg AM. Dental implants and evolving discipline. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2015;27(2): ix-x. doi: 10.1016/j.coms.2015.03.001

Grill A. Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials—an overview *Diam Relat Mater.* Feb.2003;12(2):166-70. doi.org/10.1016/S0925-9635(03)00018-9

Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987 Sep 25;237(4822):1588-95.doi:10.1126/science.3629258.

Gristina A. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Oct;(427):4-12. PMID: 15552128.

Guilizzoni, Manfredo. Drop shape visualization and contact angle measurement on curved surfaces. *J Colloid Interface Sci.* 2011;(364):1;230-6. doi.org/10.1016/j.jcis.2011.08.019.

Han JX, Cheng YL, Tu WB, Zhan TY, Cheng YL. The black and white coatings on Ti-6Al-4V alloy or pure titanium by plasma electrolytic oxidation in concentrated silicate electrolyte. *Appl Surf Sci* 2018; 428:684-97 doi.10.1016/j.apsusc.2017.09.109.

Hannig M. The protective nature of the salivary pellicle. *Int. Dent. J.* 2002 Oct; 52(5)suppl.2:417-23. doi.org/10.1111/j.1875-595X.2002.tb00731.x

Harrasser N, Jüssen S, Banke IJ, Kmeth R, von Eisenhart-Rothe R, Stritzker B, et al. Antibacterial efficacy of titanium-containing alloy with silver-nanoparticles enriched diamond-like carbon coatings. *AMB Express.* 2015 Dec;5(1):77. doi: 10.1186/s13568-015-0162-z. PMID: 26646789.

Hatem A, Lin J, Wei R, Torres R, Laurindo C, Soares P. Tribocorrosion behavior of DLC-coated Ti-6Al-4V alloy deposited by PIID and PEMS+PIID techniques for biomedical applications. *Surf Coat Technol* 2017;(332): 223-32. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.07.004.

Hinüber C, Kleemann C, Friederichs RJ, Haubold L, Scheibe HJ, Schuelke T, et al. Biocompatibility and mechanical properties of diamond-like coatings on cobalt-chromium-molybdenum steel and titanium-aluminum-vanadium biomedical alloys. *J Biomed Mater Res A.* 2010 Nov;95(2):388-400. doi: 10.1002/jbm.a.32851. PMID: 20648536.

Hu C, Wang LL, Lin YQ, Liang HM, Zhou SY, Zheng F, et al. Nanoparticles for the Treatment of Oral Biofilms: Current State, Mechanisms, Influencing Factors, and Prospects. *Adv Healthc Mater.* 2019 Dec;8(24):e1901301. doi: 10.1002/adhm.201901301. PMID: 31763779.

Huang Y, Wang J. Mechanism of and factors associated with the loosening of the implant abutment screw: a review. *J Esthet Restor Dent.* 2019;31(4):338-45. doi:10.1111/jerd.12494

Ionescu RN, Totan AR, Imre MM, Țâncu AMC, Pantea M, Butucescu M, et al. Prosthetic materials used for implant-supported restorations and their biochemical oral interactions: a narrative review. *Materials (Basel).* 2022 Jan 28;15(3):1016. doi: 10.3390/ma15031016. PMID: 35160962.

Jardret V, Zahouani H, Loubet JL, Mathia TG. Understanding and quantification of elastic and plastic deformation during a scratch test. *Wear.* 1998;218(1):8-14. doi 10.1016/S0043-1648(98)00200-2.

Jaul E, Barron J. Age-related diseases and clinical and public health implications for the 85 years old and over population. *Front Public Health.* 2017; 5:335. doi:10.3389/fpubh.2017.00335

Jemt T. Modified single and short-span restorations supported by osseointegrated fixtures in the partially edentulous jaw. *J Prosthet Dent.* 1986 Feb;55(2):243-7. doi: 10.1016/0022-3913(86)90352-5. PMID: 3514863.

Jemt T, Lekholm U, Gröndahl K. 3-year followup study of early single implant restorations ad modum Brånemark. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1990;10(5):340-9. PMID: 2098358.

