

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS DENTÁRIOS E PRÓTESE

MARCOS MIGUEL ITO

Desenvolvimento de superfícies antimicrobianas de titânio com características
cerâmicas

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁSSIO DO NASCIMENTO

RIBEIRÃO PRETO

2023

MARCOS MIGUEL ITO

Desenvolvimento de superfícies antimicrobianas de titânio com características
cerâmicas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Cirurgião-
Dentista.

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁSSIO DO NASCIMENTO

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Marco Antônio Ito, por todo o apoio, dedicação e incentivo que serviram de alicerce durante toda a graduação.

A minha mãe, Sandra Cristina Fumie Murata Ito (em memória), por ser o meu maior exemplo de força e inspiração na vida.

As minhas irmãs, Naiana Ito e Natali Elisabete Ito, por todo o amor, conselhos, ajudas e por serem minha inspirações profissionais.

A minha namorada, Lara Lise de Almeida, por todo o amor, carinho, compreensão e companheirismo.

A toda a minha família e da minha namorada que sempre demonstraram apoio e incentivo.

Aos meus amigos de graduação, Thiago Miura Inácio, Lívia Maiumi Uehara, Nicole Ranzani Bernal e Gilberto Ferro Junior por toda a ajuda e companhia, que foram essenciais nessa jornada.

Aos meus amigos de longa data, Alice Bartelotti, Alisson de Souza, Mariane Seze e Fernando Teixeira Maia (em memória) pelo apoio e incentivo.

A todos os professores e funcionários que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional.

Por fim, agradeço, imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Cássio do Nascimento, que durante toda a graduação me acompanhou prontamente, dando todo o auxílio necessário para a conclusão deste trabalho.

Nome: ITO, Marcos Miguel

Título: Desenvolvimento de superfícies antimicrobianas de titânio com características cerâmicas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião Dentista

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

RESUMO

MARCOS MIGUEL ITO, Desenvolvimento de superfícies antimicrobianas de titânio com características cerâmicas. 2023. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Os materiais implantáveis à base de titânio (Ti) ou suas ligas têm sido amplamente utilizados em tratamentos reabilitadores médicos e odontológicos, devido às suas características mecânicas favoráveis e biocompatibilidade. Por outro lado, quando comparadas às cerâmicas, as superfícies de Ti apresentam maior suscetibilidade à adesão bacteriana e à colonização por espécies periodontopatogênicas sendo as infecções peri-implantares uma das principais causas de falhas no tratamento com implantes. Com isso, o desenvolvimento de materiais implantáveis com boas propriedades mecânicas que sejam eficazes em minimizar a colonização bacteriana ainda constitui um desafio. A oxidação por plasma eletrolítico (PEO) é um tratamento simples, capaz de criar revestimentos porosos de alta durabilidade e estabilidade sobre o Ti. A modificação da técnica de PEO pela incorporação de componentes com efeito antimicrobiano ao revestimento em combinação com o desenvolvimento de superfícies de zircônia pode contribuir para minimizar a adesão de micro-organismos sobre o Ti. O objetivo desse estudo foi desenvolver uma nova superfície de Ti, revestida por zircônia, utilizando a técnica de PEO e anodização com Zircônia, e avaliá-la quanto à formação e composição de biofilme oral, *in situ*, e o efeito sobre a caracterização das superfícies, em comparação a superfícies de titânio usinadas e superfícies comerciais tratadas por duplo ataque ácido. Dois desfechos foram estipulados para este estudo: (1) caracterização das superfícies, por meio da análise da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio X (XPS); espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) com microscopia eletrônica de varredura (MEV); análise da rugosidade de superfície e de área utilizando a Microscopia Confocal a Laser; ensaio de molhabilidade e cálculo de energia livre de superfície; e (2) avaliação microbiológica, por meio da análise do biofilme por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a realização deste estudo, foram recrutados 12 indivíduos saudáveis, sem lesões de cárie ativas ou doença periodontal, que utilizaram dispositivos intra-orais maxilares,

confeccionados de placas de acetato de 0,3mm de espessura (Bio-Art), contendo quatro espécimes de Ti, de 10mm de diâmetro por 3,5mm de espessura, um de cada grupo de estudo (C1, C2, T1 e T2) fixados na região de pré-molares e molares com resina acrílica autopolimerizável incolor. Foram utilizados discos de Ti comercialmente grau puro 4 (Intraoss), divididos em 4 grupos. Sendo que os grupos controles, C1, discos usinados, e C2, discos tratados por duplo ataque ácido, não sofreram nenhum tipo de intervenção, previamente à sua utilização. Já os grupos experimentais, T1, tratados por PEO, T2, tratado por PEO seguido de anodização para o recobrimento por Zr.

A partir das análises foi possível concluir que a caracterização superficial do titânio com adição de zircônio resultou em uma estrutura estável. Com isso, as superfícies experimentais menor energia de superfície, ganho da hidrofobicidade , maior rugosidade superficial, além de menor formação de biofilme.

Palavras-chave: PEO. Tratamento de superfície. Titânio. Zircônia.

ABSTRACT

MARCOS MIGUEL ITO, Development of antimicrobial titanium surfaces with ceramic characteristics. 2023. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Implantable materials based on titanium (Ti) or its alloys have been widely used in medical and dental rehabilitation treatments, due to their favorable mechanical characteristics and biocompatibility. On the other hand, when compared to ceramics, Ti surfaces are more susceptible to bacterial adhesion and colonization by periodontopathogenic species, with peri-implant infections being one of the main causes of failures in treatment with implants. Therefore, the development of implantable materials with good mechanical properties that are effective in minimizing bacterial colonization is still a challenge. Electrolytic plasma oxidation (PEO) is a simple treatment capable of creating highly durable and stable porous coatings on Ti. The modification of the PEO technique by incorporating components with antimicrobial effect to the coating in combination with the development of zirconia surfaces can contribute to minimize the adhesion of microorganisms on the Ti. The objective of this study was to develop a new Ti surface, coated with zirconia, using the technique of PEO and Zirconia anodization, and to evaluate it regarding the formation and composition of oral biofilm, *in situ*, and the effect on the characterization of the surfaces. , compared to machined titanium surfaces and commercial surfaces treated by double acid etching. Two outcomes were stipulated for this study: (1) surface characterization, through X-ray excited photoelectron spectroscopy (XPS) analysis; energy dispersion X-ray spectroscopy (EDX) with scanning electron microscopy (SEM); analysis of surface and area roughness using Confocal Laser Microscopy; wettability test and surface free energy calculation; and (2) microbiological evaluation, through analysis of the biofilm using scanning electron microscopy (SEM). To carry out this study, 12 healthy individuals were recruited, without active caries lesions or periodontal disease, who used maxillary intraoral devices, made of 0.3 mm thick acetate plates (Bio-Art), containing four specimens of Ti, 10 mm in diameter and 3.5 mm thick, one from each study group (C1, C2, T1 and T2) fixed in the region of premolars and molars with colorless self-curing acrylic resin. Commercially pure grade

4 Ti disks (Intraoss) were used, divided into 4 groups. Since the control groups, C1, machined discs, and C2, discs treated by double acid attack, did not undergo any type of intervention prior to their use. As for the experimental groups, T1, treated with PEO, T2, treated with PEO followed by anodization for Zr coating.

From the analyzes it was possible to conclude that the surface characterization of titanium with the addition of zirconium resulted in a stable structure. As a result, the experimental surfaces have less surface energy, gain in hydrophobicity, greater surface roughness, in addition to less biofilm formation.

Keywords: PEO. Surface treatment. Titanium. Zircônia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Delineamento do estudo	16
3.2. Cálculo amostral	16
3.3. Seleção dos participantes	17
3.4. Desenho experimental	17
3.5. Preparo dos espécimes	18
3.6. Plasma eletrolítico oxidativo	18
3.7. Anodização para o recobrimento das amostras por Zr	19
3.8. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS)	20
3.9. Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX)	20
3.10. Análise da rugosidade de superfície e de área	21
3.11. Caracterização da energia de superfície dos discos – Ensaio de Molhabilidade e Energia livre de superfície	21
3.12. Análise microbiológica	22
3.12.1 Confecção dos dispositivos intra-orais	22
3.12.2 Análise do biofilme celular por meio do MEV	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Análise da rugosidade linear superficial e da rugosidade de área	25
4.2. Avaliação da molhabilidade e da energia de superfície dos espécimes	25
4.3. Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raio X por dispersão de energia (EDX)	26
4.4. Análise da composição química elementar da superfície dos espécimes por Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio-X (XPS)	28

4.5. Avaliação do biofilme microbiano pela microscopia eletrônica de varredura (MEV)	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) e suas ligas têm sido largamente utilizados para a confecção de materiais implantáveis, tanto na área médica (tais como próteses, cateteres e stents) quanto odontológica (implantes dentários e próteses bucomaxilofaciais)¹⁻³. Dentre as características que justificam o seu uso na área da saúde podemos citar a biocompatibilidade, leveza, inércia química, resistência à corrosão e boa resistência mecânica quando comparado a outros metais¹⁻³. No caso dos implantes osteointegráveis, como os utilizados em odontologia, o sucesso do tratamento depende da formação de tecido ósseo diretamente em contato com o implante, sem desenvolvimento de tecido fibroso na interface, e da ausência de infecção^{1,4}. Ambos os processos são influenciados por características físicas, químicas e morfológicas das superfícies dos implantes^{2,5,6}.