Jemt T. Failures and complications in 391 consecutively inserted fixed prostheses supported by Brånemark implants in edentulous jaws: a study of treatment from the time of prosthesis placement to the first annual checkup. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991 Fall;6(3):270-6. PMID: 1813395.

Jennes ME, Naumann M, Peroz S, Beuer F, Schmidt F. Antibacterial effects of modified implant abutment surfaces for the prevention of peri-implantitis-A systematic review. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Nov 5;10(11):1350. doi: 10.3390/antibiotics10111350. PMID: 34827288; PMCID: PMC8615005.

Jorge JR, Barao VA, Delben JA, Assuncao WG. The role of implant/abutment system on torque maintenance of retention screws and vertical misfit of implant-supported crowns before and after mechanical cycling. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Mar-Apr;28(2):415-22. doi: 10.11607/jomi.2727. PMID: 23527343.

Jones MI, McColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. Haemocompatibility of DLC and TiC-TiN interlayers on titanium. *Diamond Relat Mater*. 1999;8(2-5):457-62. doi:10.1016/s0925-9635(98) 00426-9.

Juknius T, Ružauskas M, Tamulevičius T, Šiugždinienė R, Juknienė I, Vasiliauskas A, et al. Antimicrobial properties of diamond-like carbon/silver nanocomposite thin films deposited on textiles: towards smart bandages. *Materials (Basel)*. 2016 May 13;9(5):371. doi: 10.3390/ma9050371. PMID: 28773494.

Juknius T, Juknienė I, Tamulevičius T, Ružauskas M, Pamparienė I, Oberauskas V, et al. Preclinical study of a multi-layered antimicrobial patch based on thin nanocomposite amorphous diamond like carbon films with embedded silver nanoparticles. *Materials (Basel)*. 2020 Jul 16;13(14):3180. doi: 10.3390/ma13143180. PMID: 32708717; PMCID: PMC7412193.

Kallus T, Bessing C. Loose gold screws frequently occur in full-arch fixed prostheses supported by osseointegrated implants after 5 years. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994 Mar-Apr;9(2):169-78. PMID: 8206552

Katsavochristou A, Koumoulis D. Incidence of abutment screw failure of single or splinted implant prostheses: A review and update on current clinical status. *J Oral RKimehabil*. 2019;46(8):776-86. doi:10.1111/joor.12817

Kim KS, Lim YJ. Axial displacements and removal torque changes of five different implant-abutment connections under static vertical loading. *Materials (Basel)*. 2020 Feb 4;13(3):699. doi: 10.3390/ma13030699. PMID: 32033105; PMCID: PMC7040660.

Kim SK, Lee JB, Koak JY, Heo SJ, Lee KR, Cho LR, et al. An abutment screw loosening study of a Diamond Like Carbon-coated CP titanium implant. *J Oral Rehabil*. 2005 May;32(5):346-50. doi: 10.1111/j.1365-2842.2004.01475.x. PMID: 15842243..

Kligman S, Ren Z, Chung CH, Perillo MA, Chang YC, Koo H, et al. The Impact of dental implant surface modifications on osseointegration and biofilm formation. *J Clin Med*. 2021 Apr 12;10(8):1641. doi: 10.3390/jcm10081641. PMID: 33921531; PMCID: PMC8070594.

Koka S, Razzoog ME, Bloem TJ, Syed S. Microbial colonization of dental implants in partially edentulous subjects. *J Prosthet Dent*. 1993 Aug;70(2):141-4. doi: 10.1016/0022-3913(93)90009-d. PMID: 8396644.

Kwok SCH, Zhang W, Wan GJ, McKenzie DR, Bilek MMM, Chu PK. Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver-doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diamond Relat Mater* 2007 April-July; 16(4-7):1353–60. doi.org/10.1016/j.diamond.2006.11.001.

Lang LA, May KB, Wang RF. The effect of the use of a counter-torque device on the abutment-implant complex. *J Prosthet Dent*. 1999;81(4):411-7. doi:10.1016/s0022-3913(99)80007-9.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res*. 2000 Dec;14:22-8. doi: 10.1177/08959374000140010301. PMID: 11842920.

Lepesqueur LS, de Figueiredo VM, Ferreira LL, Sobrinho AS, Massi M, Bottino MA, et al. Coating dental implant abutment screws with diamondlike carbon doped with diamond nanoparticles: the effect on maintaining torque after mechanical cycling. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015 Nov-Dec;30(6):1310-6. doi: 10.11607/jomi.3933. PMID: 26574857.

Lekholm Ulf, van Steenberghe D, Herrmann I, Bolender C, Folmer T, Gunne J, et al. Osseointegrated implants in the treatment of partially edentulous jaws: a prospective 5-year multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9(6): 627-35.

Linder S, Pinkowski W, Aepfelbacher M. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond-like carbon coated surface. *Biomaterials*. 2002;23(3):767-73. doi:10.1016/s0142-9612(01)00182-x.

Liu Y, Wang J. Influences of microgap and micromotion of implant-abutment interface on marginal bone loss around implant neck. *Arch Oral Biol*. 2017;83:153-60. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.07.022.

Liu X, Lin Y, Xiang J, Hao J, Wane X. Dual-doped (Si-Ag) graphite-like carbon coatings with ultra-low friction and high antibacterial activity prepared by magnetron sputtering deposition. *Diam Relat Mater*, 2018;86:47-53. doi.org/10.1016/j.diamond.2018.04.016.

Lopes ECDCEMD, Sperandio M, Napimoga MH. Association between implant - abutment microgap and implant circularity to bacterial leakage: an in vitro study using tapered connection implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33:505-11. doi.org/10.11607/jomi.5836.

Love CA, Cook RB, Harvey TJ, Dearnley PA, Wood RJK. Diamond like carbon coatings for potential application in biological implants - a review. *Tribol Inter*. 2013;63:141-50. 10.1016/j.triboint.2012.09.006.

Lutz R, Schmitt C, Buchbender M, Neukam FW. Diagnosis, avoidance and management of complications of implant-based treatments. *Eur J Oral Implantol*. 2018;11 Suppl 1: S21-S25. PMID: 30109296.

Maas M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids. *Materials (Basel)*. 2016 Jul 25;9(8):617. doi: 10.3390/ma9080617. PMID: 28773737; PMCID: PMC5509023.

Mandracci P, Mussano F, Ceruti P, Pirri CF, Carossa S. Reduction of bacterial adhesion on dental composite resins by silicon-oxygen thin film coatings. *Biomed Mater*. 2015;10(1):15-7. doi:10.1088/1748-6041/10/1/015017.

Manninen NK, Ribeiro F, Escudeiro A, Polcar T, Carvalho S, Cavaleiro A. Influence of Ag content on mechanical and tribological behavior of DLC coatings. *Surf Coat Technol*. Oct 2013;232:440-6. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2013.05.048.

Marciano FR, Bonetti LF, Santos LV, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Antibacterial activity of DLC and Ag-DLC films produced by PECVD technique. *Diam Relat Mater*. 2009;18(5-8):1010-4. doi.org/10.1016/j.diamond.2009.02.014.

Marciano FR, Bonetti LF, Mangolin JF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Investigation into the antibacterial property and bacterial adhesion of diamond-like carbon films. *Vacuum*. 2011;85(6):662-6. doi.org/10.1016/j.vacuum.2010.07.017.

Marciano FR, Bonetti LF, Da-Silva NS, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ. Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films. *Appl Surf Sci*. 2009;255(20), 8377-82. doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.05.091.

Mazare A, Anghel A, Surdu-Bob C, Totea G, Demetrescu I, Ionita D. Silver doped diamond-like carbon antibacterial and corrosion resistance coatings on titanium. *Thin Solid Films* 2018;657:16-23. doi: 10.1016/j.tsf.2018.04.036.

Medina O, Nocua J, Mendoza F, Gómez-Moreno R, Ávalos J, Rodríguez C, Morell G. Bactericide and bacterial anti-adhesive properties of the nanocrystalline diamond surface. *Diam Relat Mater*. 2012;22:77-81. doi.org/10.1016/j.diamond.2011.12.022.