Grande parte das falhas no uso de implantes osteointegráveis se deve à ocorrência de infecções que levam à necessidade de sua remoção^{2,4}. Na cavidade oral, a infecção ao redor do implante é denominada perimplantite, condição em que ocorre uma disbiose com consequente proliferação de espécies bacterianas patogênicas e inflamação dos tecidos perimplantares, com reabsorção óssea progressiva de difícil interrupção e tratamento⁴. Nesse contexto, alterações na superfície do titânio que o tornem menos suscetível à adesão e colonização bacteriana podem prevenir a perimplantite e, consequentemente, a perda de implantes que gera prejuízos financeiros, estéticos e funcionais consideráveis aos pacientes^{1,2,5}.

Diversos procedimentos para a modificação da superfície de titânio têm sido descritos na literatura, tais como jateamento com óxido de alumínio, condicionamento ácido, uso de plasma spray, soluções alcalinas, anodização, laser, recobrimento por hidroxiapatita e oxidação por plasma eletrolítico (PEO)^{2,7}. De modo geral, as diferentes técnicas aumentam a rugosidade de superfície do titânio com o objetivo de promover maior área de contato entre tecidos e implante, melhor ancoragem ao osso adjacente e rapidez no processo de osseointegração^{7,8}. Dentre elas, a PEO, também conhecida como oxidação por micro-arco (MAO), é considerada um método relativamente simples, versátil, de baixo custo e eficiente na formação de revestimentos cerâmicos porosos sobre substratos metálicos^{9,10}. A técnica se baseia na aplicação de diferenças de potencial elétrico entre dois eletrodos (um cátodo e um ânodo) imersos em solução

eletrolítica, gerando micro descargas de plasma na superfície do metal^{9,10}. É possível alterar a composição e as propriedades da camada cerâmica formada, tais como espessura, rugosidade e tamanho dos micro poros, a partir do ajuste dos parâmetros utilizados no processo (voltagem, corrente, tempo de aplicação, ciclo de trabalho, temperatura e composição do eletrólito)¹¹⁻¹³.

Apesar do titânio ainda ser o material mais utilizado para a confecção de implantes, tem sido demonstrado que as superfícies cerâmicas geram uma resposta mais favorável dos tecidos perimplantares e apresentam menor susceptibilidade à colonização microbiana ¹⁴. Ensaios clínicos reportaram menor concentração de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à reabsorção óssea (IL-1 β e IL-6) e maiores níveis de leptina, uma proteína associada à saúde periodontal, no fluido crevicular gengival de sítios com conectores cerâmicos em comparação aos de titânio^{15,16}. Estudos longitudinais do nosso grupo de pesquisa corroboram estes resultados¹⁷⁻¹⁹. Comparando o biofilme formado sobre conectores de titânio ou zircônia, após 6 meses ou 3 anos de função dos implantes, observamos que os de titânio apresentaram maior número de bactérias colonizando as superfícies e maior prevalência de espécies periodontopatogênicas. Além disso, o sequenciamento do gene 16S bacteriano mostrou que o titânio apresentou maior grau de colonização por espécies ainda não classificadas. Sugere-se que tais espécies podem estar relacionadas a um maior potencial inflamatório, já que os implantes restaurados com conectores de titânio apresentaram maiores índices de reabsorção óssea ao final dos períodos de investigação¹⁷⁻¹⁹. Outros autores também demonstraram, por meio de um estudo *in vitro*, que a modificação da superfície do titânio pelo jateamento com zircônia levou a uma redução significante da adesão bacteriana, similar à obtida com a zircônia pura, quando em comparação ao titânio sem tratamento cerâmico²⁰. O revestimento da superfície do titânio com uma camada cerâmica, portanto, representa uma possível estratégia para minimizar a colonização bacteriana e, consequentemente, a incidência e progressão de infecções perimplantares.

Pela técnica da PEO, é possível obter efetivamente o recobrimento cerâmico de superfícies metálicas de geometria complexa, como a dos implantes, e os revestimentos formados apresentam alta durabilidade, boa adesão ao metal, estabilidade química, resistência à corrosão e ao desgaste^{21,22}. Os estudos reportados na literatura envolvendo a metodologia da PEO, em sua grande maioria, foram

desenvolvidos objetivando-se uma melhora no processo de osseointegração dos implantes. Nos resultados descritos, existe um consenso de que criação de micro poros pela PEO gera uma superfície que facilita a adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas, mais favorável à osseointegração quando comparado às superfícies não tratadas^{10,11,13,20}. De fato, foi demonstrado *in vivo* que a velocidade de formação óssea ao redor do implante e o contato osso-implante aumentaram significantemente com o uso da técnica^{23–25}.

Quando utilizada para recobrir superfícies de titânio, a técnica convencional de PEO forma uma camada cerâmica composta por dióxido de titânio^{26,27}. Para agregar características antimicrobianas ao tratamento, alguns estudos têm sugerido a incorporação de elementos metálicos à camada, a qual é realizada pela adição dos íons desejados na solução eletrolítica^{28–30}. Nesse contexto, outros tipos de cerâmica como a zircônia, podem constituir o revestimento se houver a presença de íons zircônio no eletrólito utilizado no processo³¹.

Apesar da alta taxa de sobrevivência do uso de titânio para implantes osteointegráveis, o sucesso e a longevidade do tratamento podem ser afetados pela ocorrência de infecções perimplantares, caso haja um desequilíbrio da microbiota oral^{1,2,4}. O desenvolvimento de uma nova superfície de titânio com as características cerâmicas produzidas pela incorporação dos íons zircônio com a PEO, pode reduzir de forma significante a adesão e proliferação de micro-organismos, incluindo os potencialmente patogênicos. O efeito regulador do titânio revestido por zircônia sobre a composição da microbiota do biofilme oral ainda não foi investigado na literatura. Dessa forma, este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novas superfícies de implantes, mais resistentes à contaminação microbiana e capazes de reduzir a incidência de infecções perimplantares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo foi desenvolver uma nova superfície de titânio com propriedades antimicrobianas pela presença de zircônia por meio da técnica de oxidação por plasma eletrolítico (PEO), e avaliar o seu efeito na formação do biofilme oral e modificações superfícies, em comparação às superfícies de titânio comerciais tratadas por duplo ataque ácido ou usinadas.

2.2. Objetivos Específicos

Desfecho de Caracterização das superfícies:

- Avaliar, por meio de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), a composição química elementar (concentração atômica) e perfil da concentração nas primeiras camadas (1- 5 nm) das superfícies testadas;
- Análise qualitativa da morfologia das superfícies e avaliar o perfil de profundidade do filme, determinando se a composição dos elementos químicos pode mudar em função da profundidade, utilizando-se a microscopia de varredura (MEV) com espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX);
- Avaliar, por meio de microscopia confocal a laser, a topografia das superfícies, determinando a rugosidade superficial e de área;
- Comparar, por meio de medidas de ângulo de contato (Θ), a hidrofilicidade (molhabilidade) e energia superficial do substrato antes e a após a deposição da zircônia;

Desfecho de Avaliação microbiológica:

- Avaliar, por meio da microscopia de varredura (MEV) o biofilme formado nas superfícies testadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

O estudo realizado foi randomizado e controlado, do tipo boca dividida (split-mouth), com o objetivo de desenvolver uma nova superfície de titânio com propriedades antimicrobianas pela presença de zircônia por meio da técnica de oxidação por plasma eletrolítico (PEO), e avaliar o seu efeito na formação do biofilme oral e a caracterização das superfícies, em comparação às superfícies de titânio comerciais tratadas por duplo ataque ácido ou usinadas. (Tabela 1).

Tabela 1- Divisão dos grupos segundo tratamento de superfície.

Grupo controle (C1)	Discos de Ti usinados sem tratamento de superfície
Grupo controle comercial (C2)	Discos de Ti comercialmente tratados por duplo ataque ácido
Grupo tratamento 1 (T1)	Discos de Ti tratados por PEO para a formação de microporos
Grupo tratamento 2 (T2)	Discos de Ti tratados por PEO seguido de anodização para o recobrimento por zircônia

Fonte: Própria.

3.2. Cálculo Amostral

O tamanho do N amostral foi calculado com o auxílio do software G*Power versão 3.1.9.4 (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Alemanha). O disco de titânio foi considerado como unidade amostral e foi selecionado o parâmetro contagem de células bacterianas como variável primária para a determinação do N. O cálculo foi realizado utilizando-se como referência os dados de um estudo prévio do grupo de pesquisa e de um estudo piloto. Para a comparação de grupos independentes (experimentais e controle), um efeito de magnitude 1,58 foi calculado a partir dos valores (média \pm desvio padrão) da contagem microbiana para os grupos controle ($2,21 \pm 1,06$) e tratamento ($0,74 \pm 0,77$), considerando-se margens de erro alfa e beta de 5% e 20%, respectivamente. O método ARE (Asymptotic Relative Efficiency) foi utilizado como parâmetro para a distribuição dos dados sob a hipótese alternativa, resultando em um N amostral final de 9 discos por grupo.

3.3 Seleção dos participantes

Foram selecionados voluntários dentre os funcionários, docentes e discentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Os critérios de exclusão para a seleção do participante foram: gravidez, lactação, tabagismo, tratamento periodontal ou antibiótico nos últimos 3 meses e presença de qualquer doença sistêmica ou medicações que possam influenciar na condição de saúde periodontal. Aos participantes foi facultado o direito de decidir sobre sua participação ou não na fase experimental desse estudo e, durante o primeiro contato com os pesquisadores, orientações serão dadas quanto aos procedimentos da pesquisa. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

3.4. Desenho Experimental

Foram utilizados 72 discos de titânio comercialmente puro grau 4 (Intraoss, Itaquaquecetuba, SP, Brasil), de 10 mm de diâmetro por 3,5 mm de espessura, divididos em 4 grupos:

- 1) Grupo controle (C1): discos usinados sem tratamento de superfície (n=18)
- 2) Grupo controle comercial (C2): discos comercialmente tratados por duplo ataque ácido (n=18)
- 3) Grupo tratamento 1 (T1): discos tratados por PEO sem a incorporação de íons zircônio (n=18)
- 4) Grupo tratamento 2 (T2): discos tratados por PEO com a incorporação de íons zircônio (n=18)

O número de discos utilizados em cada grupo, para cada um dos testes propostos neste estudo, está detalhado na tabela 2, abaixo:

Tabela 2 – Números de discos usados em cada análise.

Grupos	MEV+biofilme	XPS	EDX	Rugosidade (Confocal Laser) + Molhabilidade (Tensão Superficial)	TOTAL (n)
Controle (C1)	3	3	3	9	18
Controle (C2)	3	3	3	9	18

Tratamento	3	3	3	9	18
(T1)					
Tratamento	3	3	3	9	18
(T2)					

Fonte: Própria

3.5. Preparo dos espécimes

Os discos usinados sem tratamento de superfície (grupo C1) e os discos tratados por duplo ataque ácido (grupo C2) não sofrerão, previamente à sua utilização, qualquer tipo de intervenção neste estudo. Os discos comerciais C2 (duplo ataque ácido) foram fornecidos conforme são disponibilizados e comercializados pela empresa doadora do material (Intraoss). E os discos sem tratamento de superfície (usinados), têm o mesmo processo de fabricação pela empresa, com exceção da etapa de aplicação do duplo ataque ácido. Com isso, todos os discos vieram com uma padronização de produção da fábrica.

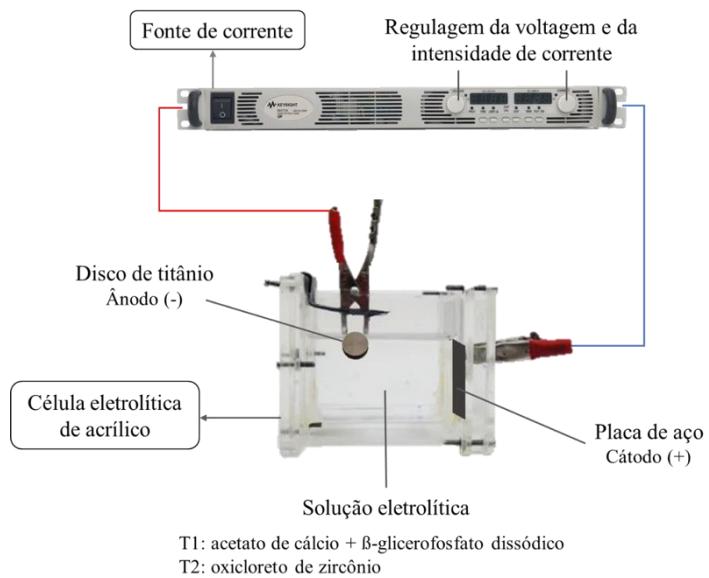
Já os discos experimentais, T1 e T2, antes da realização da PEO foram polidos com lixa d'água de carbeto de silício #600 e submetidos durante 20 segundos ao ataque químico com solução de Kroll (HF/HNO₃/H₂O, 1:3:5), de acordo com a recomendação nº 187 da norma ASTM-E407-99, para remoção do filme passivo original. Posteriormente, as amostras foram limpas ultrassonicamente (CD 4820, Kondortech Equipamentos Odontológicos, São Carlos, SP, Brasil) com acetona (10 min) e água destilada (5 min).

3.6. Plasma eletrolítico oxidativo (PEO)

O tratamento eletroquímico dos espécimes foi realizado em uma fonte de corrente (N5771A, Agilent Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) utilizando células eletroquímicas de acrílico (**figura 1**). A amostra a ser tratada foi conectada a um multímetro digital e à fonte corrente. O disco de titânio atou como ânodo do sistema, sendo imerso na solução eletrolítica a uma distância fixa de aproximadamente 8 cm de uma placa de aço inoxidável, a qual atou como cátodo. Para a formação dos microporos dos grupos T1 e T2, os discos foram submetidos durante 1 minutos ao tratamento com solução eletrolítica composta por acetato de cálcio (62g/L) e β -glicerofosfato dissódico (6,2g/L), com voltagem de 300 V e intensidade de corrente de

2 A. As soluções foram preparadas 24 horas antes do processo de PEO, sendo mantidas durante esse período em agitador magnético (ARE, Velp Scientifica, Usmate, Itália) sem aquecimento. Para cada amostra foram utilizados 140 mL da solução eletrolítica preparada

Figura 1- Ilustração esquemática do posicionamento dos discos de titânio em célula eletrolítica de acrílico conectada à fonte de corrente para a realização das técnicas de plasma eletrolítico oxidativo (PEO) e de anodização. T1: tratamento por PEO; T2: tratamento por anodização para o recobrimento por zircônia.



3.7. Anodização para o recobrimento das amostras por Zr

Para o processo de anodização das amostras por Zr, os discos tratados por PEO, grupo T2, foram submetidos ao tratamento por anodização para o recobrimento dos microporos formados por uma camada de Zr. O processo de anodização foi realizado de forma semelhante ao tratamento por PEO, em células eletroquímicas de acrílico. As amostras foram imersas em 140 mL de solução eletrolítica composta por oxicloreto de zircônio (6 g/L) e tratadas por 10 minutos em voltagem constante de 25 V intensidade de corrente de 0,062 A (densidade de 22,6 mA/cm²), sob agitação magnética constante. As soluções da anodização foram preparadas 24 horas antes da realização dos tratamentos, sendo mantidas durante este período sob agitação magnética sem aquecimento. Os espécimes tratados (grupos T1 e T2) foram limpos ultrassonicamente com álcool isopropílico (10 min), secos em estufa a 40°C por 1 hora

e armazenados em dessecador à vácuo contendo sílica gel até o momento de sua utilização.

3.8. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)

A espectroscopia XPS foi realizada para caracterizar a composição química elementar (concentração atômicas dos compostos) e o perfil das concentrações nas primeiras monocamadas (1-5 nm) das superfícies dos discos de titânio (n=3, por grupo). As análises foram realizadas no equipamento UNI-SPECS UHV Surface Analysis System equipado com XPS da FOAr/UNESP. A avaliação foi realizada com uso de ultra-alto vácuo com pressão na faixa de 5×10^{-7} a 1×10^{-6} Pa, e a limpeza da superfície de cada disco será feita por bombardeamento de argônio. Foi utilizada a radiação Ka do magnésio, com energia $h\nu = 1253,6$ eV. A potência do feixe de raios X foi de 180 W com emissão de 15 mA e voltagem de 12 KV. Os espectros exploratórios foram obtidos com energia de passagem do analisador de 80 eV, enquanto que os espectros de alta resolução, com energia de passagem do analisador de 20 eV. O ajuste dos picos foram feitos pelo método de mínimos quadrados usando o software disponível no equipamento. Como referência de energia de ligação foi usado o valor 284,8 eV para o pico C 1s de hidrocarboneto (C-C ou C-H).

3.9. Espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada com o microscópio EVO 50 (Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) em aumentos de 10.000x e 30.000x para caracterizar a morfologia das superfícies dos discos (n= 3, por grupo). As análises de caracterização superficial foram realizadas em 3 regiões aleatórias dos discos de cada grupo. Para a realização desta análise, os discos foram montados em suporte metálico e recobertos por uma película de ouro utilizando a metalizadora a uma pressão de 1×10^{-5} Torr e voltagem de 20 kV. Posteriormente a esta análise, os discos foram seccionados transversalmente na região central (em máquina metalográfica de corte acoplada com disco diamantado de 0,6 mm sob refrigeração constante em 600 RPM) para a determinação da análise de composição por EDX. Posteriormente, os discos foram prensados em resina epóxi e polidos com lixas de grãos #320, #600, #1200 e, em seguida, com alumina de granulometria média de 1 μm , 0,5 μm e 0,03 μm , nesta ordem. A análise da espectroscopia EDX foi utilizada com o auxílio de espectrômetro

de raios-X por energia dispersiva Systems 500 Digital Processing (Departamento de Química da FFCLRP/USP).