Melo Filho AB, Tribst JPM, Ramos NC, Luz JN, Jardini MAN, Borges ALS, et al. Failure probability, stress distribution and fracture analysis of experimental screw for micro conical abutment. *Braz Dent J*. 2019;30(2):157-63. doi.org/10.1590/0103-6440201902401.

Meffert RM. Periodontitis vs. peri-implantitis: the same disease? The same treatment? *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;7(3):278-91. doi: 10.1177/10454411960070030501. PMID: 8909882.

Meškinis Š, Čiegis A, Vasiliauskas A, Tamulevičiene K, Šlapikas R, Juškenas G et al. Plasmonic properties of silver nanoparticles embedded in diamond like carbon films: influence of structure and composition. *Appl Surf Sci Appl.* 2014;317:1041-6, doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.09.032.

Naert I, Quirynen M, van Steenberghe D, Darius P. A study of 589 consecutive implants supporting complete fixed prostheses. Part II: Prosthetic aspects. *J Prosthet Dent.* 1992 Dec;68(6):949-56. doi: 10.1016/0022-3913(92)90557-q. PMID: 1494126.

Odatsu T, Kuroshima S, Sato M, Takase K, Valanezhad A, Naito M, et al. Antibacterial properties of nano-Ag coating on healing abutment: an in vitro and clinical study. *Antibiotics (Basel).* 2020 Jun 19;9(6):347. doi: 10.3390/antibiotics9060347. PMID: 32575552.

Oliveira AD. Deposição de filmes de DLC dopados com nanopartículas de prata por processo assistido a plasma para aplicações biomédicas [tese]. São José dos Campos (SP):Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA; 2018.

Pjetursson BE, Thoma D, Jung R, Zwahlen M, Zembic A. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Oct;23 Suppl 6:22-38. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02546.x. PMID: 23062125.

Prat JO, Bonet R, Rupérez E, Punset M, Ortiz MH, Marti JG, et al. Bactericidal silver doped DLC coatings obtained by pulsed filtered cathodic arc co-deposition. *Surf Coat Technol.* February 2021;411(11):126977 DOI: 10.1016/j.surfcoat.2021.126977.

Preethanath RS, AlNahas NW, Bin Huraib SM, Al-Balbeesi HO, Almalik NK, Dalati MHN, et al. Microbiome of dental implants and its clinical aspect. *Microb Pathog.* 2017 May;106:20-4. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.009. PMID: 28188903.

Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res.* 1993 Sep;72(9):1304-9. doi: 10.1177/00220345930720090801. PMID: 8395545.

Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec;5(4):239-44. PubMed PMID: 7640338.

Rangert B, Jemt T, Jörneus L. Forces and moments on Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1989 Fall;4(3):241-7. PMID: 2700747.

Rangert B. Mechanical and biomechanical guidelines for the use of Brånemark System--general principles. *Aust Prosthodont J*. 1993;7 Suppl:39-44. PMID: 8054225.

Reich S, Thomsen C. Raman spectroscopy of graphite. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2004 Nov 15;362(1824):2271-88. doi: 10.1098/rsta.2004.1454. PMID: 15482979.

Rezvani E, Rafferty A, McGuinness C, Kennedy J. Adverse effects of nanosilver on human health and the environment. *Acta Biomater*. 2019;94:145-9. doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.042.

Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Mater Sci Eng R*. 2002;37(4-6):129-281. doi 10.1016/s0927-796x (02)00005-0.

Roehling S, Astasov-Frauenhoffer M, Hauser-Gerspach I, Braissant O, Woelfler H, Waltimo T, et al. In Vitro biofilm formation on titanium and zirconia implant surfaces. *J Periodontol*. 2017;88(3):298-307. doi:10.1902/jop.2016.160245.

Roy RK, Lee KR. Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83(1):72-84. doi:10.1002/jbm.b.30768.

Sasada Y, Cochran DL. Implant-abutment connections: a review of biologic consequences and peri-implantitis implications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Nov/Dec; 32(6):1296-307. doi: 10.11607/jomi.5732. Review. PubMed PMID: 29140374.