3.10. Análise da rugosidade de superfície e de área

A rugosidade de superfície (Ra) e a rugosidade de área (Sa) dos discos (n=9 por grupo) foram medidas com auxílio de microscópio confocal a laser (LEXT OLS4000, Olympus, Tóquio, Japão) do Departamento de Odontologia Restauradora da FORP/USP. As análises foram realizadas em três regiões diferentes de cada amostra empregando-se lente objetiva de 5x, sendo os valores de Ra e Sa as médias das três avaliações para cada espécime. Para a análise de Ra, foram feitas tomando radialmente, em intervalos de 120º entre si, em um comprimento de avaliação de 2570 µm e cut-off de 80 µm, e para a análise de Sa, foram feitas por meio de três avaliações radiais lineares de área no centro das regiões utilizadas previamente para as medidas de Ra. As imagens da superfície dos discos (2.57 x 2.59 mm) foram obtidas e utilizadas para o cálculo dos valores de Sa por meio do software OLS4000 versão 2.0 (LEXT OLS400, Olympus, Tóquio, Japão) com cut-off de 250 µm.

3.11. Caracterização da energia de superfície dos discos - Ensaio de Molhabilidade e Energia livre de superfície

A hidrofilia-hidrofobicidade da superfície dos discos tratados e controles (n=9 por grupo) foram avaliadas por ensaios de molhabilidade e de energia de superfície com auxílio de goniômetro/tensiômetro (OCA 20-DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha) no Laboratório de Físico-Química de Superfícies da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FCLRP/USP). A análise de molhabilidade das superfícies, foram realizadas em três regiões aleatórias de cada espécime em ar à temperatura ambiente pelo método da gota séssil. Com isso, gotas de 10 µL foram pipetadas sobre as superfícies investigadas com auxílio de pipeta de precisão. Três líquidos-teste de diferentes polaridades foram utilizados: água destilada, formamida e diiodometano. A determinação do ângulo de contato (θ) aparentes entre o líquido e a superfície foram calculados pelo software de utilização do equipamento e registrados em imagens captadas por uma câmera digital CCD. Já a energia de superfície dos espécimes foi calculada por meio da equação de Owens, Wendt e Kraeble de acordo com Nascimento et al.³⁹

$$\gamma_L(1+\cos\theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_L^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_L^p)^{1/2}$$

Para cada líquido-teste utilizado, os valores de γ_L (energia livre de superfície) e de suas componentes dispersivas (γ_L^d) e polares (γ_L^p) são conhecidos (**Tabela 3**). Dessa forma, as componentes polar (γ_s^p) e dispersiva (γ_s^d) da energia de superfície das amostras podem ser calculadas por meio da equação de Owens-Wendt a partir dos valores de ângulo de contato (θ) obtidos entre os líquidos-teste e a superfície. A energia livre de superfície da amostra (γ_s) é dada pela soma de suas componentes polar (γ_s^p) e dispersiva (γ_s^d).

Tabela 3 - Valores de energia livre de superfície e suas componentes dispersiva e polar para os líquidos-teste utilizados e sua aplicação na Equação de Owens-Wendt para o cálculo da energia livre de superfície das amostras.

Líquido	Total	Componente dispersiva (γ_L^d)	Componente polar (γ_L^p)
Água destilada	72,30	18,70	53,60
Formamida	59,00	39,40	19,60
Diiodometano	50,80	49,50	1,30

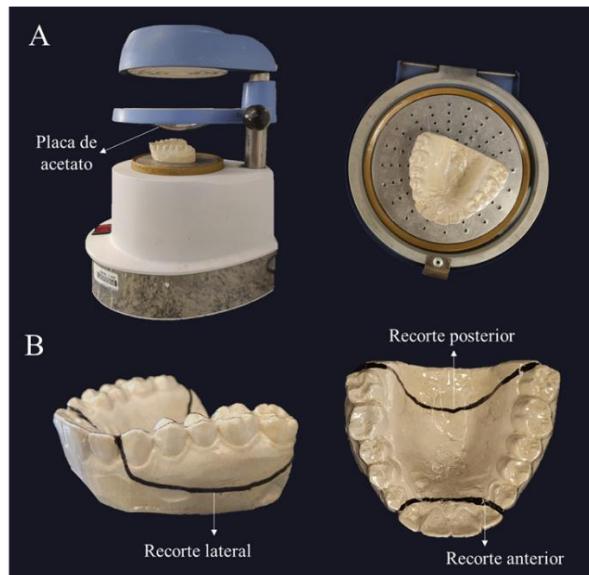
Fonte: Própria.

3.12. Análise Microbiológica

3.12.1. Confecção dos dispositivos intra-oraais

Para a confecção dos dispositivos intra-oraais, foi realizada a moldagem da arcada superior dos voluntários com alginato (Hydrogum 5, Zhermack Spa, Badia Polsine, Rovigo, Itália) e a obtenção dos modelos de gesso a partir do vazamento com gesso tipo III (Durone, Dentsply Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Para os dispositivos intra-oraais foram utilizadas placas de acetato de 0,3 mm de espessura (Bio-Art, São Carlos, São Paulo, Brasil) aquecidas e prensadas contra os modelos de gesso utilizando máquina plastificadora à vácuo (Plastvac P7, Bio-Art). Após o processo de prensagem, foram realizados recortes na região à frente do limite da linha vibratória. Já na região anterior que recobria os incisivos centrais e laterais também foi removida, sendo a retenção do aparelho garantida pela adaptação aos demais dentes e ao palato. A espessura mínima do aparelho e o seu recorte de modo a limitar a área de recobrimento ao mínimo possível tiveram como objetivo evitar desconforto e prejuízo estético aos participantes (**Figura 2**).

Figura 2 - Etapas envolvidas na confecção dos dispositivos intra-orais de acetato. A) Aquecimento e prensagem da placa de acetato contra o modelo de gesso (esquerda). Aspecto da placa de acetato adaptada ao modelo de gesso imediatamente após prensagem (direita); B) Marcações realizadas para orientar os recortes laterais, posterior e anterior do dispositivo de acetato.

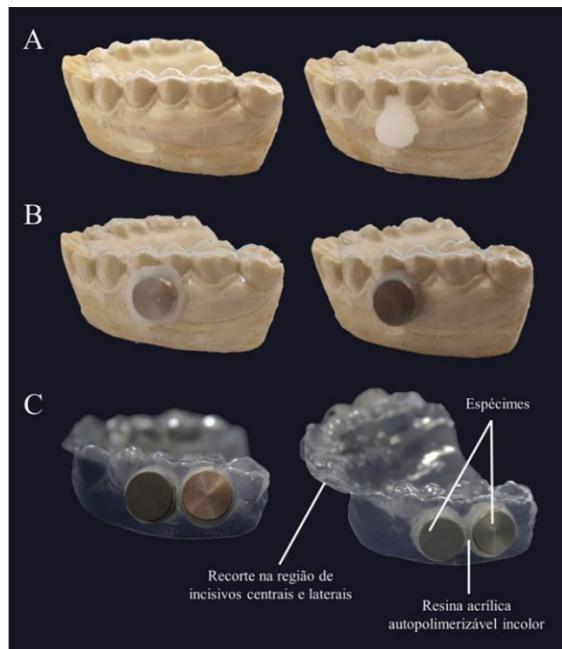


Fonte: Própria

Em seguida, quatro espécimes (um de cada grupo de estudo) foram fixados ao dispositivo de acetato na região de pré-molares e molares com resina acrílica autopolimerizável incolor (Jet Clássico Dencor, Artigos Odontológicos Clássico LTDE, São Paulo, SP, Brasil), manipulada de acordo com as instruções do fabricante e depositada sobre o aparelho em sua fase plástica. Antes da presa final do material, a resina acrílica foi adaptada ao redor dos discos e os excessos foram removidos com o auxílio de espátula para resina (**Figura 3**).

Os voluntários foram instruídos a utilizar o dispositivo por 48 horas seguidas, removendo-o apenas para a alimentação e higienização bucal, e a evitar o consumo de bebidas alcóolicas e a utilização de substâncias antimicrobianas durante o período de contaminação. Durante a alimentação, os aparelhos foram removidos e imersos em 250 mL de solução de NaCl 0,9% para evitar a desidratação e perda de viabilidade das células microbianas. Após a alimentação e escovação bucal, os voluntários foram orientados a recolocar os aparelhos sem realizar qualquer tipo de escovação da sua superfície para evitar a remoção do biofilme formado sobre os discos.

Figura 3- Etapas envolvidas na fixação dos espécimes aos dispositivos de acetato. A) Vista lateral da adaptação do dispositivo intra-oral ao modelo de gesso (esquerda) e da colocação de resina acrílica autopolimerizável incolor em fase plástica na região de fixação dos espécimes (direita); B) Fixação do disco à região de pré-molares (esquerda), adaptação da resina acrílica ao redor do disco e remoção de excessos (direita). Os mesmos procedimentos foram realizados para fixar os demais discos às regiões de pré-molares (contralateral) e de molares do aparelho; C) Dispositivo intra-oral finalizado.



Fonte: Própria

3.12.2. Análise do biofilme celular por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação do biofilme formado sobre os discos (N=3, por grupo) foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss Evo ma10) no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em aumentos de 5.000x e 10.000x. Previamente as análises, as superfícies dos discos de Ti receberam o recobrimento metálico de ouro (Cressington 108) para a obtenção de imagens em alta resolução da morfologia das superfícies controles e experimentais.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da rugosidade linear superficial (Ra) e da rugosidade de área (Sa).

A partir das análises realizadas com auxílio do microscópio confocal a laser (LEXT OLS4000, Olympus, Tóquio, Japão), os grupos tratados (C2, T1 e T2) foram classificados como sendo moderadamente rugosos, pois apresentavam, Sa entre 1,0-2,0 μm , sendo que o grupo C2 apresentou rugosidade significativamente maior que os grupos T1 e T2 ($P<0,05$). Enquanto o grupo controle C1, apresentou-se minimamente rugoso, pois apresentou valores significativamente menores que os demais grupos ($P<0,05$). Além disso, não houve diferenças significantes em termos de rugosidade linear superficial ou de área entre os grupos experimentais (**tabela 4**).

Tabela 4- Rugosidade linear superficial (R_a), rugosidade de área (S_a)

Grupos	Ra (μm)	Sa (μm)
C1	$0,84 \pm 0,18^{\text{A}}$	$1,27 \pm 0,16^{\text{A}}$
C2	$1,92 \pm 0,25^{\text{B}}$	$2,38 \pm 0,12^{\text{B}}$
T1	$1,27 \pm 0,12^{\text{C}}$	$1,65 \pm 0,10^{\text{C}}$
T2	$1,48 \pm 0,15^{\text{C}}$	$1,76 \pm 0,17^{\text{C}}$

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada parâmetro analisado ($P<0,05$; Tukey's test). CA: ângulo de contato entre a superfície testada e gota de água destilada. C1: controle usinado; C2: controle comercial; T1: tratamento por plasma eletrolítico oxidativo (PEO); T2: tratamento por PEO seguido de anodização para a deposição de zircônia.

4.2 Avaliação da molhabilidade e da energia de superfície dos espécimes.

As análise da molhabilidade e da energia de superfície dos discos controles e tratados ($N=9$) feitas com o auxílio do goniômetro/tensiômetro (OCA 20-DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha) utilizando três regiões aleatórias de cada espécime, em ar à temperatura ambiente pelo método da gota séssil, com $10\mu\text{L}$ de diferentes líquidos-testes de diferentes polaridades: água destilada, formamida e diiodometano. A partir do ângulo de contato formado, todas as superfícies foram

consideradas hidrofílicas, pois apresentaram CA<90º, sendo o grupo controle (C1 e C2) as superfícies mais hidrofílicas, já que apresentaram os valores de CA significativamente menores que os grupos experimentais (P<0,05). Já o grupo experimental T2, revestido por zircônia, foi considerada a superfície mais hidrofóbica (**tabela 5**).

Em relação a energia livre de superfície, obtida por meio da equação de Oewns-Wendt: $\gamma_L(1+\cos\theta) = 2(\gamma_s^d \gamma_L^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \gamma_L^p)^{1/2}$, os grupos controles (C1 e C2) apresentaram valores de energia significativamente maiores que o grupo experimental (T1 e T2), entretanto, não houve diferenças significativas entre os dois grupos controles e os dois grupos tratados (P<0,05) (**tabela 5**).

Tabela 5- Energia livre de superfície (γ_s) e molhabilidade (CA) das amostras de Ti controles e tratadas.

Grupos	γ_s (mJ m ⁻²)	CA (º)
C1	49,59 ± 2,63 ^A	53,44 ± 5,20 ^A
C2	50,50 ± 2,29 ^A	47,44 ± 5,48 ^A
T1	37,00 ± 2,58 ^B	63,61 ± 5,89 ^B
T2	35,62 ± 1,84 ^B	72,93 ± 5,02 ^C

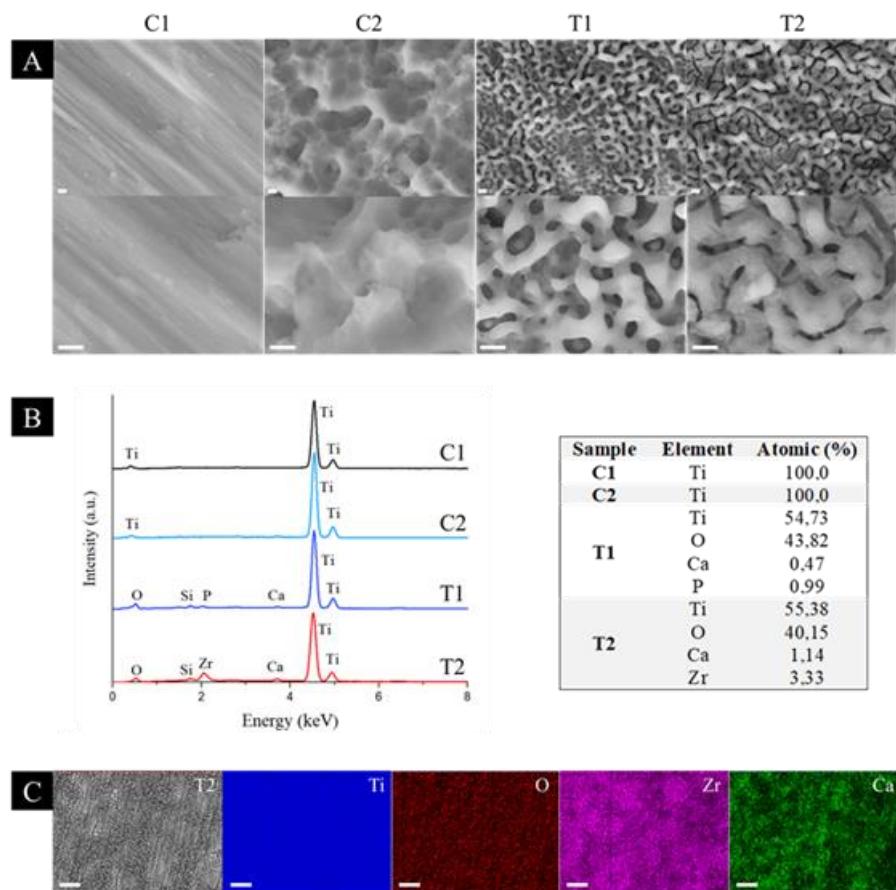
Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada parâmetro analisado (P<0,05; Tukey's test). CA: ângulo de contato entre a superfície testada e gota de água destilada. C1: controle usinado; C2: controle comercial; T1: tratamento por plasma eletrolítico oxidativo (PEO); T2: tratamento por PEO seguido de anodização para a deposição de zircônia.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de raio-X por dispersão de energia (EDX).

A análise da caracterização da morfologia superficial realizada por meio do MEV, utilizando o microscópio EVO 50 (Carl Zeiss, Cambridge, Inglaterra) em aumentos de 10.000x e 30.000x foi significativamente diferente entre os grupos. Os discos do grupo C1 apresentaram marcas lineares e paralelas compatíveis com o processo de usinagem, os discos C2 mostrou-se rugosa e uniforme com a presença de picos e vales de aproximadamente 4-5 µm. Já os discos T1 apresentou a presença de microporos de aspecto “vulcânico” uniformemente distribuídos em toda a superfície, e os discos T2, após o processo de anodização tiveram um espessamento

das paredes dos microporos e a redução do seu diâmetro interno. (figura 4A). Em relação a análise da composição química por meio do EDX, os grupos controles C1 e C2 apresentaram composição química somente do elemento Ti, enquanto o grupo T1 apresentou maior proporção dos elementos titânio e oxigênio, e em menor proporção os elementos cálcio e fosforo. Já para o grupo T2, foram identificados os elementos titânio e oxigênio em maior quantidade, e os elementos zircônia e cálcio em menor proporção. Neste grupo não foi possível a análise do elemento fósforo devido a sobreposição com os picos de zircônia (figura 4B).

Figura 4 - A) Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos discos (barra de escala: 1 μm) em aumentos de 10.000x (linha superior) e 30.000x (linha inferior); B) Espectros e quantificação elementar gerados por espectroscopia de raios X por dispersão de energia. O elemento silício (Si) não foi incluído na quantificação por ser considerado um contaminante; C) Mapa composicional da distribuição dos elementos químicos Ti, O, Zr e Ca na superfície de amostra do grupo T2 (barra de escala: 20 μm). C1: controle usinado; C2: controle comercial; T1: tratamento por plasma eletrolítico oxidativo (PEO); T2: tratamento por PEO seguido de anodização para a deposição de zircônia.



4.4 Analise da composição química da superfície dos espécimes por Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raio X (XPS).