Schwarz MS. Mechanical complications of dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11 Suppl 1:156-8. doi: 10.1034/j.1600-0501.2000.011s1156.x. PMID: 11168264.

Schwarz FP, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Stritzker B. Antibacterial properties of silver containing diamond like carbon coatings produced by ion induced polymer densification. *Surf.Coat.Technol*. 2011;205:4850–4. doi: 10.1016/j.surfcoat.2011.04.078.

Seloto CB, Strazzi Sahyon HB, Dos Santos PH, Delben JA, Assunção WG. Efficacy of sealing agents on preload maintenance of screw-retained implant-supported prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(1):123–6. doi:10.11607/jomi.5576.

Segu DZ, Wang L-L, Hwang P, Kang S-W. Experimental characterization of friction and wear behavior of textured titanium alloy (Ti-6Al-4V) for enhanced tribological performance. *Mater Res Express*. 2021;8(8):1-13. doi.org/10.1088/2053-1591/ac1ae6.

Sharifahmadian O, Mahboubi F, Oskouie A. Structural evolution and tribological behavior of nitrogen doped DLC coatings deposited by pulsed DC PACVD method. *Diam Relat Mater*. 2019;91:74-83.

Sheridan RA, Decker AM, Plonka AB, Wang HL. The role of occlusion in implant therapy: a comprehensive updated review. *Implant Dent.* 2016;25(6):829-38. doi:10.1097/ID.0000000000000488.

Siamos G, Winkler S, Boberick KG. Relationship between implant preload and screw loosening on implant-supported prostheses. *J Oral Implantol.* 2002;28(2):67-73. doi: 10.1563/1548-1336(2002)028<0067:TRBIPA>2.3.CO;2 PMID: 12498448.

Simon RL. Single implant-supported molar and premolar crowns: a ten-year retrospective clinical report. *J Prosthet Dent.* 2003;90(6):517-21. doi: 10.1016/j.prosdent.2003.08.025. PMID: 14668750.

Skalak R. Biomechanical considerations in osseointegrated prostheses. *J Prosthet Dent.* 1983 Jun;49(6):843-8. doi: 10.1016/0022-3913(83)90361-x. PMID: 6576140.

Shirakura A, Nakaya M, Koga Y, Kodama, H, Hasebe T, Suzuki T. Diamond-like carbon films for pet bottles and medical applications. *Thin Solid Films.* 2006;494(1-2): 84-91. doi.org/10.1016/j.tsf.2005.08.366.

Song F, Koo H, Ren D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *J Dent Res.* 2015 Aug;94(8):1027-34. doi:10.1177/0022034515587690. PMID: 26001706.

Sorensen JA, Avera SP, Tomas C. Comparison of interface fidelity of implant systems. *J Dent Res.* 1991;70(540):4.

Sonntag R, Reinders J, Kretzer JP. What's next? Alternative materials for articulation in total joint replacement. *Acta Biomater.* 2012 Jul;8(7):2434-41. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.029. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22446959.

Suárez-López Del Amo F, Lin GH, Monje A, Galindo-Moreno P, Wang HL. Influence of soft tissue thickness on peri-implant marginal bone loss: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2016;87(6):690-9. doi:10.1902/jop.2016.150571.

Teixeira W, Ribeiro RF, Sato S, Pedrazzi V. Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 Jan-Feb;26(1):56-62. PMID: 21365038.

Tey VHS, Phillips R, Tan K. Five-year retrospective study on success, survival and incidence of complications of single crowns supported by dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2017 May;28(5):620-5. doi: 10.1111/clr.12843. PMID: 27334865.

Tiainen VM. Amorphous carbon as a bio-mechanical coating - Mechanical properties and biological applications. *Diam Relat Mater* 2001;10(2):153–60. doi.org/10.1016/S0925-9635(00)00462-3.

Treutler C. Industrial use of plasma deposited coatings for components of automotive fuel injection systems. *Surf Coat Technol.* 2005;200:1969-75 doi.10.1016/j.surfcoat.2005.08.012.

Tuinstra F, Koenig J. Raman spectrum of graphite. *J Chem Phys* 1970;53(3):1126–30. doi: 10.1063/1.1674108.