A realização da técnica de XPS realizada com auxilio do equipamento UNI-SPECS UHV Surface Analysis System equipado com XPS da FOAr/UNESP permitiu caracterizar a composição química elementar e o perfil das concentrações nas primeiras monocamadas (1-5nm) da superfície dos discos de Ti (N=3), por meio da irradiação com feixes de Raio-X, em ambiente de vácuo, e a detecção dos fotoelétrons emitidos pelos átomos irradiados dos elementos químicos na amostra, utilizando o espectrofotômetro comercial (UNI-SPECS UHV System, Berlim, Alemanha). Como resultado, tivemos alta contaminação superficial nos grupo experimental, T1 e T2, por hidrocarbonetos. Além disso, todos os grupos apresentam como principal componente a ligação entre o O-Ti, formando o TiO₂ (**tabela 7**).

Tabela 7- Concentração atômica (at.%) dos elementos da camada superficial (<5nm) das amostras tratadas a partir de espetro de alta resolução gerados pela análise de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X

	G3	G4
Carbono (C 1s)	68,2	56,6
Oxigênio (O 1s)	26,8	32,7
Titânio (Ti 2p)	0,4	0,7
Cálcio (Ca 2p)	0,6	*
Fósforo (P 2p)	4,0	2,4
Zircônio (Zr 3d)	-	7,5

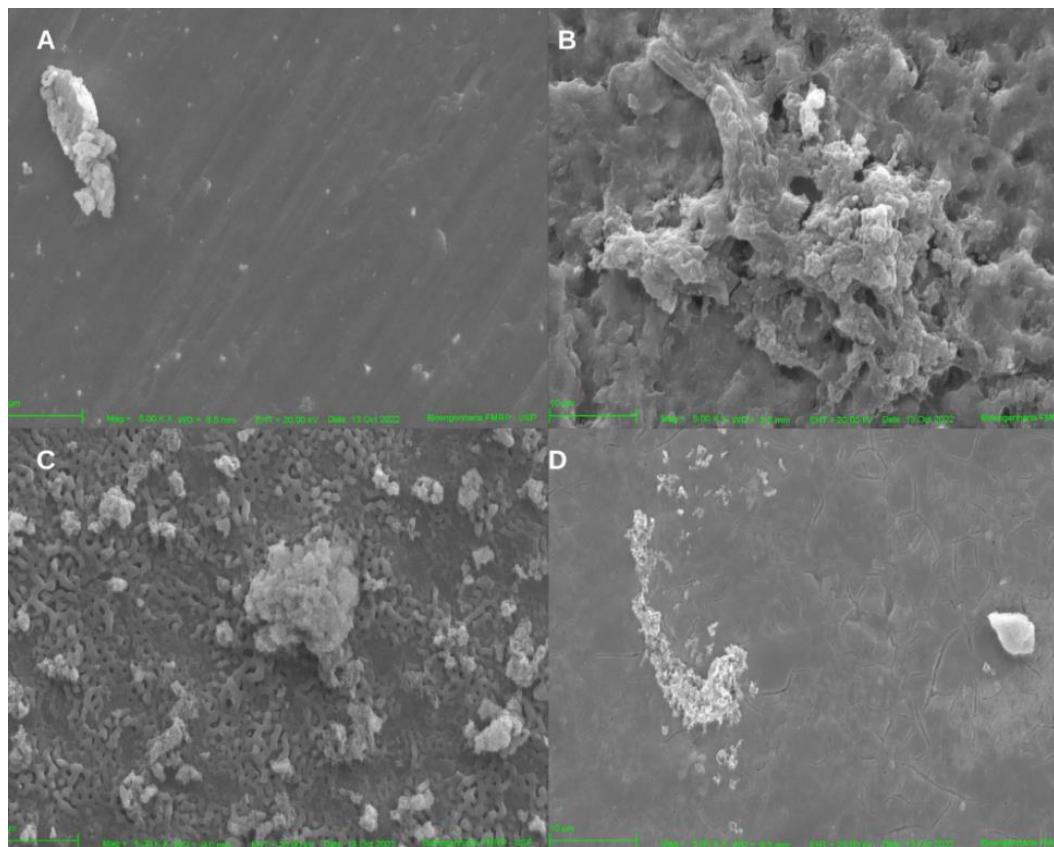
Desfecho da avaliação microbiológica

4.5 Avaliação do biofilme microbiano pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A avaliação do biofilme (N=3) foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss Evo ma10) em aumentos de 5.000x e 10.000x, onde previamente as superfícies dos discos de Ti receberam o recobrimento metálico de ouro (Cressington 108) para a obtenção de imagens em alta resolução da morfologia das superfícies controles e experimentais. Nesta análise foi possível verificar que o grupo experimental T2 (**imagem 5.D**) apresentou uma menor área recoberta por

colônias bacterianas, em comparação ao grupo experimental T1 (**imagem 5.C**). A menor colonização bacteriana ocorreu devido ao processo de anodização pelo recobrimento dos poros com Zn, sendo favorável para que houvesse uma menor adesão bacteriana e minimizando a proliferação de micro-organismos patogênicos, e com isso, aumentando as chances de sucesso dos implantes. Já em relação aos grupos controles, o grupo C1 (**imagem 5.A**) apresentou menor quantidade de colônias bacterianas que o grupo C2 (**imagem 5.B**) devido a menor rugosidade presente, sendo essa característica também favorável para o aumento do sucesso dos implantes.

Figura 5- Imagens representativas do biofilme para os diferentes grupos. A: controle usinado; B: controle comercial; C: tratamento por plasma eletrolítico oxidativo (PEO); D: tratamento por PEO seguido de anodização para a deposição de zircônia. Aumentos de 5.000x.



5. DISCUSSÃO

Este estudo determinou como a caracterização das superfícies influencia nas propriedades superficiais dos diferentes tipos de discos de Titânio. Além disso, foi analisado o efeito dessa caracterização na formação do biofilme oral, *in situ*, em comparação às superfícies de titânio comerciais tratadas por duplo ataque ácido ou usinadas com os grupos experimentais tratados por PEO e seguidos por anodização com recobrimento com zircônia.

As avaliações feitas nas superfícies dos discos experimentais T1 e T2, demonstraram modificações em relação à rugosidade superficial, alteração do grau de hidrofilia-hidrofobicidade e na energia livre de superfície, e por fim, na colonização microbiana.

Nos resultados de caracterização das superfícies, o grupo C2, discos tratados por duplo ataque ácido, o grupo T1, discos tratados por PEO, e o grupo T2, discos tratados por PEO seguido por recobrimento de Zr, foram classificados como moderadamente rugosos, sendo o grupo C2 o de maior rugosidade, conforme observado pela microscopia confocal a laser. O grupo C2 apresentou o relevo de maior rugosidade devido ao padrão de picos e vales acentuados gerados pelo duplo ataque ácido. A rugosidade superficial é uma característica extremamente favorável ao processo de osseointegração, uma vez que apresenta grande influência na migração e proliferação celular, a qual, em partes, leva a melhores resultados de contato osso-implante, sugerindo que a topografia do implante de titânio influencie na interação tecido-biomaterial ⁴³, uma vez que aumenta a área de contato do implante com o osso adjacente ⁴⁴, promove maior resistência ao torque ⁴⁵ e aumenta a estabilidade primária em comparação com as superfícies usinadas. Além disso, a presença de superfície rugosa possibilita melhor aposição óssea e contato osso-implante, favorecendo assim o processo de osseointegração ⁴⁶ sendo benéfico para o aumento do sucesso dos implantes, além de auxiliar na estabilidade biomecânica ⁴⁷. Em relação à formação da rede de fibrina que se forma quando a superfície do implante entra em contato com o coágulo e células sanguíneas, os implantes com maior rugosidade proporcionam uma maior aderência e retenção da rede de fibrina em comparação às demais superfícies ⁴⁸, favorecendo assim as demais etapas do processo de cicatrização e osseointegração.

Ademais, em superfícies rugosas, as proteínas da matriz óssea, fosfatase alcalina e osteocalcina, que são importantes indicadores de diferenciação osteogênica e formação de tecido ósseo, expressam-se em níveis elevados ⁴⁹. Além disso, as células precursoras dos osteoblastos aderem-se mais rapidamente e apresentam maior diferenciação ⁵⁰. Por outro lado, o aumento da rugosidade superficial promove um aumento da área disponível ⁵¹, e com isso, pode potencializar a falha do implante, devido à maior agregação bacteriana, com maior risco de inflamação e perimplantite ⁵².