Velioglu N, Akova T, Ozkomur A. Effects of hard thin-film coatings on adhesion of early colonizer bacteria over titanium surfaces. *Implant Dent*. 2016 Feb;25(1):114-21. doi: 10.1097/ID.0000000000000355. PMID: 26540365.

Vetter J. 60 years of DLC coatings: historical highlights and technical review of cathodic arc processes to synthesize various DLC types, and their evolution for industrial applications. *Surf Coat Technol* 2014 Oct; 257: 213-40. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.08.017.

Vilarrasa J, Delgado LM, Galofré M, Àlvarez G, Violant D, Manero JM, Blanc V, Gil FJ, Nart J. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm over antibacterial coated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Nov 3;29(11):164. doi: 10.1007/s10856-018-6168-8. PMID: 30392142.

Vinhas AS, Aroso C, Salazar F, López-Jarana P, Ríos-Santos JV, Herrero-Climent M. Review of the mechanical behavior of different implant-abutment connections. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Nov 23;17(22):8685. doi: 10.3390/ijerph17228685. PMID: 33238476; PMCID: PMC7700386.

Voronov RS, Papavassiliou DV, Lec LL. Review of fluid slip over superhydrophobic surfaces and dependence on contact angle. *Ind. Eng Chem Res* 2008; 47:2455-77.

Wennerberg A, Albrektsson T, Chrcanovic B. Long-term clinical outcome of implants with different surface modifications. *Eur J Oral Implantol*. 2018;11 Suppl 1:S123-36. PMID: 30109304.

Winkler S, Ring K, Ring JD, Boberick KG. Implant screw mechanics and the settling effect: overview. *J Oral Implantol*. 2003;29(5):242-5. doi: 10.1563/1548-1336(2003)029<0242: ISMATS>2.3.CO;2. PMID: 14620687.

Xu K, Guo Y, Li Z, Wang Z. Aging biomarkers and novel targets for anti-aging interventions. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1178:39-56. doi:10.1007/978-3-030-25650-0_3.

Yang K, Shi J, Wang L, Chen Y, Liang C, Yang L, Lu-Ning Wang. Bacterial anti-adhesion surface design: surface patterning, roughness and wettability: a review. *J Mater Sci Technol*. 2022;99:82-100. doi.org/10.1016/j.jmst.2021.05.028

Yang N, Yu S, Macpherson JV, Einaga Y, Zhao H, Zhao G, et al. Conductive diamond: synthesis, properties, and electrochemical applications. *Chem Soc Rev*. 2019 Jan 2;48(1):157-204. doi: 10.1039/c7cs00757d. PMID: 30444227.

Yang P, Kwok SCH, Chu PK, Leng YX, Chen JY, Wang J, et al. Haemocompatibility of hydrogenated amorphous carbon (a-C:H) films synthesized by plasma immersion ion implantation-deposition. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 2003; 206(6-7):721-5. doi 10.1016/S0168-583X (03)00871-1.

Yu X, Hua M, Wang C. Influence of ag content and nanograin size on microstructure, mechanical and sliding tribological behaviors of Ag-DLC films. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009 Nov;9(11):6366-71. doi: 10.1166/jnn.2009.1304. PMID: 19908535.

Zhang W, Wang S, Ge S, Chen J, Ji P. The relationship between substrate morphology and biological performances of nano-silver-loaded dopamine coatings on titanium surfaces. *R Soc Open Sci*. 2018 Apr 11; 5(4):172310. doi:10.1098/rsos.172310.

Zhang X, Zhang Q, Yan T, Jiang Z, Zhang X, Zuo YY. Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environ Sci Technol*. 2015 May 19;49(10):6164-71. doi: 10.1021/es5050425. PMID: 25898026.

Zhao Z, Yu X, Zhang Z, Shu W, Li J. Attempting Ag-doped diamond like carbon film to improve seal performance of hydraulic servo-actuator. *Materials (Basel)*. 2020 Jun 8;13(11):2618. doi: 10.3390/ma13112618. PMID: 32521747; PMCID: PMC7321579.