Na análise de molhabilidade e energia livre de superfície, os grupos controles C1, discos de Ti sem tratamento de superfície, e C2, discos de Ti tratados por duplo ataque ácido, apresentaram menor ângulo de contato aparente entre a superfície das amostras e à gota de água destilada, sendo assim consideradas as superfícies mais hidrofílicas, e com maior energia livre de superfície. A hidrofilicidade permite que a superfície de titânio fique mais susceptível a fixação do coágulo sanguíneo, interferindo dessa forma na osteogênese de contato, que é a resposta ideal para a osseointegração. Além disso, a hidrofilicidade permite que haja interação íntima com os fluidos biológicos, permitindo a adsorção normal de proteínas à superfície e subsequente interações com os receptores celulares e aumenta a adesão celular ⁵³. Ademais, as superfícies hidrofílicas tendem a melhorar os estágios iniciais de adesão celular, proliferação, diferenciação e mineralização óssea em comparação com as superfícies hidrofóbicas ⁵⁴ e auxiliam na cicatrização da ferida, e assim, aceleram a osseointegração ⁵⁵. Já em relação ao efeito sobre a colonização microbiana, o efeito sobre o aumento ou a diminuição da molhabilidade ainda é controverso, visto que alguns autores sugerem que as superfícies hidrofílicas são mais susceptíveis ao acúmulo de biofilme ⁵⁶ enquanto outros argumentam que as superfícies hidrofóbicas podem reduzir a colonização microbiana, pois promovem uma adesão mais fraca das bactérias à superfície ⁵⁷. Em contrapartida, a relatos na literatura que sugerem que as bactérias hidrofóbicas aderem às superfícies hidrofóbicas e as hidrofílicas em relação à superfície hidrofílica ⁵⁸.

Em relação a maior energia livre de superfície, ela permite que haja uma maior atração de moléculas e células à superfície, ou seja, tanto de osteoblastos, que é ideal e favorece o processo de osseointegração, mas também de células bacterianas, que podem prejudicar e levar ao processo inflamatório. Além disso, implantes com alta

energia de superfície devem, pelo menos em teoria, apresentar uma osseointegração mais forte do que implantes com baixa energia de superfície, devido à melhor adsorção das proteínas⁵⁹. Já os grupos experimentais, T1, discos tratados por PEO, e o grupo T2, discos tratados por PEO seguido por recobrimento de Zr foram classificados como hidrofóbicos e com menor energia livre de superfície. A hidrofobicidade promove uma maior propensão à contaminação por hidrocarbonetos, que podem interferir na adsorção de proteínas e na adesão/ativação de receptores celulares e podem desnaturar parcialmente as proteínas, alterando a estrutura terciária das mesmas, fazendo com que os locais de ligação celular sejam menos acessíveis, o que resulta em menor adesão celular⁶⁰. Em relação à baixa energia de superfície, são consideradas potenciais redutoras na adesão microbiana⁶¹. Embora os grupos experimentais apresentem tais características, existe um consenso que a realização da PEO gera superfícies que facilitam a adesão, proliferação e a diferenciação de células osteogênicas, quando comparadas às superfícies não tratadas^{10,11,13,20}.

A análise do espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio-X (XPS) mostrou alta contaminação superficial das amostras por hidrocarbonetos, isso acontece porque o titânio por ser um material altamente reativo, quando em contato com a atmosfera, tende a absorver contaminantes inorgânicos ou hidrocarbonetos. Esta absorção acontece porque o carbono é o contaminante mais proeminente das superfícies de titânio, parte do carbono detectado é o resultado da inevitável adsorção de compostos atmosféricos contendo carbono à superfície de titânio⁶². A presença de hidrocarbonetos na superfície não é tão vantajosa, pois como se trata de subprodutos, a sua presença acaba reduzindo a concentração de outros componentes que sejam mais vantajosos. Além disso, leva a uma redução da energia superficial e consequentemente alterando a molhabilidade da superfície.

Na análise de composição química das amostras por EDX, houve a identificação somente do elemento titânio nos grupos controles, C1, discos de Ti sem tratamento de superfície, e C2, discos de Ti tratados por duplo ataque ácido. Esta característica faz com que quando exposto ao ar, o titânio forme imediatamente a camada de óxido de titânio, que provê resistência à corrosão. Além disso, permite que haja adaptação íntima entre o osso mineralizado e a superfície do implante

promovendo assim condições biológicas ideais para o fenômeno da osseointegração^{63,64,65,66,67,68}.

Já nos grupos experimentais, o grupo T1, discos tratados por PEO, e o grupo T2, discos tratados por PEO seguido por recobrimento de Zr, apresentaram outros elementos além do titânio, como o oxigênio, cálcio e fósforo, sendo em maior quantidade os primeiros elementos. A presença desses outros elementos advém do processo experimental de tratamento de superfície. O desfecho microbiológico do projeto de pesquisa central desta iniciação científica, que envolverá metodologias de identificação e quantificação de espécies microbianas, poderá ajudar a avaliar se algum destes componentes presentes nas superfícies experimentais tem impacto relevante sobre a modulação do biofilme microbiano.

Na análise do biofilme microbiano formado por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies por meio uso dos dispositivos intra-oraís, o grupo T2, discos tratados por PEO seguido por recobrimento de Zr, apresentou uma menor área recoberta por colônias bacterianas em relação ao grupo experimental T1, discos tratados por PEO para a formação de microporos. Com isso, o processo de anodização com zircônia mostrou-se extremamente favorável para o aumento do sucesso dos implantes, pois com a técnica de anodização os microporos de aspecto “vulcânico” formados pela PEO foram recobertos, tornando a superfície ligeiramente menos porosa e com isso, possibilitou uma menor adesão bacteriana, minimizando assim a proliferação de micro-organismos. Outro fator que pode ser atribuído à menor colonização é o fato de as superfícies cerâmicas, como a zircônia, apresentarem menor susceptibilidade à colonização microbiana¹⁴, em comparação ao titânio. Já em relação aos grupos controles, o grupo C1, discos de Ti sem tratamento de superfície, apresentou menor quantidade de colônias bacterianas em comparação ao grupo C2, discos de Ti tratados por duplo ataque ácido. Isto ocorreu porque o grupo C1 apresentava marcas paralelas devido ao processo de usinagem, e com isso, uma menor rugosidade superficial, promovendo desta forma uma menor colonização bacteriana. Além disso, a menor colonização pode ter ocorrido porque a superfície usinada dificulta o espalhamento das células, tornando-se uma superfície anisotrópica⁶⁹.

6. CONCLUSÕES

Concluímos, dentro das limitações experimentais deste estudo, que:

- É possível a caracterização superficial do titânio com adição do componente zircônio, resultando em uma estrutura estável; as superfícies experimentais também apresentaram cálcio e fósforo na composição.
- As superfícies experimentais apresentaram menor energia de superfície, ganho da hidrofobicidade e maior rugosidade superficial.
- As superfícies experimentais apresentaram menor formação de biofilme e células microbianas.

REFERÊNCIAS

1. Campoccia, D., Montanaro, L. & Renata, C. Biomaterials A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 34, 8018–8029 (2013).
2. Barthes, J. et al. Review: the potential impact of surface crystalline states of titanium for biomedical applications. *Critical Reviews in Biotechnology* (2018).
3. Lautenschlager, E. P. & Monaghan, P. Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int. Dent. J.* 43, 245–53 (1993).
4. Lee, C., Huang, Y., Zhu, L. & Weltman, R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis : systematic review and meta-analysis. *J. Dent.* 62, 1–12 (2017).
5. Hu, H. et al. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium. *Acta Biomater.* 8, 904–915 (2012).
6. Ottria, L. et al. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 32, 81–90
7. Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P. & Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.* 23, 844–854 (2007).
8. Annunziata, M. et al. Bacterial adhesion to direct laser metal formed and mildly acid etched implant surfaces. *Surf. Coatings Technol.* 328, 390–397 (2017).
9. Curran, J. A. & Clyne, T. W. Porosity in plasma electrolytic oxide coatings. *Acta Mater.* 54, 1985–1993 (2006).
10. Hartjen, P. et al. Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium Implant Surfaces: Microgroove-Structures Improve Cellular Adhesion and Viability. *In Vivo* 32, 241–247 (2018).
11. Li, L.-H. et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials* 25, 2867–75 (2004).
12. Alves, S. A., Bayón, R., Igartua, A., Saénz de Viteri, V. & Rocha, L. A. Tribocorrosion behaviour of anodic titanium oxide films produced by plasma electrolytic oxidation for dental implants. *Lubr. Sci.* 26, 500–513 (2014).
13. Zhou, W. et al. Effect of titanium implants with coatings of different pore sizes

- on adhesion and osteogenic differentiation of BMSCs. *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.* (2019).
14. Sivaraman, K., Chopra, A., Narayan, A. I. & Balakrishnan, D. Is zirconia a viable alternative to titanium for oral implant? A critical review. *J. Prosthodont. Res.* 62, 121–133 (2018).
 15. Negahdari, R. et al. Comparison of proinflammatory cytokine levels in gingival crevicular fluid around dental implants with ceramic and titanium abutments. *J. Contemp. Dent. Pract.* 18, 831–836 (2017).
 16. Barwacz, C. A. et al. Comparison of pro-inflammatory cytokines and bone metabolism mediators around titanium and zirconia dental implant abutments following a minimum of 6 months of clinical function. *Clin. Oral Implants Res.* 26, e35–e41 (2015).
 17. Do Nascimento, C. et al. Microbiome of titanium and zirconia dental implants abutments. *Dent. Mater.* 32, 93–101 (2016).
 18. de Freitas, A. R. et al. Oral bacterial colonization on dental implants restored with titanium or zirconia abutments: 6-month follow-up. *Clin. Oral Investig.* (2018).
 19. de Oliveira Silva, T. S., de Freitas, A. R., Albuquerque Junior, R. F., Pedrazzi, V., Ribeiro, R. F. & do Nascimento, C. A 3-year longitudinal prospective study assessing microbial profile and clinical outcomes of single-unit cement-retained implant restorations: zirconia versus titanium abutments. *Clin. Implant Dent. Rel. Res.* (2020). doi: 10.1111/cid.12888. [Epub ahead of print]
 20. Al-Radha, A. S. D., Dymock, D., Younes, C. & O'Sullivan, D. Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J. Dent.* 40, 146–153 (2012).
 21. Zhou, J. & Zhao, L. Hypoxia-mimicking Co doped TiO₂microporous coating on titanium with enhanced angiogenic and osteogenic activities. *Acta Biomater.* (2016).
 22. Zhang, R. et al. The immunomodulatory effects of Zn-incorporated micro/nanostructured coating in inducing osteogenesis. *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.* 46, 1–8 (2018).
 23. Li, X., Xu, H., Zhao, B. & Jiang, S. Accelerated and enhanced osteointegration of MAO-treated implants: histological and histomorphometric evaluation in a

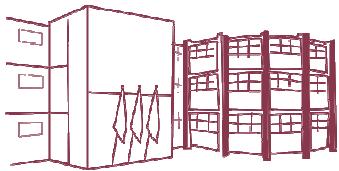
- rabbit model. *Int. J. Oral Sci.* 10, 11 (2018).
24. Ran, W. et al. Superior biocompatibility and osteogenic efficacy of micro-arc oxidation-treated titanium implants in the canine mandible. *Biomed. Mater.* 4, 055003 (2009).
25. Hou, P.-J. et al. Hybrid micro/nanostructural surface offering improved stress distribution and enhanced osseointegration properties of the biomedical titanium implant. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 79, 173–180 (2018).
26. Alves, A. C. et al. Tribocorrosion behaviour of anodic treated titanium surfaces intended for dental implants. *J. Phys. D Appl. Phys.* 46, 404001–9 (2013).
27. Marques, I. da S. V. et al. Tribocorrosion behavior of biofunctional titanium oxide films produced by micro-arc oxidation: Synergism and mechanisms. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 60, 8–21 (2016).
28. Zhang, L., Gao, Q. & Han, Y. Zn and Ag Co-doped Anti-microbial TiO₂ Coatings on Ti by Micro-arc Oxidation. *J. Mater. Sci. Technol.* 32, 919–924 (2016).
29. Zhang, P., Zhang, Z. & Li, W. Antibacterial TiO₂ Coating Incorporating Silver Nanoparticles by Microarc Oxidation and Ion Implantation. *J. Nanomater.* 2013, 1–8 (2013).
30. Ma, M. et al. Study on the In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity and Biocompatibility of Novel TiN/Ag Multilayers Immobilized onto Biomedical Titanium. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19, 3777–3791 (2019).
31. Yao, Z., Jiang, Y., Jiang, Z., Wang, F. & Wu, Z. Preparation and structure of ceramic coatings containing zirconium oxide on Ti alloy by plasma electrolytic oxidation. *J. Mater. Process. Technol.* 205, 303–307 (2008).
32. Pérez-Chaparro, P. J. et al. The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *J. Periodontol.* 87, 1295–1304 (2016).
33. Do Nascimento, C., De Albuquerque, R. F., Monesi, N. & Cândido-Silva, J. A. Alternative method for direct DNA probe labeling and detection using the checkerboard hybridization format. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3039–3040 (2010).
34. Nascimento, C. do et al. Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin. Oral Implants Res.* 25, 337–343 (2014).
35. Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. et al. Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4423–4427

- (2002).
36. Rodrigues, A. S. et al. Clinical and Microbiologic Evaluation, by Real-Time Polymerase Chain Reaction, of Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis Associated With Amoxicillin and Metronidazole. *J. Periodontol.* (2011).
37. Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Saeki, H. & Katano, H. Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 15479–88 (2015).
38. Socransky, S. S. et al. ' Checkerboard 'DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* (1994).
39. Nascimento, R. M., Ramos, A. P., Ciancaglini, P. & Hernandes, A. C. Blood droplets on functionalized surfaces: chemical, roughness and superhydrophobic effects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 574, 188-96 (2019).
40. Silva, T. S. O. et al. Oral Biofilm Formation on Different Materials for Dental Implants. *J. Vis. Exp.* (2018).
41. ABRON, A.; HOPFENSPERGER, M.; THOMPSON, J.; COOPER, L. F. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosthet Dent*, v. 85, n. 1, p. 40-46, 2001.
42. BUSER, D.; NYDEGGER, T.; OXLAND, T.; COCHRAN, D. L.; SCHENK, R. K.; HIRT, H. P.; SNÉTIVY, D.; NOLTE, L. P. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, v. 45, n. 2, p. 75-83, 1999.
43. Abron et al., 2001; Novaes et al., 2002
44. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022391300920961?via%3Dihub>
45. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration, *Dental Materials*
46. Buser et al. 1999; Buser et al., 1991
47. L. Le Guéhennec, A. Soueidan, P. Layrolle, Y. Amouriq, Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.
48. (Abrahassom, I., Berglundh, T., 2004 ; Abrahamsson, I., Berglundh, T., 2009 ;

- Cho, S.
49. (Davies JE. Mecanismos de integração endóssea. *Int J Prosthodont* 1998;11:391-401.)
50. Zareidoost, A., Yousefpour, M., Ghaseme, B. et al. A relação entre a rugosidade da superfície e a resposta celular da modificação química da superfície do titânio. *J Mater Sci: Mater Med* 23, 1479–1488 (2012).
51. Curd M.L. Bollenl, Paul Lambrechts, Marc Quirynen, Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature, *Dental Materials*, Volume 13, Issue 4, 1997,
52. Cho & Park, 2003; Van Assche et al, 2011
53. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014 Jul;10(7):2907-18. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.032. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24709541; PMCID: PMC4103435.
54. C. Eriksson , H. Nygren , K. Ohlson Implantação de discos hidrofílicos e hidrofóbicos de titânio em tíbia de rato: reações celulares nas superfícies durante as primeiras 3 semanas em osso.
55. (F. Rupp, L. Liang, J. Geis-Gerstorfer, L. Scheideler, F. Hüttig, Surface characteristics of dental implants: A review, *Dental Materials*, Volume 34, Issue 1, 2018, Pages 40-57, MM Bornstein , P. Valderrama , AA Jones , TG Wilson , R. Seibl , DL Cochran. Aposição óssea em torno de duas superfícies diferentes de implantes de titânio jateados e tratados com ácido: um estudo histomorfométrico em mandíbulas caninas)
56. (KREVE, S.; CÂNDIDO DOS REIS, A. Influence of the electrostatic condition of the titanium surface on bacterial adhesion: A systematic review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 125, n. 3, p. 416–420, 2021.)
57. (SONG, F.; KOO, H.; REN, D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of Dental Research*, v. 94, n. 8, p. 1027–1034, 2015.).

58. (Urška Filipović, Raja Gošnak Dahmane, Slaheddine Ghannouchi, Anamarija Zore, Klemen Bohinc, Bacterial adhesion on orthopedic implants, Advances in Colloid and Interface Science, Volume 283, 2020)
59. ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. Oral implant surfaces: Part 1 – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. In J Prosthodont 2004;17:536-46.
60. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. Acta Biomater. 2014 Jul;10(7):2907-18. doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.032. Epub 2014 Apr 5. PMID: 24709541; PMCID: PMC4103435.
61. (TEUGHELS et al., 2006; SUBRAMANI et al., 2009; SONG; KOO; REN, 2015).
62. Karlsson U, Gotfredsen K, Olsson C. Um relatório de 2 anos sobre próteses parciais fixas maxilares e mandibulares suportadas por implantes dentários Astra Tech. Uma comparação de 2 implantes com diferentes texturas de superfície. Clin Oral Implants Res 1998;9: 235–242.).
63. SYKARAS, N. et al. Implant Materials, Designs, and Surface Topographies: Their Effect on Osseointegration. A Literature Review. Int. J. Oral Maxillofac. Implants. 2000; 15 (5): 675-90.
64. STEINEMANN, S. G. Titanium – the material of choice? Periodontology 2000. 1998; 17: 7-21.
65. BRÄNEMARK, P. I. Surface Properties and Osseointegration. In: BRÄNEMARK, P. I. et al. The osseointegration Book: from Calvarium to Calcaneus. Berlin, 2005; 5.
66. 7. DAVIES, J. E. Bone Engineering- Workshop, Toronto, Canada; 1999.
67. 8. PLACKO, H. E. et al. Surface characterization of titanium-based implant materials. Int. J. Oral Max. Implant. 2000; 15 (3): 355-63.
68. 22. ELIAS, C. N. et al. Diferentes superfícies dos implantes Dentários. In: III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais Campinas. 2004.
69. PINTO, L. E. S. C.; ELIAS, C. N.. Análise química e topográfica de implantes de titânio após tratamentos químicos de superfície. In: IV CONGRESSO

LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 2006,
Caxambu)



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 531ª Reunião Ordinária, realizada em 03 de junho de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA)**.

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 03 de junho de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP