UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Materiais Dentários e Prótese

Nathalia Ferraz Oliscovicz

**Tratamento de superfície para dispositivos de Implantodontia
com antimicrobiano nanoparticulado**

Ribeirão Preto
- 2014 -

NATHALIA FERRAZ OLISCOVICZ

**Tratamento de superfície para dispositivos de Implantodontia
com antimicrobiano nanoparticulado**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de doutor no programa de Reabilitação
Oral

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: **Profa. Dra. Andréa Candido
dos Reis**

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

- 2014 -

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALÓGRAFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus da USP

Oliscovicz Ferraz, Nathalia

Tratamento de superfície para dispositivos de Implantodontia com
antimicrobiano nanoparticulado. Ribeirão Preto, 2014.

196 p. : il. ; 30 cm

Versão Corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível
na unidade que aloja o Programa.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Candido dos Reis, Andréa.

1. Peri-implantite 2. Nanopartículas 3. Vanadato de prata
4. Atividade antimicrobiana 5. Implantodontia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathalia Ferraz Oliscovicz

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*"Somos o resultado dos livros que lemos, das viagens que fazemos e
das pessoas que amamos."*

Airton Ortiz

Dedicatória

À Deus

A Ti, meu companheiro de todos os momentos - de luta e de glória; que me abençoou e me deu luz, para me guiar e me prover de fé e força para nunca desistir e acreditar no que queremos. Obrigada por me conceder os dons que me permitiram realizar um trabalho para benefício da ciência e da população humana e para minha realização pessoal; a conquista de um sonho.

Ao Senhor, dedico este trabalho.

Ao meu pai, Carlos Oliscovitz,

Quem poderia ser eu, sem a presença dessa figura paterna tão presente e influente em todos os passos da minha vida? Obrigada por ensinar os princípios de honestidade e do que vem do coração. Por cada frase de sabedoria como “Sinta-se lá”; “Existem pessoas que vieram ao mundo para vê-lo passar e outras para fazê-lo girar”; “Acredite!”; “Se a vida te deu um limão, faça uma limonada” – as quais carrego comigo diariamente. Me fez crer que nossos pensamentos são frutos do que colhemos no futuro e de que sem a fé, nada conquistamos. Obrigada por estar sempre tão constante em minha vida e principalmente por estar até HOJE, vendo minhas conquistas sendo realizadas. Você PRECISAVA ver tudo isso.

À minha mãe, Jucieleide Ferraz Oliscovitz,

Pela presença materna incontestável, pelas suas provas de amor dadas em dedicação plena. Pela prioridade a quem deu seus cuidados, seu carinho. Pela amizade, pela força em cada obstáculo, pela mão dada em cada vendaval. Pelos ensinamentos, pela disciplina, dados com tanto amor. Pelo incentivo dado com suas risadas mais gostosas. Sempre soube que cada ligação diária me daria força para continuar, pois sua energia é simplesmente tão mágica, que consegue me transferir aos quilômetros de distância. Obrigada por valorizar cada virtude minha. Sem ti, não seria essa mulher.

Ao amor da minha vida, Fabiano Penha Frota

Como descrever tamanha importância que você teve em minha vida no momento da estrada de tantas curvas e encruzilhadas? Deu-me a estabilidade que eu precisava, o suporte que sustentou minhas angústias, as palavras que seguraram meus conflitos. Com seu otimismo e sorriso no rosto constante, me deu força de vontade e alegria de viver os desafios da vida, fazendo-me enxergar com foco nos meus valores. Com seu amor me deu paz interior para continuar, me fortaleceu e me engrandeceu. Obrigada pela hospitalidade física e emocional, por abrir sua casa e seu coração, por me permitir entrar na sua vida e encontrar minha alma gêmea. Por ser esse homem que me completa e não imagino mais sem.

Ao meu irmão, Alexandre Ferraz Oliscovitz

Por toda troca de carinho, de afeto, de companheirismo nesses 27 anos. Por sempre me permitir praticar minha vontade de ensinar, transmitir meu conhecimento. Hoje, transfiro teu orgulho a mim, para ti. Você não imagina como te admiro e tento aprender contigo atitudes louváveis, como sua humildade e determinação. Sei que apesar das diferenças, temos muito em comum, pois o espelho que você olhou a
vi

A vocês, dedico este trabalho.

Agradecimento Especial

"A vida é arte do encontro."

Vinicius de Moraes

*À minha orientadora, **Andréa Candido dos Reis**, agradecer em uma página seria pouco para descrever minha eterna gratidão a ti. Acredito que nada que acontece em nossa vida é por acaso, e dessa maneira, creio que a minha orientação junto a ti, foi uma proximidade que abrange além de uma escolha acadêmica. Você sempre falou de meu romantismo, e com suas filosofias que para mim, ultrapassaram minhas expectativas de uma orientação; fez-me me conhecer melhor como ser humano e me transmitiu uma sabedoria e um conhecimento que posso carregá-lo comigo a vida inteira e aplicá-los além da ciência e carreira odontológica. É impressionante como cresci nesses quase cinco anos, e boa parte da minha experiência devo a ti, que me enxergar que a luta faz parte da conquista; que Deus sempre diz “SIM” e o “NÃO” foi o homem que inventou; que quando todos choravam alguém inventou o lenço. Obrigada a me fazer entender porquê se faz ciência, porquê estudar ultrapassa a leitura, porquê estamos aqui. Obrigada pela confiança, pela paciência, pela compreensão, pelo incentivo; por me valorizar e acreditar em mim. Admiro muito sua dedicação e o prazer e paixão que você tem pela pesquisa, pela Odontologia. Pode ter certeza que assim como muitos, me espelho em você, na minha orientadora e para sempre amiga, Andréa.*

"A gratidão é a memória do coração. "

Antístenes

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), minha fonte de orgulho, por me receber no curso de mestrado e doutorado e me proporcionar junto a toda sua equipe, meu crescimento profissional.

A CAPES, pela bolsa de doutorado concedida, que me ajudou para a realização desta pesquisa.

*À Prof(a).Dr(a). **Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza**, coordenadora do curso de pós-graduação na área de Reabilitação Oral da FORP, por toda confiança que teve em mim, pela compreensão e paciência, e sua sempre prontidão e atenção. Pela dedicação tão plena e bela à pós-graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese.*

*Às alunas do curso de mestrado **Denise Tornavoi de Castro** e **Mariana Lima da Costa Valente**, por toda prontidão e colaboração e para realização de minha pesquisa. Pela compreensão e auxílio sem o qual meu trabalho não seria possível. Meu muitíssimo obrigado.*

*Ao Prof. Dr. **Evandro Watanabe**, do Departamento de Odontologia Restauradora, pela colaboração e ensinamentos essenciais na parte microbiológica desse trabalho. Pela parceria, compreensão e disponibilização dos seus concorridos horários e todos os recursos para realização da metodologia microbiológica.*

*A Profa. Dra. **Denise de Andrade**, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da USP, por me receber sempre tão bem e disponibilizar o uso dos equipamentos e materiais do Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS).*

*Ao Prof. Dr. **Oswaldo Luiz Alves**, do laboratório de Química do Estado Sólido da UNICAMP e ao Prof. Dr. **Raphael Dias Holtz**, pela oportunidade muitíssimo valiosa de trabalhar no meu doutorado com o produto químico pesquisado por eles, e que permitiu o desenvolvimento dessa tese. Obrigada por abrir meus horizontes e permitir aplicar uma possível inovação para os pacientes odontológicos.*

*Ao Prof. Dr. **Marco Antônio Schiavon**, da Universidade Federal de São João del-Rei, pela contribuição para obtenção do composto químico utilizado neste estudo, pela sua atenção e disponibilidade constante a ajudar.*

*A engenheira **Ana Paula Macedo**, responsável pelo Laboratório de Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela sua ajuda e contribuição científica de grande valia nos ensaios físicos e no fornecimento de conhecimento nesta área.*

*Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano**, do Departamento de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por disponibilizar o laboratório com o microscópio para análise da Microscopia Eletrônica de Varredura, e ao **Paulo Donato Frighetto** pela contribuição valiosa nas análises das amostras e interpretação das mesmas.*

*Ao **Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza**, pela oportunidade de convivência e de me permitir desfrutar de seus conhecimentos e idéias; por ser sempre tão acessível e colaborar nos meus projetos.*

*As alunas de doutorado **Adriana Barbosa Ribeiro, Maria Paula Della Vecchia, Tatiana Ramirez Cunha**, pelo companheirismo, prazerosa convivência e rica troca de conhecimento; pela compreensão e atitudes de amizade verdadeira. Independente da distância as quero sempre como amigas.*

*Ao **Prof. Dr. Vinícius Pedrazzi**, pelas avaliações de meus relatórios e sugestões tão enriquecedoras como relator e integrante da banca de minha qualificação. Certamente contribuíram muito para meu projeto de pesquisa e sua conclusão.*

*Ao **Prof. Dr. César Lepri**, por executar a análise estatística deste estudo e sempre mostrar disposição aos esclarecimentos de minhas dúvidas.*

*Aos **professores do curso de pós-graduação do Departamento de Materiais Dentários e Prótese**, pela contribuição profissional de cada um na minha formação intelectual e prática docente.*

*A todos meus **amigos do curso de mestrado e doutorado em Reabilitação Oral da FORP** que tornaram tão agradável a rotina diária de frequentar a faculdade, pela convivência harmoniosa dentro e fora da sala de aula; pelas trocas de ideias, conhecimentos e informações; pelo apoio em todos os momentos; pela amizade fiel e sincera. Vocês estarão eternamente no meu coração.*

À aluna de doutorado **Suleima do Vale Alves**, a qual considero mais que uma amiga; um verdadeiro anjo que surgiu na minha vida por estarmos vivenciando o mesmo momento, mas nela exerceu tamanho influência que não saberia dizer quais seriam meus caminhos se não tivesse suas portas sempre abertas. A minha amizade te devo eternamente e agradeço cada oportunidade que me proporcionou conquistar muito do que tenho hoje.

À funcionária **Viviane de Cássia Oliveira**, do Departamento de Materiais Dentários e Prótese – FORP, pela sua valiosa ajuda na execução da parte laboratorial deste trabalho.

Ao **Júlio César Souza de Matta**, técnico em prótese da FORP, pela sua prontidão em ajudar independente do tempo, pelo carinho de sua receptividade, pelas suas ideias fabulosas poderem ter contribuído para o desenvolvimento de trabalhos meus.

Às secretárias de Pós-Graduação e do Departamento de Materiais Dentários e Prótese: **Regiane Cristina Moi Sacilotto, Isabel Cristina Galino Sola, Regiane de Cássia Tirado Damasceno, Fernanda Talita de Freitas, Ana Paula Xavier**; pelos seus direcionamentos, esclarecimentos, disponibilidade e paciência no processo do curso do doutorado.

Aos funcionários do LIPEN, **Edson Volta e Ricardo de Souza Antunes**, pela disponibilidade e colaboração.

Ao Professor de Fotografia da USP de Ribeirão Preto, **Carlos de Araújo Arantes** e aos **alunos fotógrafos**, por me fazerem enxergar sobre outro ângulo a arte da foto, a qual contribuiu para registrar e figurar a metodologia e os resultados dessa pesquisa.

À minha tia **Juliana do Nascimento Ferraz**, que em todos os momentos me deu palavras estimuladoras, esteve tão presente mesmo morando tão longe. Que exerceu papel de uma madrinha, de uma amiga, de uma confidente.

Às minhas **grandes amigas de Ribeirão Preto**, as que considero meus presentes, pois me permitiram viver momentos de descontração, me deram sempre força para continuar e vencer cada obstáculo, e puderam completar a ausência da minha família.

*À **família Frota**, minha segunda família, que me recebeu sempre de braços abertos, me deu o carinho que eu precisava e sempre foi tão cuidadosa comigo. A todos vocês, de um tamanho de coração imensurável, devo minha eterna gratidão.*

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

Meu eterno agradecimento.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Oliscovicz, N.F. **Tratamento de superfície para dispositivos de Implantodontia com antimicrobiano nanoparticulado**. 2014. 196 pag. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

Os altos índices de sucesso dos implantes dentais e sua indicação crescente apresentam como limitação a contaminação bacteriana com a consequente doença peri-implantar. Os métodos de tratamento ainda não se apresentam claros e seguros, portanto, meios de prevenção que impeçam a formação de biofilme e inibam o crescimento bacteriano devem ser desenvolvidos e aplicados para impedir a falha dos implantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade de um novo antimicrobiano nanoparticulado – o vanadato de prata (AgNO_3) em diferentes concentrações (2,5%; 5% e 10%), aplicado sob a forma de filme superficial sobre diferentes substratos sugeridos para dispositivos da Implantodontia. Foram selecionados os materiais poliacetal, teflon e resina acrílica e os veículos glaze e esmalte para a aplicação do nanocomposto. Análises das propriedades físicas rugosidade superficial e dureza Rockwell superficial, assim como imagens obtidas por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foram utilizadas para avaliar a resistência e alterações estruturais dos grupos e portanto, a viabilidade de aplicação clínica. A análise pelo método microbiológico do halo de inibição mostrou que as bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus* tiveram inibição de crescimento; enquanto nas bactérias anaeróbias *P. gingivalis* e *P. intermedia* e na levedura *C. albicans* não foi demonstrada a atividade antibacteriana de AgNO_3 . O tipo de substrato utilizado e de veículo para a aplicação de AgNO_3 não influenciaram nos resultados, com exceção do *S. aureus* que obteve maior diâmetro do halo de inibição quando aplicado com o glaze em comparação ao esmalte ($p < 0,05$). A proporção do nanocomposto mostrou influência nos resultados, sendo que 10% se mostrou a mais eficaz em todas as bactérias, e de modo geral sem diferença estatística com a proporção de 5% ($p < 0,05$). Apesar de proporções menores algumas vezes não mostrarem atividade antimicrobiana, estas provocaram menor alteração nas propriedades físicas dos materiais, sendo a proporção do AgNO_3 proporcional ao aumento da rugosidade e dureza superficial. Os substratos e tipo de filme não influenciaram nos resultados da rugosidade superficial após a aplicação do tratamento superficial ($p > 0,05$), entretanto a aplicação de 10% do nanocomposto causou a alteração superficial mais significativa ($7,02 \pm 2,99 \text{ Ra}$) ($p < 0,05$). Na dureza superficial não foi encontrada alteração significativa com o aumento da concentração do AgNO_3 no poliacetal e na resina acrílica ($p > 0,05$), no entanto no teflon, 10% de AgNO_3 não alterou significativamente os valores de resistência. Apesar dos filmes não influenciarem nos resultados, o substrato poliacetal demonstrou maior dureza com diferença estatística com os demais substratos ($83,0 \pm 10,2 \text{ HR15Y}_{\text{adaptado}}$) ($p < 0,05$). As imagens obtidas no MEV comprovaram mudanças estruturais superficiais com a presença de mais picos e vales, em comparação a superfícies sem o tratamento antimicrobiano. Como conclusão, apesar de 10% ser a concentração do AgNO_3 que atingiu um maior número de espécies, essa concentração deve ser ponderada sobre o seu uso, e avaliada em estudos futuros sobre a sua viabilidade de uso clínico em função das alterações nas propriedades físicas.

Palavras-chave: Peri-implantite; Nanopartículas; Vanadato de prata; Atividade antimicrobiana; Implantodontia.

ABSTRACT

Oliscovicz, N.F. **Surface treatment for implant devices with nanoparticulate antimicrobial.** 2014. 196 pag. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.2014

The high success rate of dental implants and their growing indications show the limitation of bacterial contamination with consequent peri-implant disease. The treatment methods have not yet clear and secure, thus means for preventing the deposition of biofilm and inhibit bacterial growth must be developed and implemented to prevent failure of implants. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of a new nanoparticulate antimicrobial - vanadate silver (AgNO_3) in different concentrations (2.5%, 5% and 10%), applied as a surface film on different substrates suggested for devices of Implantology. The materials polyacetal teflon and acrylic resin and vehicles enamel / glaze were selected for the application of nanocomposite. Analyzes of the physical properties superficial roughness and superficial hardness Rockwell, as well as images obtained by scanning electron microscopy (SEM) were used to assess the strength and structural changes of the groups and therefore the feasibility of clinical application. A microbiological method for the analysis of inhibition zone shows growth inhibition on the bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* and *S. aureus*; while the anaerobic bacteria *P. gingivalis* and *P. intermedia* and the yeast *C. albicans* has not been demonstrated antibacterial activity of AgNO_3 . The type of substrate used and the vehicle for the application of AgNO_3 did not influence the results, with the exception of *S. aureus* with highest diameter of inhibition zone when applied with glaze compared to enamel ($p < 0.05$). The proportion of the nanocomposite showed influence on the results, 10% proved the most effective in all bacteria, and generally no statistical difference in the proportion of 5% ($p < 0.05$). Although smaller proportions sometimes do not show antimicrobial activity, these caused minor change in the physical properties of materials. The ratio of AgNO_3 was proportional to the increase of roughness and hardness. The substrates and film type did not influence the results of the surface roughness after applying the surface treatment ($p > 0.05$), however the application of 10% of the nanocomposite caused surface alteration more significant ($7.02 \pm 2.99 \text{ Ra}$) ($p < 0.05$). In hardness was not found to significantly change with concentration of AgNO_3 in the acrylic resin and the polyacetal ($p > 0.05$). However in teflon, 10% AgNO_3 did not significantly alter the resistance values. Although the films do not influence the results, polyacetal substrate showed higher hardness with statistical difference with the other substrates ($83.0 \pm 10.2 \text{ HR15Y}_{\text{adaptado}}$) ($p < 0.05$). The SEM images proved superficial structural changes with the presence of more peaks and valleys compared to surfaces without antimicrobial treatment. In conclusion, despite 10% being the concentration of AgNO_3 that reached the highest number of species, this concentration should be thought on its use, and evaluated in future studies on the feasibility of clinical use in accordance with changes in physical properties.

Keywords: Peri-implantitis; Nanoparticles; Silver vanadate; Antimicrobial activity; Implantology.

LISTA DE FIGURAS

	p
Figura 1 - Glaze para resina.....	71
Figura 2 - Esmalte incolor.....	71
Figura 3 - Resina acrílica autopolimerizável.....	72
Figura 4 - Balança de precisão e pote de medição.....	72
Figura 5 - Pipeta e pipetador usados para medir o líquido da resina acrílica.....	73
Figura 6 - Cilindro de PVC.....	73
Figura 7 - Silicone de condensação com catalisador.....	73
Figura 8 - Pontas de borracha e pêlo de cabra.....	74
Figura 9 - Pipetador com ponteira.....	74
Figura 10 - Rugosímetro: unidade precursora de leitura.....	78
Figura 11 - Rugosímetro: unidade programadora de controle e registro de leitura.....	78
Figura 12 - Mesa com papel demarcador de posicionamento da amostra.....	78
Figura 13 - Durômetro tipo Testor HT1.....	79
Figura 14 - Corpos de prova em poliacetal.....	81
Figura 15 - Corpos de prova em teflon.....	82
Figura 16A, 16B - Moldagem dos corpos de provas de teflon.....	83
Figura 16C - Molde dos corpos de provas de teflon.....	83
Figura 17A - Corpos de prova em resina acrílica autopolimerizável.....	84
Figura 17B - Demarcação de superfície dos corpos de prova.....	84
Figura 18 - Agitação magnética do NH_4VO_3 e AgNO_3	85
Figura 19A, 19B - Adição de AgNO_3 à NH_4VO_3	85
Figura 20A - Processo de filtragem para obtenção do vanadato de prata.....	86
Figura 20B - Processo de lavagem para obtenção do vanadato de prata.....	86
Figura 20C - Processo de secagem para obtenção do vanadato de prata.....	86
Figura 21 - Vanadato de prata sintetizado.....	86
Figura 22 - Pesagem do vanadato de prata.....	88

Figura 23 - Vanadato de prata incorporado ao glaze.....	88
Figura 24A, 24B - Transferência de inóculo microbiano com meio de cultura e cultura recente para tubo de ensaio.....	90
Figura 25 - Homogeneização do tubo de ensaio (150x25mm) com inóculo microbiano.....	90
Figura 26A - Inóculo microbiano sendo transferido para cubeta de quartzo.....	91
Figura 26B - Leitura de absorbância (0,090 / $\lambda=625\text{nm}$) realizada com auxílio de espectrofotômetro.....	91
Figura 27A, 27B - Transferência do inóculo microbiano padronizado para superfície da placa de Petri (140x15mm) com meio de cultura.....	92
Figura 27C - Remoção do excesso do inóculo microbiano do meio de cultura.....	92
Figura 28 - Mapa de posicionamento dos corpos de prova.....	93
Figura 29 - Posicionamento dos corpos de prova sobre o meio de cultura.....	93
Figura 30 - Placa de Petri preparada para incubação.....	94
Figura 31 - Rugosímetro fixado a haste vertical presa à base de granito.....	95
Figura 32 - Agulha do rugosímetro encostada no corpo de prova.....	96
Figura 33A,33B,33C - Leitura da rugosidade superficial do corpo de prova em três eixos.....	96
Figura 34A - Ensaio de dureza superficial.....	98
Figura 34B - Aplicação de pré-carga para o ensaio de dureza.....	98
Figura 35 - Microscópio Eletrônico de Varredura EVO® MA 10.....	99
Figura 36A – Suporte para corpos de prova do MEV.....	100
Figura 36B - Suporte com corpos de prova para análise no MEV.....	100
Figura 36C - Suportes colocados em base metálica no MEV.....	100
Figura 36D - Base metálica acoplada ao MEV.....	100
Figura 37 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>P. gingivalis</i>	103
Figura 38 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>P.intermedia</i>	103
Figura 39 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>P. aeruginosa</i>	104
Figura 40 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>E. coli</i>	107

Figura 41 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>S. mutans</i>	111
Figura 42 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>E. faecalis</i>	111
Figura 43 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>S. aureus</i>	115
Figura 44 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de <i>C.albicans</i>	118
Figura 45 - Superfície de poliacetal sem aplicação de filme superficial.....	130
Figura 46A - Superfície de poliacetal com glaze incorporado com AgVO_3 (0%).....	130
Figura 46B - Superfície de poliacetal com glaze incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	130
Figura 46C - Superfície de poliacetal com glaze incorporado com AgVO_3 (5%).....	130
Figura 46D - Superfície de poliacetal com glaze incorporado com AgVO_3 (10%).....	130
Figura 47A - Superfície de poliacetal com esmalte incorporado com AgVO_3 (0%).....	131
Figura 47B - Superfície de poliacetal com esmalte incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	131
Figura 47C - Superfície de poliacetal com esmalte incorporado com AgVO_3 (5%).....	131
Figura 47D - Superfície de poliacetal com esmalte incorporado com AgVO_3 (10%).....	131
Figura 48 - Superfície de teflon sem aplicação de filme superficial.....	131
Figura 49A - Superfície de teflon com glaze incorporado com AgVO_3 (0%).....	132
Figura 49B - Superfície de teflon com glaze incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	132
Figura 49C - Superfície de teflon com glaze incorporado com AgVO_3 (5%).....	132
Figura 49D - Superfície de teflon com glaze incorporado com AgVO_3 (10%).....	132
Figura 50A - Superfície de teflon com esmalte incorporado com AgVO_3 (0%).....	132
Figura 50B - Superfície de teflon com esmalte incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	132
Figura 50C - Superfície de teflon com esmalte incorporado com AgVO_3 (5%).....	132
Figura 50D - Superfície de teflon com esmalte incorporado com AgVO_3 (10%).....	132
Figura 51 - Superfície de resina acrílica sem aplicação de filme superficial.....	133
Figura 52A - Superfície de resina acrílica com glaze incorporado com AgVO_3 (0%).....	133
Figura 52B - Superfície de resina acrílica com glaze incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	133

Figura 52C - Superfície de resina acrílica com glaze incorporado com AgVO_3 (5%).....	133
Figura 52D - Superfície de resina acrílica com glaze incorporado com AgVO_3 (10%).....	133
Figura 53A - Superfície de resina acrílica com esmalte incorporado com AgVO_3 (0%).....	134
Figura 53B - Superfície de resina acrílica com esmalte incorporado com AgVO_3 (2,5%).....	134
Figura 53C - Superfície de resina acrílica com esmalte incorporado com AgVO_3 (5%).....	134
Figura 53D - Superfície de resina acrílica com esmalte incorporado com AgVO_3 (10%).....	134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Materiais utilizados divididos em grupos conforme o tipo de tratamento de superfície e concentração do vanadato de prata.....	71
Quadro 2 - Micro organismos padrão utilizados nos experimentos microbiológicos.....	77
Quadro 3 - Meios de cultura e incubação empregados para cada tipo de micro organismo padrão.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o substrato com AgVO_3	105
Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos.....	105
Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>P. aeruginosa</i> de acordo com a concentração de AgVO_3	106
Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. coli</i> de acordo com o substrato com AgVO_3	108
Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. coli</i> de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos.....	109
Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. coli</i> de acordo com a concentração de AgVO_3	110
Tabela 7 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. faecalis</i> de acordo com o substrato com AgVO_3	112
Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. faecalis</i> de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos.....	113
Tabela 9 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>E. faecalis</i> de acordo com a concentração de AgVO_3	114
Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>S. aureus</i> de acordo com o substrato com AgVO_3	115
Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>S. aureus</i> de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos.....	116
Tabela 12 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da <i>S. aureus</i> de acordo com a concentração de AgVO_3	117
Tabela 13 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (R_a) de acordo com a substrato com AgVO_3	119
Tabela 14 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (R_a) de acordo com o tipo de veículo para tratamento superficial nos substratos.....	120
Tabela 15 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (R_a) de acordo com a concentração de AgVO_3	121
Tabela 16 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (R_a) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada substrato.....	122

Tabela 17 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada tipo de tratamento superficial.....	123
Tabela 18 - Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com o substrato com aplicação de AgVO_3	124
Tabela 19 - Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos.....	125
Tabela 20 - Valores médios e desvios-padrão da dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com a concentração de AgVO_3	126
Tabela 21 - Valores médios e desvio-padrão da dureza Rockwell superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada substrato.....	128
Tabela 22 - Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada tipo de tratamento superficial.....	129

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>P. aeruginosa</i> nos substratos com AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	105
Gráfico 2 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>P. aeruginosa</i> nos filmes glaze e esmalte com aplicação de AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	106
Gráfico 3 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>P. aeruginosa</i> nas diferentes proporções de AgVO ₃	107
Gráfico 4 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E.coli</i> nos substratos com AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	108
Gráfico 5 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E. coli</i> nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	109
Gráfico 6 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E. coli</i> nas diferentes proporções de AgVO ₃	110
Gráfico 7 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E.faecalis</i> nos substratos com AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	112
Gráfico 8 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E. faecalis</i> nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	113
Gráfico 9 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>E. faecalis</i> nas diferentes proporções de AgVO ₃	114
Gráfico 10 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>S.aureus</i> nos substratos com AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	115
Gráfico 11 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>S. aureus</i> nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO ₃ em diferentes concentrações.....	116
Gráfico 12 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da <i>S. aureus</i> nas diferentes proporções de AgVO ₃	117
Gráfico 13 - Rugosidade superficial (Ra) dos substratos poliacetal, teflon e resina acrílica.....	119
Gráfico 14 – Rugosidade superficial (Ra) dos filmes aplicados com AgVO ₃ e com ausência de filme.....	120
Gráfico 15 - Rugosidade superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO ₃	121
Gráfico 16 – Rugosidade Superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO ₃ em cada substrato.....	123

Gráfico 17 – Rugosidade Superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO_3 em cada tipo de tratamento superficial.....	124
Gráfico 18 – Dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) dos substratos poliacetal, teflon e resina acrílica.....	125
Gráfico 19 – Dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) dos filmes aplicados com vanadato de prata e com ausência de filme.....	126
Gráfico 20 – Dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) das diferentes concentrações de AgVO_3	127
Gráfico 21 – Dureza Rockwell Superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) das diferentes concentrações de AgVO_3 em cada substrato.....	128
Gráfico 22 – Dureza Rockwell Superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) das diferentes concentrações de AgVO_3 em cada tipo de filme aplicado.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SINONÍMIAS

AgNPs	Nanopartículas de prata
IgA	Imuglobina A
<i>spp</i>	species
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
<i>Design</i>	Desenho, modelo, configuração
DNA	ácido desoxirribonucleico, em inglês
ATP	Trifosfato de adenosina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMMA	poli-metil metacrilato
ISO	International Organization for Standardization
HA	hidroxiapatita
NPs	nanopartículas
<i>MRSA</i>	<i>Stafilococcus aureus</i> resistentes a metilicina
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
Ltda	Limitada
S.A.	Sociedade Anônima
PVC	policloreto de vinila
ATCC	<i>American Type Culture Collection.</i>
USP	Universidade de São Paulo
NEPECISS	Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde
ABNT I	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EHT	<i>Electron High Tension</i> , em inglês
<i>Abutment</i>	Pilar de fixação de próteses para implantes
TPS	Terapia Peridodonta de Suporte

LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta\text{-AgVO}_3$	Nanofios de vanadato de prata
AgVO_3	Vanadato de prata
mm	Milímetro
%	Porcentagem
Ag	Prata
nm	nanómetro
AgBr	Brometo de prata
© / ®	Copyright / Marca registrada
mL	Mililitro
μl	Microlitro
g	grama
NH_4VO_3	Metavanadato de amônio
AgNO_3	Nitrato de prata
°C	graus Celsius
mg	miligrama
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
Ra	Rugosidade média
mN	mili Newton
s	segundo
°	grau
™	<i>trademark</i> , em inglês
“	polegada
Kg	Kilograma
kV	Kilovolt
p	nível de significância
m/v	relação massa/volume
Ca	Cálcio
PO_4	Fosfato

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	35
2 REVISÃO DA LITERATURA	40
2.1 Biofilme Oral	40
2.1.1 Formação e Características do Biofilme na Cavidade Oral	40
2.1.2 Biofilme Oral e os Implantes Dentários	42
2.2 Doenças Inflamatórias Peri-implantares	44
2.2.1 Índices da Mucosite e Peri-Implatite	44
2.2.2 Mecanismo e propriedades da doença peri-implantar	45
2.2.3 Peri-implantite x Periodontite	47
2.3 Doença Peri-implantar: Tratamento x Prevenção	49
2.4 Cicatrizadores e outros Componentes Protéticos sobre Implantes x Doença Peri-implantar	52
2.5 Antimicrobianos para a peri-implantite	54
2.5.1 A Prata (Ag) como Antimicrobiano	55
2.5.2 Nanomateriais como antimicrobianos	56
2.5.3 Nanopartículas de prata	58
2.6 Nanopartículas de prata na odontologia	60
2.7 Vanadato de prata como antimicrobiano	64
3 PROPOSIÇÃO	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 MATERIAL	70
4.1.1 Corpos de Prova	70
4.1.1.1 Substratos de composição dos corpos de provas	70
4.1.1.2 Filme veículo para o nanocomposto antimicrobiano	70

4.1.1.3 Nanocomposto antimicrobiano.....	71
4.1.1.4 Equipamentos, instrumental e material de consumo.....	72
4.1.2 Placas de cultura celular.....	74
4.1.2.1 Equipamentos.....	74
4.1.2.2 Materiais, Vidrarias e Reagentes.....	75
4.1.2.3 Micro organismos padrão.....	76
4.1.2.4 Meios de cultura.....	77
4.1.3 Materiais e Equipamentos utilizados para análise da Rugosidade Superficial.....	77
4.1.4 Equipamentos utilizados para análise da Dureza Superficial.....	79
4.1.5 Equipamentos utilizados para análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	79
4.2 MÉTODOS.....	80
4.2.1 Confeções dos corpos de prova.....	80
4.2.1.1 Confeção dos corpos de prova em poliacetal.....	81
4.2.1.2 Confeção dos corpos de prova em politetrafluoretileno (Teflon®).....	82
4.2.1.3 Confeção dos corpos de prova em resina acrílica.....	82
4.2.2 Preparo do composto nanoestruturado vanadato de prata.....	84
4.2.3 Tratamento de superfície dos corpos de prova.....	87
4.2.4 Análise microbiológica por halo de inibição de crescimento microbiano.....	88
4.2.4.1 Local do estudo.....	88
4.2.4.2 Padronização do inóculo microbiano.....	89
4.2.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	91
4.2.5 Análise das propriedades físicas.....	94
4.2.5.1 Análise da Rugosidade Superficial.....	95
4.2.5.2 Análise da Dureza Superficial.....	97
4.2.6 Forma de Análise dos Resultados.....	98

4.2.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	98
5	RESULTADOS.....	102
5.1	Análises Micribiológicas.....	102
5.1.1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	102
5.1.2	<i>Prevotella intermedia</i>	103
5.1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
5.1.4	<i>Escherichia coli</i>	107
5.1.5	<i>Streptococcus mutans</i>	110
5.1.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	111
5.1.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	114
5.1.8	<i>Candida albicans</i>	117
5.2	Rugosidade Superficial.....	119
5.3	Dureza Rockell Superficial.....	124
5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	129
6	DISCUSSÃO.....	136
7	CONCLUSÃO.....	179
8	REFERÊNCIAS	182

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação oral de pacientes com dentes ausentes beneficiou-se de forma considerável com a utilização de implantes osseointegráveis para suporte e retenção de próteses dentais; possibilitando que essa modalidade de tratamento se tornasse uma das mais indicadas e com altos índices de sucesso clínico (Lekholm et al., 2006; Astrand et al., 2008; Kim et al., 2008; Heitz-Mayfield et al., 2014; Salvi & Zitzmann, 2014).

Entretanto, um desafio preocupante para a longevidade dos implantes é a deposição de biofilme - a contaminação bacteriana na interface osso/implante/coróa; pelas suas sérias consequências como processos inflamatórios e até a perda óssea peri-implantar (Berglundh et al., 2002; Renvert et al., 2007; Alsaadi et al., 2008a, 2008b; Lindhe & Meyle, 2008; Busscher et al., 2010; Galassi et al., 2012). A formação de biofilme ocorre em quase todas as superfícies expostas ao meio oral natural, inclusive nos biomateriais utilizados para restabelecimento da função da cavidade oral, como os implantes dentais (Busscher et al., 2010).

O controle do biofilme bacteriano é essencial para a saúde dos tecidos marginais ao implante, que preservados por meio de uma manutenção preventiva, dificulta a ocorrência de complicações biológicas no implante, como a instalação das doenças mucosite perimplantar ou peri-implantite, caracterizada pela perda de tecido ósseo de suporte (Zitzmann & Berglundh, 2008; Lang & Berglundh, 2011; Graziani et al., 2012).

Apesar do simples diagnóstico e da sugestão de diversos métodos para impedir o avanço da contaminação bacteriana e instalação de doença peri-implantar;

ainda não existe nenhuma evidência a longo prazo de uma forma de tratamento previsível, ou a demonstração de um método ideal de descontaminação da superfície do implante que possa ser utilizado sem intervenções cirúrgicas, o que limita o tratamento da peri-implantite a apenas cirurgias de ressecção (Romeo et al., 2007; Salvi & Zitzmann, 2014; de Waal et al., 2014).

Muitos questionamentos de como a bactéria atinge o tecido peri-implantar têm dificultado o entendimento da fisiopatologia da doença e portanto, da terapia melhor indicada para esta contaminação. Apesar de serem usados protocolos anti-infecção comparáveis aos para tratamento da periodontite, devido à semelhança dos patógenos (Lang et al., 2000, Heitz-Mayfield & Lang, 2010); existem poucos estudos que comprovem a eficácia desse tratamento na peri-implantite (Claffey et al., 2008; Lindhe & Meyle, 2008; Sahrmann et al., 2009; de Waal et al., 2014).

Reestabelecer o equilíbrio parasitário para erradicar a doença é um desafio, portanto, meios preventivos para evitar que a infecção peri-implantar se instale devem ser mais pesquisados. A Implantodontia carece de publicações que abordem essa temática, e a baixa qualidade da evidência científica limita a aplicabilidade de intervenções preventivas e terapêuticas (Renvert et al., 2008). Portanto, existe um crescente interesse em desenvolver novos materiais dentários que atraiam menos colonização bacteriana e formação de biofilme ou que, como meio alternativo, liberem compostos antimicrobianos (Busscher et al., 2010; de Waal et al., 2014).

Os compostos à base de prata são importantes materiais para a ciência devido aos seus agentes antimicrobianos (Sambhy et al., 2006; Kenawy et al., 2007; Dellasega et al., 2008). Sua maior aplicação na biomedicina ocorreu sobretudo ao desempenho biocida obtido com nanomateriais à base de prata (Duran et al., 2007;

Kumar et al., 2008; Kwakye-Awuah et al., 2008; Cheng et al., 2012; Holtz et al., 2012; Niakan et al., 2013). A redução das partículas a tamanhos nanométricos, aumentando a relação superfície/volume, torna íntima a interação com membranas microbianas (Morones et al., 2005). Dessa forma, aumenta eficácia contra as bactérias, vírus e outros micro-organismos eucarióticos, mesmo em baixas concentrações, e sem efeitos secundários (Jeong et al., 2005).

Entretanto, a incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) em alguns materiais, apesar de designadas como compostos não tóxicos para o organismo humano; pode alterar outras propriedades como a dureza, área de superfície ativa, reatividade química, e atividade biológica (Allaker and Ren, 2008). Assim, o metal e outras nanopartículas estão sendo combinadas com polímeros, ou estes recebem um tratamento de superfície que permite diversas aplicações de potencial antimicrobiano, como dentro da cavidade oral (Monteiro et al., 2009; Rizzello & Pompa, 2014).

Apesar dos relatos da utilização dos nanocompostos de prata nas bases de prótese total, a literatura ainda é escassa de estudos abordando esse tema na odontologia e com relação à sua estabilidade antimicrobiana (Casemiro et al., 2008; Niakan et al., 2013). Embora existam muitas vantagens, as aplicações práticas das nanopartículas de prata como agentes antibacterianos geralmente são limitadas, devido à dificuldade de se obter livres estabilizadores (Balan et al., 2007). Materiais nanoestruturados com elevada dispersão de nanopartículas de prata, como o vanadato de prata (β -AgVO₃), são sugeridos (Holtz et al., 2010); por serem livres de agentes de estabilização, melhorando o potencial antibacteriano (Li et al., 2008; Liu et al., 2006). Além disso, apresentam alta estabilidade, e suas propriedades como composição,

tamanho, forma do cristal, estrutura e as propriedades da superfície podem ser aprimorados pelos laboratórios químicos (Holtz et al., 2010).

Com o intuito de definir a preventiva adequada baseada em evidência científica (Graziani et al., 2012); este estudo sugere uma alternativa inovadora para o impedimento da peri-implantite, cuja as alternativas de tratamento ainda são obscuras; e os estudos na literatura sobre os métodos de prevenção para os problemas que podem decorrer dessa colonização ainda são escassos (Anner et al., 2010; Heitz-Mayfield et al., 2014). Acreditando que a utilização de materiais indicados para componentes na Implantodontia, sobretudo nas fases iniciais de cicatrização, com uma película superficial de vanadato de prata; sugere como hipótese que possam ser efetivos como antimicrobianos e preventivos da doença peri-implantar deu-se início à este trabalho.

2 REVISTA DA LITERATURA

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 Biofilme Oral

2.1.1 Formação e Características do Biofilme na Cavidade Oral

Os biofilmes se designam como comunidades polimicrobianas (Di Giulio et al., 2013) compostas por bactérias e leveduras que ocorrem em quase todas as superfícies expostas ao ambiente natural (Moons et al., 2009); como superfície de dentes, mucosa e próteses. O seu acúmulo pode causar diversas infecções na cavidade oral, sendo não só a principal causa da cárie e doença periodontal (Sbordone & Bortolaia, 2003), presente em tecidos dentários e no periodonto; mas também em biomateriais utilizados para restabelecimento da função da cavidade oral, como aparelhos ortodônticos e implantes dentais (Busscher et al., 2010).

A formação de uma camada de película adquirida na superfície exposta ao meio intra-oral, derivada de proteínas salivares/ peptídeos e de restos alimentares; permite a colonização bacteriana inicial e sua sequência posterior (Marsh e Bradshaw, 1995 *apud* Allaker, 2010; Busscher et al. 2010, Di Giulio et al., 2013). As propriedades físico-químicas da superfície determinarão a capacidade de adesão dos micro-organismos, e a sobrevivência destas espécies dependerá da possibilidade de evolução para biofilme (Hannig & Hannig, 2009).

A retenção do biofilme sobre os materiais dentários depende de suas propriedades que estão associadas às interações com os fluidos orais, micro-organismos e superfícies dentais, como a rugosidade e energia livre de superfície; e

sobretudo, de alguns componentes antibacterianos presentes na camada de película adquirida tais como IgA secretoras e lisozimas (Hannig e Hannig, 2009).

Entretanto, as películas formadas nas superfícies também possuem algumas proteínas com receptores para bactérias específicas, sendo responsáveis pela adesão destas (Hannig e Joiner, 2006 *apud* Allaker, 2010). O desenvolvimento precoce do biofilme, sua permanência e subsequente crescimento é dependente de forças envolvidas nessas ligações iniciais com as bactérias (Di Giulio et al., 2013), o que também determinará a eficiência dos antimicrobianos (Busscher e Weerkamp, 1987 *apud* Allaker et al. 2010). As mesmas bactérias no biofilme maduro são responsáveis pela produção de substâncias poliméricas extracelulares compostas por grandes quantidades de proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios; que proporcionam uma matriz ideal para o crescimento e sobrevivência do biofilme bacteriano e a integridade estrutural do biofilme, que por seguinte, terá seu crescimento por meio da divisão celular bacteriana (Sutherland, 2001; Kolenbrander et al., 2006).

A placa dental madura supragengival e subgengival apresenta uma maior variedade de espécies de micro-organismos em comparação ao biofilme em fase inicial de desenvolvimento, composto por bactérias como o *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, e *Streptococcus mitis*. O biofilme maduro compreende além dessas, outras bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, e *Porphyromonas gingivalis* (Kolenbrander et al., 2006).

2.1.2 Biofilme Oral e os Implantes Dentários

A utilização de implantes osseointegráveis para a reabilitação oral de pacientes desdentados apresenta ampla indicação e índices de sucesso clínicos bem estabelecidos (Heitz-Mayfield et al., 2014), devido às vantagens tais como a possibilidade de reabilitações menos complexas, maior conservação dos dentes remanescentes, maior tempo de sucesso clínico, facilidade de higienização e manutenção de tecidos saudáveis (Lekholm et al., 2006; Astrand et al., 2008; Kim et al., 2008; Esposito et al., 2012).

No entanto, um desafio preocupante para a longevidade dos implantes é a infecção local causada por uma microbiota específica na interface osso/implante/prótese, devido às suas sérias consequências (Berglundh et al., 2002; Renvert et al., 2007; Alsaadi et al., 2008a; 2008b; Lindhe e Meyle, 2008, Busscher et al., 2010, Esposito et al., 2012, Galassi et al., 2012; Heitz-Mayfield et al., 2014).

A função e estética desejada com as reabilitações implanto-suportadas e, portanto seu sucesso; é dependente do estável relacionamento com a crista óssea subjacente e a mucosa adjacente (Nevins et al., 2012a). Uma reabsorção da crista óssea de 0,5 a 2,0 mm é comum durante o primeiro ano após a instalação do pilar protético, sendo gradativa com aproximadamente 0,1 mm/ano; o que compromete o posicionamento estável dos tecidos moles que a recobrem (Hermann et al., 2001; Nevins et al., 201b).

Perante os fatores de agressão liberados pela placa bacteriana, é essencial a formação de um epitélio juncional com aproximadamente 2 mm de altura e um tecido conjuntivo de no mínimo 1 mm de altura, como proteção a zona de osseointegração

(Sawase et al., 2000). Assim, o sucesso dos implantes depende essencialmente da barreira de tecido mole formada adjacente ao implante (Lindhe e Berglundh, 1997 *apud* Sawase, et al., 2000).

Componentes protéticos implantares de transição são biomateriais, portanto sua topografia da superfície e composição química influenciam a manutenção dos tecidos moles peri-implantares e a adesão bacteriana. Diversos projetos de componentes têm sido desenvolvidos com o intuito de reduzir os danos irreparáveis que ocorrem nos tecidos adjacentes ao implante (Nevins et al., 2012b). A fim de impedir a migração apical do epitélio juncional e, dessa forma, a reabsorção da crista óssea e a infiltração bacteriana; Nevins et al. (2008) sugeriu por meio de um estudo clínico a utilização de sulcos em abutments de cicatrização; que demonstrou a formação de fibras de tecido conjuntivo perpendiculares conectadas ao sulco confeccionado (Nevins et al. 2008, 2012a, 2012b).

Apesar dos avanços no design do implante, o controle do biofilme bacteriano é essencial para a saúde dos tecidos peri-implantares, que preservados por meio de uma manutenção preventiva, permite a ocorrência e que se mantenha a osseointegração (Leonhardt et al., 2002; Ross-Jansaker et al., 2006a; Aglietta et al., 2011, Simonis et al., 2010; Esposito et al., 2012). Ao reduzir a formação e o acúmulo de biofilme nos implantes dentais dificulta-se a resposta inflamatória ao insulto bacteriano, ou seja, a ocorrência de complicações biológicas no implante, como a instalação das doenças inflamatórias peri-implantares (Zitzmann & Berglundh 2008; Casado et al., 2011; Lang & Berglundh 2011).

O acúmulo de placa bacteriana também pode ocorrer em implantes já osseointegrados, com a presença de bactérias como *Streptococos* e *Actinomyces*

spp. Quando o depósito de biofilme evolui para uma peri-implantite, a microbiota passa a ter o predomínio de bactérias gram-negativas a anaeróbias (Allaker e Hardie, 1998 *apud* Allaker et al., 2010).

2.2. Doenças Inflamatórias Peri-implantares

A doença peri-implantar é um processo inflamatório decorrido de uma infecção, a qual pode levar a perda óssea progressiva; portanto, é uma das principais causas do insucesso dos implantes. As infecções podem ser definidas como mucosite peri-implantar - processo reversível nos tecidos moles adjacentes ao implante; ou peri-implantite, caracterizada pela perda de tecido ósseo de suporte (Zitzmann & Berglundh, 2008).

2.2.1 Índices da Mucosite e Peri-Implatite

A prevalência das doenças peri-implantares ainda não apresenta dados absolutos devido à quantidade insuficiente de estudos que apresentem esses valores (Zitzmann & Berglundh, 2008). Além disso, há uma variedade na padronização das metodologias utilizadas para diagnóstico e existem diferentes definições para a doença, o que dificulta a obtenção de conclusões (Koldslund et al., 2010; Costa et al., 2012; Mir-Mari et al., 2012; Heitz-Mayfield et al., 2014).

Os índices de prevalência da mucosite apresentam valores bastante elevados, apresentando-se em 80% dos pacientes (Lindhe & Meyle, 2008) e 50% dos implantes (Lindhe & Meyle, 2008; Zitzmann & Berglundh, 2008). Já os dados da

peri-implantite, que se apresentavam relativamente baixos (5 a 10% dos pacientes) (Mombelli & Lang, 1998); em estudos mais recentes demonstraram 16% (Roos-Jansaker et al, 2006a) à 28% dos pacientes com implantes instalados a mais de 5 – 10 anos (Fransson et al., 2005); e taxas de 28 à 56% segundo o sexto Workshop Europeu em Periodontia realizado em 2008 (Lindhe & Meyle, 2008). Desde 2008, as pesquisas têm apontado valores que se encontram aproximados destes índices, sendo encontrado 47% dos pacientes em estudo realizado na Noruega (Koldsland et al., 2010) e 56% na Suécia (Zitzmann & Berglundh 2008); ou índices de 2 entre cada 5 implantes (Fransson et al. 2009). No Brasil, o estudo clínico de Ferreira et al. (2006) que avaliou 212 pacientes apontou valores de 64,6% para a mucosite e 8,9% para a peri-implantite.

Essa discrepância dos valores se justifica pela diferença de população estudada (Galassi et al., 2012) e pelos diagnósticos mais deficientes no passado, onde se tinha pouco conhecimento da etiologia da doença peri-implantar e o enfoque da osseointegração era basicamente clínico, sendo a perda óssea ao redor de implantes atribuída à sobrecarga oclusal (Charalampakis et al., 2012). Assim, diante dos dados numéricos relatados, a infecção bacteriana é considerada uma ameaça para a superfície de implantes.

2.2.2. Mecanismo e propriedades da doença peri-implantar

A definição da instalação da doença peri-implantar, assim como sua progressão e estabilidade, depende da resposta imune local do hospedeiro em relação ao patógeno, mediada pelas células Th1 ou Th2 (Seymour & Gemmel,

2001). O perfil predominante da resposta precoce e estável da inflamação, a resposta imune celular pró-inflamatória, é regulado por Th1. As células Th2 regulam o processo anti-inflamatório (Jankovic et al., 2001) caracterizado pela presença da interleucina IL-1 β , uma citocina produzida por monócitos e macrófagos, fator diagnóstico obtido do fluido ao redor do implante. Neste processo células osteoblásticas e fibroblastos são estimulados pelo Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) a produzirem collagenase e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-11; além de desencadearem a reabsorção óssea, caracterizando a fase aguda de resposta das células a agressão tecidual (Naoum, 2009 *apud* Andrade et. al 2012).

Somado a resposta imune do hospedeiro, a superfície exposta ao biofilme também influencia a progressão da colonização bacteriana e a formação tecidual adjacente ao implante. Segundo alguns estudos, a mucosa queratinizada peri-implantar se assemelha aos tecidos gengivais circundantes aos dentes (Berglundh et al. 1991, 1992 *apud* Abrahamsson et al., 2002), apresentando proporções similares de tecido epitelial e conjuntivo, e de comprimento de epitélio juncional (Abrahamsson et al., 2002). Entretanto, somente a estrutura dentária possui cemento acelular, cujas fibras colágenas periodontais principais projetam-se lateralmente com curso perpendicular à raiz. Nos implantes dentais as fibras supracrestais são paralelas a sua superfície e perpendiculares ao periósteo da crista óssea marginal. Apesar de tais diferenças, estudos demonstraram por pesquisas *in vitro* e *in vivo*, que tanto a orientação das células epiteliais como as conjuntivas, são influenciadas pela topografia da superfície, e as diferenças na mucosa em contato com pilares de implantes está relacionada à rugosidade de sua superfície (Abrahamsson et al., 2002).

2.2.3 Peri-implantite x Periodontite

Estudos indicam que a colonização de micro organismos nos implantes ocorre de forma semelhante aos dentes (Charalampakis et al., 2012; Galassi et al., 2012) com a detecção de bactérias como *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter* spp, *Parvimonas micra* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,; e bactérias menos comumente associadas a periodontite como *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp. (Charalampakis et al., 2012).

A etiopatogenia da doença peri-implantar ainda não está totalmente clara (Charalampakis et al., 2012, Cho-Yan Lee et al. 2012); entretanto, há o conhecimento de que bactérias presentes na peri-implantite são semelhantes às da periodontite (Galassi et al., 2012), provavelmente pela translocação que ocorre de um sítio para o outro (Cho-Yan Lee et al., 2012); e que a microbiota passa a ser tornar mais complexa e com aumento da proporção das bactérias ao longo do tempo (Quirynen et al. 2005).

Assim, a osseointegração não depende apenas da biocompatibilidade do biomaterial, do *design* e superfície do implante, e do planejamento e técnica cirúrgica adequada; mas também das condições biológicas e da saúde da área receptora (Lang & Berglundh, 2011; Cho-Yan Lee et al., 2012). Diversos fatores de risco têm sido relatados como potenciais para gerar a doença peri-implantar, como o baixo índice de higiene bucal, a ausência de terapia periodontal de suporte e, segundo alguns estudos, o histórico de doença periodontal (Mombelli et al., 1995; Jepsen et al., 1996; Tonetti, 1998; Luterbacher et al., 2000; Leonhardt et al., 2002;

Mombelli, 2002; Karoussis et al, 2004, Roos-Jansaker et al., 2006a; Heitz-Mayfield, 2008; Anner et al., 2010; Simonis et al., 2010; Zupnik et al., 2011; Donos et al, 2012).

O estudo de Silva et al. (2007) mostrou uma associação significativa entre a presença da periodontite e a ocorrência da mucosite peri-implantar e da peri-implantite, o que corrobora com os achados de Karoussis et al. (2003) que observaram frequência da peri-implantite quase cinco vezes maior em pacientes com histórico de doença periodontal do que em indivíduos com saúde periodontal. Esses dados ressaltam o papel do biofilme bacteriano na transmissão de patógenos periodontais para o sulco/bolsa peri-implantar (Heitz-Mayfield et al., 2014), onde foi demonstrado um índice de 10 vezes maior possibilidade de desenvolvimento de peri-implantite em pacientes com placa bacteriana e perda dentária por doença periodontal do que em pacientes com ausência da doença (Sumida et al., 2002).

Muitos estudos também relatam que pacientes com comprometimento periodontal têm menor sobrevida de implantes (Brocard et al. 2000, Evian et al. 2004, Roos-Jansaker et al. 2006a, Heitz-Mayfield et al., 2014) e taxas de sucesso (Brocard et al. 2000; Karoussis et al. 2003, Simonis et al. 2010). Os resultados enfatizam a preocupação e o monitoramento que deve ser dado as pacientes que recebem próteses sobre implante, por meio de terapias de suporte periodontal e peri-implantar (Silva et al 2007, Heitz-Mayfield et al., 2014), pois muitas vezes os pacientes que têm indicação de implantes são os que sofreram perda dentária por problemas de doença periodontal (Cho-Yan Lee et al. 2012, Donos et al. 2012).

2.3 Doença Peri-implantar: Tratamento x Prevenção

Apesar das formas de terapia não cirúrgicas mostrarem eficácia no tratamento da mucosite (Renvert et al. 2008); não existe essa evidência na peri-implantite (Lindhe & Meyle, 2008, Heitz-Mayfield et al., 2014), onde o tratamento é considerado limitado (Claffey et al., 2008; Renvert et al., 2009; Sahm et al., 2011; Esposito et al., 2012) e com melhoria dos níveis microbiológicos insignificante em seis meses (Persson et al., 2011). Assim, os métodos de tratamento das doenças peri-implantares ainda se apresentam muito ineficientes, tornando a infecção de caráter crônico, o que torna necessária a remoção do implante e cirurgias ressectivas com a finalidade de se restaurar e remodelar a estrutura periodontal de apoio ao implante (Allaker et al., 2010).

Muitas modalidades de tratamento são sugeridas, como relatado no estudo clínico de Heitz-Mayfield et al. (2012), que mostraram que a peri-implantite moderada a avançada pode ser tratada com protocolos específicos como pré-debridamento cirúrgico e instruções de higiene oral, regeneração óssea guiada com ou sem enxerto ósseo em conjunto com a descontaminação de superfície do implante e da tampa de proteção ou cicatrizador, cirurgia ressectiva com reposicionamento apical de retalho, terapia antimicrobiana sistêmica com amoxicilina e metronidazol, cuidados pós-operatórios como enxaguatórios bucais com manutenção regular, além de elevado padrão de auto-controle de placa. Apesar da sugestão de diversas terapias, em contraste com a doença periodontal, a peri-implantite não pode ser tratada por meios não-cirúrgicos isolados como o debridamento mecânico e ultrassônico, irrigação com desinfetantes locais, terapia

antibiótica sistêmica e aplicação de laser (Renvert et al., 2008); devendo-se utilizar técnicas cirúrgicas, que apresentem bons índices de sucesso como tratamento (Claffey et al., 2008).

Assim, o tratamento da peri-implantite está limitado a cirurgias de ressecção, pois ainda não existe nenhuma evidencia científica que comprove um método efetivo de descontaminação da superfície do implante ou um tratamento previsível, com acompanhamento a longo prazo; apesar da sugestão de diversos métodos para impedir o avanço da infecção bacteriana e instalação de doença peri-implantar (Romeo et al., 2007; Heitz-Mayfield et al., 2014).

As deficiências na compreensão da fisiopatologia da doença, como os questionamentos do meio como a bactéria contamina o tecido peri-implantar; também dificultam a sugestão de uma terapia efetiva. Apesar de serem usados tratamentos antibióticos similares aos usados para o tratamento da periodontite, devido a semelhança da microbiota patogênica (Lang et al., 2000; Heitz-Mayfield & Lang 2010); são escassos os estudos na literatura que comprovem a eficácia desse tratamento na peri-implantite (Claffey et al., 2008, Lindhe & Meyle 2008). Portanto, devido aos desafios associados ao reestabelecimento do equilíbrio parasitário para erradicar a doença, pesquisas científicas devem ser elaboradas no intuito de se definir meios preventivos para evitar que a infecção se instale.

Além disso, ainda que os métodos cirúrgicos sejam efetivos, realizar métodos preventivos, como procedimentos de higiene adequados e controle da progressão da doença; são mais indicados para manutenção da estética. Outra desvantagem da realização de procedimentos cirúrgicos como terapia, é que estes devem ser o mais cedo possível, mais frequentemente que os casos de periodontite (Heitz-Mayfield &

Lang 2010), pois nesse caso a perda óssea é de progressão não linear (Fransson et al., 2010). Portanto, o diagnóstico precoce por meio da observação dos sinais da doença, deve ser periódico; pois os métodos de prevenção que impeçam o desenvolvimento da doença são mais favoráveis.

Entretanto, a Implantodontia carece de publicações nos métodos preventivos da peri-implantite, e as deficiências da evidência científica limitam a aplicabilidade de intervenções preventivas e terapêuticas (Renvert et al., 2008).

Muitos estudos têm se envolvido em questões que abordam a absorção de antimicrobianos no biofilme (Stewart, 2003; Di Giulio et al., 2013), sobretudo quando se trata da cavidade oral, onde muitas vezes a placa bacteriana é encontrada em regiões de difícil acesso para manutenção. Desse modo, esforços têm sido feitos nos métodos para o controle de placa que requerem mínima intervenção pelo profissional de saúde (Wilson, 1996).

Desse modo, além das terapias de suporte para tratamento da doença peri-implantar, a prevenção por meio de avaliação clínica e radiográfica devem ser periodicamente realizadas. Alguns sinais clínicos indicativos de peri-implantite, perda de implante ou falha na osseointegração são monitorados facilmente; como dor, mobilidade do implante horizontal maior que 1 mm e/ou vertical, supuração, e profundidade de bolsa maior que 5 mm (Adell, 1981). Radiograficamente pode ser observada perda óssea da crista alveolar (Lang & Berglundh, 2011) superior a 1/3 da altura do implante ou radiolucidez generalizada (Heitz-Mayfield 2008).

Somada a higiene oral adequada realizada pelo paciente como método preventivo e a manutenção e profilaxia periódicas em consultório odontológico, qualquer tipo de procedimento realizado nas fases iniciais de formação óssea

adjacente ao implante, deve permitir e manter o ambiente microbiótico peri-implantar favorável. Desse modo, existe um crescente interesse em desenvolver novos materiais dentários que atraiam uma menor colonização bacteriana e formação de biofilme ou que, como meio alternativo, liberem compostos antimicrobianos (Busscher et al. 2010; Di Giulio et al., 2013) para que possam preencher as lacunas oferecidas pelas limitações do tratamento e do risco eminente de contaminação bacteriana. Estes materiais também devem apresentar desempenho mecânico e propriedades físicas satisfatórias para viabilidade de aplicação clínica.

2.4 Cicatrizadores e outros Componentes Protéticos sobre Implantes x Doença Peri-implantar

Os cicatrizadores de implantes são componentes protéticos que têm papel crucial na primeira fase de manutenção óssea após a instalação do implante, por serem o primeiro contato com o meio oral supra-ósseo e toda sua microbiota patogênica envolvida. A falta de cuidados para reduzir a atração de biofilme bacteriano durante a cicatrização tecidual peri-implantar é fator para o insucesso precoce do implante, pois bactérias conhecidas como patógenos periodontais são capazes de colonizar a superfície dos implantes nas primeiras semanas de exposição oral (Quirynen et al., 2006).

Por serem biomateriais, os cicatrizadores têm a composição química e a topografia da superfície como fatores importantes na resposta tecidual peri-implantar (Sawase et al., 2000). A superfície destes componentes afeta diretamente a forma, proliferação, orientação e função das células epiteliais e conjuntivas dos tecidos

adjacentes (Eisenbarth et al., 1996); e podem conduzir ao acúmulo de placa bacteriana resultando em inflamação da mucosa peri-implantar (Quirynen et al., 1993, Zitzmann et al., 2002).

Segundo estudo clínico de Sawase et al., (2000), a rugosidade da superfície dos implantes possui uma relação positiva com a maturação da placa supragengival e subgengival. A colonização bacteriana inicial ocorre facilmente nas partes mais profundas das irregularidades da superfície, e sua dificuldade de remoção permite o acúmulo da placa bacteriana (Quirynen et al., 2005), que pode alcançar o osso com consequente reabsorção e falha na osseointegração (Sawase et al., 2000).

Essas afirmações obtidas por meio de diversas pesquisas, também pode ser estendidas aos componentes protéticos de implantes. Em comparação às superfícies lisas, pilares de superfície áspera tendem a acumular mais placa bacteriana, segundo relatos de estudos que analisaram a comunicação com a mucosa peri-implantar (Quirynen et al., 1993). Assim como a micro-arquitetura, a composição química da superfície também é importante para as interações teciduais (Sawase et al., 2000).

Contudo, os cicatrizadores também devem apresentar alguns cuidados e muitas vezes até um método que permita melhor a ocorrência da osseointegração, como um tratamento de superfície, assim como os realizados com implantes. Na fase inicial após a instalação do implante, são importantes os métodos preventivos, pois caso a mucosite tenha se instalado provavelmente ainda não progrediu para uma peri-implantite, a qual produz danos irreversíveis (Hallstrom et al., 2012).

2.5 Antimicrobianos para a peri-implantite

Diversos tratamentos cirúrgicos previamente avaliados em humanos e animais são indicados para a peri-implantite (Park et al., 2012); mas além desses métodos, protocolos de desinfecção da superfície de implantes e seus componentes protéticos são sugeridos, tais como ácido cítrico (Jovanovic et al., 1993), ar - pó abrasivo (Machado et al., 2000) e agentes antimicrobianos (Mombelli et al., 2001, De Giglio et al., 2013)

A fim de controlar o processo inflamatório nos tecidos peri-implantares que ocorre em resposta a agressão bacteriana, assim como evitar danos teciduais e irreparáveis, como a possível perda óssea; tem sido estudada a utilização de medicamentos tópicos em componentes protéticos sobre implantes (Estrela et al., 2006; Fernandes et al., 2008).

Andrade et al. (2012) analisaram os efeitos da utilização de pasta antisséptica de iodofórmio junto com a instalação de cicatrizadores, após o uso de quinze dias em implantes já osseointegrados. Avaliaram clínica e radiograficamente a presença de sangramento à sondagem, o fenótipo peri-implantar, o acúmulo de placa, a cor da mucosa, e a perda óssea em função das roscas expostas. Apesar dos resultados não mostrarem diferença com o grupo sem a utilização da pasta de iodofórmio, estudo anteriores sugerem que a diminuição dos sinais da doença peri-implantar só diminui com o uso do antisséptico em longo prazo (Junior et al., 2006).

Indicados para o tratamento da periodontite adulta, medicamentos como a Azitromicina, apresentam resultados clínicos e microbiológicos satisfatórios em doenças peri-implantares (Gomi et al., 2007); pelo rápido efeito da medicação (Khan

et al., 2002), que demonstra concentrações mais elevadas no fluido gengival que no soro (Lai et al., 2011); e sua ação antibacteriana de amplo espectro, indicada em infecções mais complexas (Hallstrom et al., 2012). A Tetraciclina também é um agente antimicrobiano de perfil bacteriostático que, por meio da inibição da síntese proteica bacteriana, impede a atividade bacteriana (Park et al., 2012). Tem sido utilizada com frequência no processo de regeneração óssea, juntamente com o enxerto ósseo, devido aos seus efeitos positivos anticolagenase (Golub et al., 1984) e a sua tradicional ação antibacteriana (Baker et al., 1983). Apesar da limitação dos seus resultados como indicação do tratamento da peri-implantite (Park et al., 2004) esta medicação foi aplicada na superfície polida de implantes dentais em um caso clínico que provou que durante o período de acompanhamento, este apresentou melhoria clínica (Park et al., 2012).

Os compostos à base de prata, também são materiais de grande valia para a ciência biológica devido ao seu potencial antimicrobiano (Sambhy et al., 2006; Kenawy et al., 2007; Dellasega et al., 2008) e podem ser aplicados em reabilitações com os implantes dentários.

2.5.1 A Prata (Ag) como Antimicrobiano

Metais como a prata, o cobre, o ouro, o titânio e o zinco; há séculos vêm sendo utilizados como agente antimicrobianos, cada um com suas diferentes propriedades e espectros de ação.

A prata tem suas propriedades antimicrobianas conhecidas a mais de 3000 anos, onde civilizações antigas usavam seus compostos para o tratamento da água. (Holtz et al., 2010, 2012).

Devido à ação antibacteriana, com ampla gama de micro-organismos (Cheng et al., 2012) sua aplicação permitiu ser expandida para a ciência e tecnologia, com grande importância em diversos materiais (Sambhy et al., 2006; Kenawy et al., 2007; Dellasega et al., 2008; Cheng et al., 2012). Estudos mais recentes mostram que sua ação bactericida se deve à forte interação com os grupos tiol presentes nas enzimas envolvidas no metabolismo da célula bacteriana (Morones et al., 2005; Kwakye-Awuah et al., 2008). Além disso, os íons de prata apresentam baixa toxicidade para a célula humana, visto como uma vantagem específica de grande importância (Holtz et al., 2010; Choi et al., 2008, Cheng et al., 2012); permitem uma ação antimicrobiana a longo prazo, como notado em estudo que inibiu o crescimento da *S. mutans* por mais de 6 meses; e provocam menos resistência bacteriana que os antibióticos (Cheng et al., 2012).

Com estas propriedades favoráveis, pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de novos compostos a base de prata com melhora na performance biocida (Gogoi et al., 2006; Holtz et al., 2010, 2012; Chen et al., 2012); e estes já vêm sido utilizados na medicina para o tratamento de queimaduras e de doenças, tais como a tétano e artrite reumatoide (Atiyeh et al., 2007; Kwakye-Awuah et al., 2008).

2.5.2 Nanomateriais como antimicrobianos

A nanoterapia é uma modalidade de tratamento que permite controlar a formação de colônias bacterianas, por meio da ação biocida, anti-adesiva e outras funções das nanopartículas (Di Giulio et al., 2013). Estas têm sido foco de interesse de muitas pesquisas, por serem componentes de agentes tópicos para controle do biofilme oral (Allaker et al., 2010).

O aumento dos estudos relacionados ao desenvolvimento de materiais a base de prata ocorreu em parte, ao desempenho antimicrobiano obtido com os nanomaterias (Duran et al., 2007; Kumar et al., 2008; Kwakye-Awuah et al., 2008; Di Giulio et al., 2013). As nanopartículas metálicas têm sido sugeridas pela sua atividade biocida, sua reduzida dimensão e elevada relação superfície/volume (Morones et al., 2005; Cheng et al., 2012; Di Giulio et al., 2013). Essas características permitem a interação íntima com as membranas microbianas, e não somente a liberação de íons metálicos como nos compostos metálicos não nanoparticulados (Morones et al., 2005).

Robinson et al. avaliou a penetração das nanopartículas e os íons liberados de agentes antimicrobianos, assim como a complexidade da composição microbiana e a arquitetura do biofilme; por meio de um estudo *in situ* (Watson et al., 2005). A utilização de um dispositivo aplicado sobre o esmalte dentário, gerador de placa bacteriana, demonstrou que esta possui diversos canais (Wood et al., 2000) fundamentais na transferência de nanopartículas através de biofilmes (Allaker et al., 2010). Desse modo, a possibilidade de alterar as propriedades físico-químicas dos nanocompostos, como o grau de hidrofobia, a carga de superfície, a relação área de

superfície/massa do biofilme, e a capacidade das partículas para adsorver a superfície do biofilme; faz destes materiais uma opção antimicrobiana de grande valia (Nel et al., 2009).

Entretanto, apesar das vantagens adquiridas com a redução das partículas a tamanhos nanométricos, outras propriedades dos materiais podem ser alteradas; como a dureza, área de superfície ativa, reatividade química, e atividade biológica (Allaker and Ren 2008). Assim, com a finalidade de permitir variadas aplicações de potencial antimicrobiano intra-oral, as nanopartículas estão sendo combinadas com polímeros, ou os materiais dentários as recebem na forma de um tratamento superficial (Monteiro et al. 2009).

2.5.3 Nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata (AgNPs) (Sondi & Salopek-Sondi, 2004), e também as nanopartículas de cobre (Cioffi et al., 2005); são as que tem recebido maior atenção em relação as suas propriedades antimicrobianas (Niakan et al, 2013) e anticancerígenas (Rai et al., 2014)

Além de apresentarem eficácia contra as bactérias, vírus e outros micro organismos eucarióticos (Duran et al., 2007; Kumar et al., 2008; Kwakye-Awuah et al., 2008; Nadaffi et al., 2010; Rai et al., 2014; Rizzello & Pompa, 2014), as AgNPs também são designadas como compostos não tóxicos para o organismo humano, sendo a biocompatibilidade uma grande vantagem na aplicação na biomedicina (Kim et al., 2007; Nadaffi et al., 2010). Sua ação antibacteriana, antiviral e antifúngica não possui efeitos secundários e obtém resultados satisfatórios mesmo em baixas

concentrações (Jeong et al. 2005; Cheng et al., 2012); portanto tem sido frequentemente comparada a outros metais (Elechiguerra et al., 2005; Monteiro et al., 2009).

A dimensão extremamente reduzida das partículas (cerca de 1 a 100 nm (Cushing et al., 2004) aumenta a área de superfície e conduz a atividade bactericida (Pal et al., 2007; Kwakye-Awuah et al., 2008, Cheng et al., 2012). Tamanhos de partículas compreendidos entre 1 e 10 nm tem apresentado uma maior atividade antibacteriana, conforme demonstrado por Morones et al. (2005) e Verran et al. (2007) que concluíram que o tamanho da partícula e a ação biocida são inversamente proporcionais.

Assim, seu uso importante é nas aplicações da nanobiotecnologia (Kneipp et al., 1999) e da biomedicina (Acosta-Torres et al., 2012). A utilização das nanopartículas de prata pode ser por meio da incorporação ou pelo tratamento superficial em variados materiais (Li et al. , 2006) como a resina acrílica (Boldyryeva et al., 2005) e os hidrogéis (Lee & Tsao, 2006).

Uma particularidade interessante das nanopartículas de prata é sua ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus resistentes a Meticilina (MRSA)*, uma das principais causas das infecções bacterianas hospitalares (O'Hanlon & Enright, 2009). Além disso, relatos na literatura demonstram maior dificuldade dos micro-organismos em adquirirem resistência a estes nanocompostos em comparação ao antibióticos convencionais (Acosta-Torres et al., 2012), devido a ampla gama de espécies bacterianas afetadas pela sua ação e a necessidade de ocorrerem muitas mutações (Pal et al., 2007).

Compósitos e polímeros nanoparticulados com a precipitação de brometo de prata (AgBr) mostraram resistência na formação do biofilme. A liberação de íons de prata biocidas mostrou eficácia contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, e indiscriminadamente contra bactérias patogênicas ou comensais. Os resultados mostram-se associados ao tamanho das nanopartículas ou ao tamanho/formato dos poros que compunham o material (Sambhy et al., 2006).

Apesar do mecanismo de atividade antibacteriana das nanopartículas de prata não ser ainda muito bem compreendido, estudos indicam que a carga positiva dos íons metálicos do nanocomposto permite uma atração eletrostática com a carga negativa da membrana celular bacteriana (Kim et al. , 2007); o que impede a replicação do DNA bacteriano (Feng et al., 2000, Cheng et al. 2012), e inativa a expressão de proteínas ribossomais e outras proteínas e enzimas necessárias para a produção de ATP (Yamanaka et al., 2005).

Sondi & Salopek – Sondi (2004) mostraram que a morte celular bacteriana pode ser resultante de danos e alterações estruturais nas membranas bacterianas, decorridas das ligações preferenciais das células internas que contém fósforo, como o DNA, ou das proteínas da membrana da bactéria; com as nanopartículas de prata. Apesar do mecanismo não ser totalmente claro, sugere-se que esta ligação inibe enzimas respiratórias, o que gera espécies reativas de oxigênio e radicais livres com danos subsequentes a membrana celular (Kim et al. , 2007).

O vanadato de prata (AgVO₃) é um importante nanocomposto à base de prata por apresentar considerável estabilidade e porque algumas de suas propriedades como tamanho, composição, propriedades da superfície, estrutura e forma do cristal, podem ser sintonizadas pela engenharia (Holtz et al., 2010,2012).

2.6 Nanopartículas de prata na odontologia

Na odontologia os metais já vêm sendo incorporados na composição de alguns produtos orais ou até mesmo dentrífcios, para controle da formação de placa e cárie dental; como o citrato de zinco ou acetato (Giertsen, 2004).

O uso das nanopartículas de prata como antimicrobianos na área biomédica, tanto isoladas, quanto como um compósito com outros agentes; têm mostrado resultados desejáveis ao se verificar a redução da formação de biofilme nos biomateriais (Sambhy et al., 2006) e na aderência dos fungos e bactérias (Monteiro et al. de 2009).

A aplicação das nanopartículas de prata nos materiais odontológicos tem sido avaliada nas resinas compostas (Herrera et al., 2001 *apud* Allaker et al., 2010) e sobretudo nas resinas acrílicas para confecção de prótese total. Estas tem sofrido atenção especial pelo fato de os polímeros que a compõem estarem suscetíveis à aderência da *Candida albicans*, uma espécie fúngica essencial para o desenvolvimento da colonização bacteriana e infecção dos tecidos suscetíveis (Acosta-Torres et al., 2012).

O estudo realizado por Monteiro et al. (2012) obteve resultados com atividade antimicrobiana satisfatória ao incorporar diferentes concentrações de nanopartículas de prata na resina acrílica Lucitone 550. Este resultado também foi observado em seu outro estudo piloto que utilizou o benzoato de prata a 0,2% e 0,5%, para avaliar a efetividade contra o *Streptococcus mutans*; mostrando 52,4% e 97,5% de inibição bacteriana, respectivamente (Monteiro et al., 2012 *apud* Acosta –Torres et al., 2012). Avaliando também a incorporação de um nanocomposto em 2,5% na resina acrílica,

Casemiro et al. (2008) encontraram resultados que indicaram atividade antimicrobiana elevada; no entanto, a resistência a flexão e ao impacto apresentaram-se reduzidas. Portanto, apesar dos resultados satisfatórios, existem limitações a serem evitadas nos nanocompostos de prata, como as interferências que podem ocorrer nas propriedades mecânicas dos materiais dentários (Monteiro et al., 2012).

Ao comparar PMMA (poli-metil metacrilato) com a incorporação de nanopartículas de prata com um PMMA convencional e concluir que além da redução significativa da adesão da *C. albicans*; as propriedades flexurais foram mantidas dentro dos padrões aceitos pela ISO-1567; Acosta-Torres et al. (2012) sugeriu um novo material nanoparticulado biocompatível e antifúngico para confecção de dentaduras.

Além das bases de prótese total, outros materiais utilizados para reabilitação da cavidade oral podem ter na sua composição o PMMA, ou algum outro componente similarmente áspero (Bulad et al., 2004), que contribui para adesão bacteriana, se associado à condições desfavoráveis como a falta de higiene e a perda de integridade tecidual, ou fatores sistêmicos como a xerostomia, infecção pelo vírus de imunodeficiência humana ou desnutrição (Acosta-Torres et al. 2012). O zeólito de prata, um nanocomposto formado por meio da ligação do zeólito - um material cristalino poroso de alumino-silicato hidratado; a 40% dos íons de prata dentro estrutura; foi incorporado em condicionadores de tecidos, resinas acrílicas, e colutórios (Matsuura et al., 1997; Kawahara et al., 2000; Casemiro et al., 2008).

Adesivos experimentais com adição de nanopartículas também apresentaram melhor desempenho com a menor adesão bacteriana. Apesar da superfície mais

rugosa, não foram influenciados pelo recobrimento de saliva, e não apresentaram diferença significativa na resistência ao cisalhamento como demonstrou estudo de Ahn et al. (2009).

Com o objetivo de propor uma resina odontológica que permitisse um menor crescimento de biofilme, uma vez que este contribui para cáries secundárias e o fracasso da restauração dentária; nanopartículas de óxido de zinco foram incorporadas a compósitos restauradores e testadas *in vitro* em relação à formação de cultura bacteriana (Sevnic e Hanley *apud* Allaker et al., 2010). Em um período de três dias, notou-se uma inibição significativa do crescimento de *S. sobrinus* no biofilme, com concentrações menores que 10% do material; entretanto, características estruturais deveriam ser cuidadosamente avaliadas com a utilização desta proporção (Allaker et al., 2010).

Os implantes também têm recebido a aplicação de revestimentos incorporados com nanopartículas devido as suas propriedades osteocondutivas e antibacterianas que minimizam as chances de falha do implante (Allaker et al., 2010). A hidroxiapatita sintética (HA), utilizada e testada na indústria para recobrimento de implantes, devido ao seu ótimo efeito osteocondutor; vem sendo pesquisada em escalas nanométricas para reduzir o potencial de colonização bacteriana. Em comparação ao titânio convencional, houve uma redução na contagem de biofilme após sete dias com filme de carbono amorfo com a incorporação de nanopartículas de prata de 40 a 60 nm sobre o titânio (Almaguer - Flores et al., 2010).

Apesar dos estudos relatados, a literatura ainda é escassa de pesquisas que abordem o tema utilização dos nanocompostos de prata na odontologia (Casemiro et

al. 2008). A biocompatibilidade das nanopartículas ainda não está bem esclarecida, pois muitos estudos utilizam metodologias *in vitro*, o que também dificulta o conhecimento da quantidade ideal das nanopartículas de prata nos polímeros, uma vez que esta pode alterar as propriedades físicas do material; e deve ser considerada clinicamente.

Apesar das muitas vantagens, existe a dificuldade de se obter livres estabilizadores, o que geralmente limita as aplicações práticas das nanopartículas de prata como agentes antibacterianos (Balan et al 2007). Dessa forma, são sugeridos os materiais nanoestruturados com elevada dispersão de nanopartículas de prata em sua superfície, que melhoram o potencial antibacteriano, por serem livres de agentes de estabilização (Holtz et al., 2010). O nanofio de vanadato de prata decorado com partículas de prata (β -AgVO₃) é um material proposto com essas características e finalidade (Li et al 2008, Liu et al, 2006).

2.7 Vanadato de prata como antimicrobiano

A sinterização do vanadato de prata ocorre por meio de uma reação de precipitação de vanadato de amônio e nitrato de prata seguido por tratamento hidrotérmico. Os nanofios de vanadato prata formados têm comprimentos na ordem de microns e diâmetros com aproximadamente 60 nm, e as nanopartículas de prata que o decoram possuem diâmetros que variam de 1 a 20 nm; formando um composto nanoestruturado (Holtz et al., 2010).

A importância deste nanocomposto da prata está baseada na sua alta estabilidade e pela possibilidade de algumas de suas prioridades poderem ser

aprimoradas pelos laboratórios de engenharia química, tais como a composição, tamanho, forma do cristal, estrutura e características da superfície (Holtz et al., 2010). Existem estudos que avaliam as nanopartículas de prata, mas até o presente momento poucos relatos sobre os nanoestruturados de prata (Holtz et al., 2010, 2012).

Holtz et al. (2010) avaliaram a eficiência antimicrobiana do nanoestruturado vanadato de prata, comparando ao antibiótico convencional Oxacilina, no efeito bactericida contra o *Staphylococcus aureus*; e encontraram valores 10 vezes mais satisfatórios do valor de concentração de crescimento inibitório mínimo (Holtz et al., 2010).

O nanoestruturado vanadato de prata já foi incorporado em tintas à base de água para sua aplicação em cozinhas, banheiros e paredes de hospitais, como potencial antimicrobiano. A configuração química foi de nanofios de vanadato de prata (β - AgVO_3), com diâmetros entre 20 e 60 nm; decorados com nanopartículas (NPs) de prata (Ag) com diâmetros que variavam de 5 a 40 nm. Testes antibacterianos foram realizados com a incorporação do composto híbrido em 1% da composição da tinta, e revelaram atividade antibacteriana 30 vezes maior do que a da oxacilina, e contra bactérias de diversas espécies, tais como *MRSA*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella entérica Typhimurium* (Holtz et al., 2012).

Acredita-se que a utilização de materiais indicados para componentes na Implantodontia, sobretudo nas fases iniciais de cicatrização, com uma película superficial de vanadato de prata; possam ser efetivos como antimicrobianos e preventivos da doença peri-implantar.

Entretanto, um tratamento de superfície pode trazer alguns problemas, de acordo com os resultados de estudos que apontam que, sob condições *in vivo*, superfícies rugosas atraem mais biofilme bacteriano que aquelas lisas (Teughels et al., 2006). O acréscimo de partículas em um filme superficial que apresente um aumento da rugosidade superficial acima do limiar de 0,2 μm e / ou um aumento na energia livre de superfície livre favorece a formação da colonização bacteriana em materiais (Busscher et al., 2010). Portanto, este estudo também avaliará a microestrutura por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a rugosidade superficial dos materiais com tratamento superficial. Além disso, a dureza superficial será analisada, uma vez essa aplicação de um filme na superfície também pode afetar propriedades mecânicas, segundo Casemiro et al (2008) e Monteiro et al (2012).

Assim, a literatura apresentada demonstra que a doença peri-implantar, os efeitos negativos da infecção pós-cirúrgica e a retenção de micro-organismos junto aos aparelhos protéticos, ainda necessitam de novas propostas e soluções para que sejam erradicadas ou controladas, aumentando a longevidade dos tratamentos com implantes dentais e a qualidade de vida dos pacientes.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Com base na revista da literatura apresentada, o presente estudo teve como objetivo a utilização do composto nanoparticulado *vanadato de prata* como *tratamento de superfície* antimicrobiano de cicatrizadores e/ou componentes protéticos de resina acrílica, teflon ou poliacetal, para o uso na Implantodontia.

Como objetivos específicos o estudo:

1. Comparou a atividade antimicrobiana do filme veículo de vanadato de prata sobre os substratos indicados, aplicado na forma de esmalte ou glaze, em concentrações pré-determinadas - 2,5%; 5% e 10%; frente a espécies de micro organismos padrão, por meio do halo de inibição do crescimento microbiano.
2. Comparou a rugosidade e a dureza superficial de cada material com os tratamentos de superfície nas concentrações pré-determinadas e sem a aplicação de tratamento de superfície.
3. Analisou a alteração da microestrutura de cada material após a aplicação do tratamento de superfície, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Corpos de Prova

4.1.1.1 Substratos de composição dos corpos de provas

Para realização deste estudo foram utilizados corpos de prova confeccionados com três tipos de material:

- Resina acrílica autopolimerizável Dencôr Lay cor 66 (Artigos Odontológicos Clássico[®], São Paulo, SP, Brasil)
- Politetrafluoretileno (Teflon[®])
- Poliacetal (Acetal)

4.1.1.2 Filme veículo para o nanocomposto antimicrobiano

Cada grupo de material foi subdividido em dois subgrupos, de acordo com o tipo de filme veículo do nanocomposto antimicrobiano:

- Glaze para impermeabilização de resina soft confort Dencril (Dencril Comércio de Plásticos Importação e Exportação Ltda., Pirassununga, São Paulo, Brasil) (Figura 1).
- Esmalte de unha incolor Risqué (Niasi Indústria de Comésticos Ltda., Taboão da Serra, São Paulo, Brasil) (Figura 2).

Figura 1- Glaze para resina

Figura 2- Esmalte incolor

4.1.1.3 Nanocomposto antimicrobiano

Os veículos glaze e esmalte apresentaram a inclusão do nanocomposto vanadato de prata (AgVO_3) em diferentes proporções - 2,5%, 5% e 10%, além de um grupo controle (0%); totalizando 4 grupos de cada tipo de tratamento superficial. Assim, os corpos de prova foram divididos em 24 grupos, sendo 8 para cada material, conforme a tabela à seguir:

Quadro 1 - Materiais utilizados divididos em grupos conforme o tipo de tratamento de superfície e concentração do vanadato de prata.

Material	Tratamento superficial antibacteriano	Concentração do vanadato de prata (%)
Resina acrílica, Teflon ou Poliacetel	Filme de esmalte com vanadato de prata	0
		2,5
		5
		10
	Filme de glaze com vanadato de prata	0
		2,5
		5
		10

Para as análises rugosidade e dureza superficial e para as análises microscópicas um grupo sem a presença de aplicação de filme foi incluído.

4.1.1.4 Equipamentos, instrumental e material de consumo

- Monômero e polímero da resina acrílica autopolimerizável Dencôr Lay© cor 66 (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3);
- Espátula odontológica número 31 (Figura 3);
- Pote de vidro Paladon com tampa; (Figura 3);
- Pote de plástico medidor (Figura 4);
- Balança de precisão Micronal© modelo AB204 (AJ Micronal S.A., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4);
- Pipeta Vidrolabor© (Labor Quimi Indústria e Comércio de Vidros para Laboratório Ltda., Poá, São Paulo, Brasil) com pipetador manual de sucção de borracha (Figura 5);
- Anéis de PVC (policloreto de vinila) (15 mm x 20 mm) (Figura 6);
- Silicone de condensação denso e catalisador Zetalabor® (Zhermack S.p.A, Labordental Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 7);

Figura 3 - Resina acrílica autopolimerizável

Figura 4 - Balança de precisão e pote de medição

Figura 5 - Pipeta e pipetador usados para medir o líquido da resina acrílica

Figura 6 - Cilindro de PVC

Figura 7 - Silicone de condensação com catalisador

- 2 placas de vidro;
- Espátula número 7;
- Micromotor e peça de mão Kavo (Kavo do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Joinville, Santa Catarina, Brasil);
- Disco diamantado flexível dupla face 7020 (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brasil);
- Fresa Maxi-cut (Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça);
- Borrachas abrasivas em granulação média e fina - Kit PA 102030 (Rhadartrade Comercial Importadora de Peças Ltda, Paranaguá, Paraná, Brasil) (Figura 8);

- Roda pêlo de cabra (Bettinelli e Bettinelli Ltda, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) (Figura 8);

Figura 8 - Pontas de borracha e pêlo de cabra

Figura 9 - Pipetador com ponteira

- Caneta de retroprojeto preto;
- Pipeta automática HTL© modelo LMP 1000 (PZ HTL S.A., Warsaw, Polônia) e ponteiros (Figura 9);
- Pote de vidro dappen;
- Pincel orelha de boi 175 Tigre© (Pincéis Tigre S.A., Castro, Paraná, Brasil).

4.1.2 Placas de cultura celular

4.1.2.1. Equipamentos

- Agitador de tubos AP-56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Autoclave vertical - linha AV (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Bico de Bunsen;

- Espectrofotômetro - modelo 22PC (Spectrum Labs Ltda., China);
- Estufa (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil);
- Cabine de Segurança Biológica Classe II – modelo Bio Seg 12 (Grupo VECO, Campinas, São Paulo, Brasil);
- Forno de Pasteur (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil);
- Osmose reversa (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil).

4.1.2.2 Materiais, Vidrarias e Reagentes

- Agulha de níquel-cromo;
- Alça de níquel-cromo;
- Algodão;
- Anaerobac (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Balão de vidro (250 mL);
- Balão de vidro (500 mL);
- Canetas marcadoras para plástico e vidro;
- Cloreto de Sódio – (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil)
- Cubeta de quartzo (4,5 mL);
- Erlenmeyer (250 mL);
- Erlenmeyer (500 mL);

- Jarras para anaerobiose (Permutation - E. J. Krieger e Cia. Ltda., Curitiba, Paraná, Brasil);
- Papel toalha;
- Pipetador automático;
- Pipetas automáticas HTL modelo LMP 1000 (PZ HTL S.A., Warsaw, Polônia) - (100 a 1000µl);
- Placas de Petri de poliestireno (60x15mm) esterilizadas;
- Placas de Petri de poliestireno (140x15mm) esterilizadas;
- Ponteiras esterilizadas;
- Proveta (100 mL);
- Proveta (250 mL);
- Régua milimétrica;
- Tubos de ensaio com pérolas de vidro (150 x 25 mm).

4.1.2.3 Micro-organismos padrão

Os micro-organismos utilizados na pesquisa estão demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2 – Micro-organismos padrão utilizados nos experimentos microbiológicos.

Código	Micro-organismos	Procedência	Características morfotintoriais	Fisiologia
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	Bastonetes gram-negativos	Anaeróbia
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 49046	Bastonetes gram-negativos	Anaeróbia
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bastonetes gram-negativos	Aeróbia
Ec	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bastonetes gram-negativos	Anaeróbia facultativa
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Cocos gram-positivos	Anaeróbia facultativa
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Cocos gram-positivos	Anaeróbia facultativa
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Cocos gram-positivos	Anaeróbia facultativa
Ca	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Leveduras gram-positivas	Anaeróbia facultativa

ATCC, American Type Culture Collection.

4.1.2.4 Meios de cultura

- Tryptic Soy Agar (Difco, Sparks, MD, USA) suplementado com 5% de sangue de carneiro, hemina (5,0µg/mL) e menadiona (1,0µg/mL);
- Muller Hinton Agar (Difco, Sparks, MD, USA);
- Saboraud Dextrose Ágar (Difco, Sparks, MD, USA).
- Tryptic Soy Agar (Difco, Sparks, MD, USA).

4.1.3 Materiais e Equipamentos utilizados para análise da Rugosidade Superficial

- Rugosímetro digital, modelo SJ-201P (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão) (Figura 10):
 - Unidade transversal motorizada precursora de leitura: agulha e motor fixado em haste vertical presa à base de granito (Figura 10);

- Unidade programadora de controle e registro de leitura (Figura 11);
- Disco em papel branco com demarcações de 3 eixos (Figura 12);

Figura 10 – Unidade precursora de leitura

Figura 11 – Unidade programadora de controle e registro de leitura

- Mesa regulável para apoio do corpo de prova (Figura 12).

Figura 12 – Mesa com papel demarcador de posicionamento da amostra.

4.1.4 Equipamentos utilizados para análise da Dureza Superficial

- Durômetro tipo Testor HT1 (Wolpert Sussen™, São Paulo SP, Brasil) (Figura 13);

- Esfera de aço temperado de 12,7 mm de diâmetro (1/2").

Figura 13 – Durômetro tipo Testor HT1

4.1.5 Equipamentos utilizados para análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

- Metalizador Bal-Tec Sputter Coater SCD 050 (Tokyo, Japão);
- Suportes metálicos;
- Fita adesiva de carbono
- Microscópio Eletrônico de Varredura Carl Zeiss EVO® MA 10 (Carl Zeiss Inc, Jena, Alemanha).

4.2 **MÉTODOS**

A metodologia aplicada durante o desenvolvimento do estudo foi constituída de 8 etapas:

- 4.2.1 Confeção dos corpos de prova
- 4.2.2 Preparo do composto nanoestruturado vanadato de prata
- 4.2.3 Tratamento de superfície dos corpos de prova
- 4.2.4 Análise microbiológica por halo de inibição de crescimento microbiano
- 4.2.5 Análise das propriedades físicas
- 4.2.6 Tratamento estatístico dos resultados
- 4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.2.1 **Confeção dos corpos de prova**

Foram confeccionados 873 corpos de prova divididos em 3 grupos com 291 amostras, de acordo com o material selecionado para confecção de componentes para implantodontia: resina acrílica, teflon e poliacetal.

Em cada grupo, uma metade recebeu o tratamento antimicrobiano por meio da aplicação de filme de glaze, e outra metade com o veículo esmalte. Ambos os grupos foram subdivididos de acordo com a porcentagem de vanadato de prata presente nos filmes: 0%, 2,5%, 5% e 10%.

Separou-se 576 corpos de prova, nos 24 grupos (Quadro 1) para avaliação da atividade antimicrobiana frente aos 8 micro-organismos selecionados (Quadro 2) e em triplicata para obtenção de resultados com dados seguros estatisticamente.

As análises rugosidade e dureza superficial utilizaram os mesmos corpos para ambos os métodos (270), sendo 10 espécimes de cada grupo (Quadro 1); além da inclusão dos grupos de cada material sem acréscimo de filme.

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizados 27 corpos de prova, com a finalidade de obter uma imagem de cada grupo de substrato e filme com o acréscimo de vanadato de prata e sem a incorporação; e também de um grupo sem a aplicação de filme de glaze ou esmalte.

4.2.1.1 Confeção dos corpos de prova em poliacetal

O poliacetal foi adquirido em bastão de formato cilíndrico com 9 mm de diâmetro, e seccionado e usinado na Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto em corpos de prova com 3 mm de altura e 5 mm de diâmetro. Foram marcados pontos identificadores com uma caneta preta, na superfície que não receberia a aplicação do tratamento superficial antimicrobiano (Figura 14).

Figura 14 - Corpos de prova em poliacetal.

4.2.1.2 Confecção dos corpos de prova em politetrafluoretileno (Teflon®)

O teflon foi adquirido em formato cilíndrico com 6 mm de diâmetro e em seguida segmentado e usinado na Oficina de Precisão da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto, possuindo as mesmas conformações e padronizações que os outros tipos de materiais - espécimes de 3 mm de altura e 5 mm de diâmetro e com as marcações em uma das bases. (Figura 15).

Figura 15 - Corpos de prova em teflon

4.2.1.3 Confecção dos corpos de prova em resina acrílica

Para confecção dos corpos de prova em resina acrílica autopolimerizável foram utilizados matrizes obtidas à partir dos moldes dos corpos de prova de poliacetal ou teflon. Os moldes foram confeccionados com silicone de polimerização por condensação tipo densa Zetalabor® (Figura 7), em cilindros de PVC (20 mm de diâmetro x 15 mm de altura) (Figura 6), interpostos entre duas placas de vidro (Figura 16).

Figura 16 - A e B) Moldagem e C) molde dos corpos de provas de teflon.

A manipulação da resina seguiu criteriosamente as orientações do fabricante Dencôr Lay® quanto à proporção entre o monômero e o polímero; sendo utilizado 1 parte de líquido (2 mL) - medido com a pipeta Vidrolabor® (Figura 5), para 2 partes de pó (4 g) - medido com a balança de precisão Micronal® AB204 (Figura 4).

Os dois componentes foram inseridos em pote de vidro paladon e manipulados com uma espátula 31. Ao atingir a fase arenosa após sua completa manipulação e fechamento do pote, a resina acrílica foi inserida nos moldes colocados sobre uma placa de vidro; e em seguida prensada manualmente com outra placa de vidro sobreposta aos moldes vazados, de maneira idêntica a obtenção dos moldes.

Após o tempo de polimerização total das amostras, estas foram removidas do molde com o auxílio de uma espátula 11; separadas com disco de diamante quando permanecessem unidas, e os excessos removidos com peça de mão e fresa maxi-cut. O acabamento e o polimento foram feitos com pontas montadas de borrachas abrasivas em granulação média e fina e roda de pêlo de cabra (Figura 8) a fim de eliminar qualquer irregularidade visível e dar maior lisura superficial.

Obtidos os corpos de prova, assim como nos outros materiais, estes também receberam uma marcação com caneta preta em um dos seus lados, de forma a

identificar a superfície que não receberia a aplicação de filme antimicrobiano (Figura 17).

Figura 17 - A) Corpos de prova em resina acrílica autopolimerizável e **B)** demarcação de superfície

4.2.2 Preparo do composto nanoestruturado vanadato de prata

A obtenção do composto vanadato de prata (AgVO_3) foi realizada no Laboratório de Química do Estado Sólido da Universidade de Campinas- UNICAMP, por meio da reação de precipitação de metavanadato de amônio (NH_4VO_3) (Merck 99%) e nitrato de prata (AgNO_3) (Merck 99,8%).

Ambas substâncias foram pesadas em balança de precisão. 0,97 gramas de NH_4VO_3 foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, sob agitação magnética em superfície aquecida a 110°C durante 10 minutos, para a solução obter a temperatura de 65°C . Nas mesmas condições, também em água destilada (200 mL), foram adicionados 1,35 gramas de AgNO_3 (Figura 18).

Figura 18 - Agitação magnética do NH_4VO_3 e AgNO_3

Gota a gota, com o uso da bureta e sob agitação durante 30 minutos, a solução de AgNO_3 foi adicionada à solução de NH_4VO_3 , formando vanadato de amônio, um precipitado amarelo (Figura 19).

A

B

Figura 19 - A e B) Adição de AgNO_3 à NH_4VO_3

O precipitado obtido foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada e etanol absoluto e secado sob condições de vácuo durante 4 horas (Figura 20) até obtenção final do vanadato de prata (Figura 21).

Figura 20 - A) Filtragem B) lavagem e C) secagem para obtenção do vanadato de prata.

Figura 21 - Vanadato de prata sintetizado (AgVO_3).

4.2.3 Tratamento de superfície dos corpos de prova

Três concentrações do vanadato de prata nanoestruturado foram utilizadas para determinar a concentração efetiva deste composto como antimicrobiano: 2,5; 5 e 10%. A incorporação aos corpos de prova foi por meio do acréscimo do composto nas substâncias glaze ou esmalte, sob a forma de película de filme superficial.

O vanadato de prata nanoestruturado, apresentado sob a forma de pó, foi medido com a balança de precisão Micronal[®] AB204 no peso pré-definido da concentração a ser avaliada, baseado na quantidade de filme a ser utilizada (0,25 mL); sendo 6,25 mg em 2,5%, 12,5 mg em 5% e 25 mg em 10% (Figura 22).

O material foi incorporado nos 0,25 mL do glaze ou na mesma quantidade de esmalte, medidos com a pipeta automática HTL modelo LMP 1000 (Figura 9). Esta quantidade de veículo estipulada foi a necessária para o tempo de aplicação em 24 corpos de prova do mesmo tipo (para análise de 8 micro-organismos em triplicata), sem que o material secasse ou perdesse sua aplicabilidade por se tornar muito viscoso. A incorporação do pó ao líquido foi realizada com o auxílio de uma espátula 7 em um pote de vidro tipo dappen, e sua espatulação feita com movimentos circulares até a maior homogeneização possível (Figura 23). Finalmente, a solução de vanadato de prata foi imediatamente aplicada sobre o grupo de corpos de prova de cada material sobre a superfície não demarcada, com um pincel de pêlo de orelha de boi.

Figura 22 - Pesagem do vanadato de prata.

Figura 23 - Vanadato de prata incorporado ao glaze.

4.2.4 Análise microbiológica por halo de inibição de crescimento microbiano

4.2.4.1 Local do estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) coordenado pela Profa. Dra. Denise de Andrade da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP.

Todo o experimento microbiológico foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II – modelo Bio Seg 12.

4.2.4.2 Padronização do inóculo microbiano

Culturas recentes dos micro-organismos padrão (Quadro 3) foram obtidas a partir da semeadura em placas de Petri (90 x 15 mm) com meios de cultura incubadas de acordo com a descrição expressa na Quadro 3.

Quadro 3 - Meios de cultura e incubação empregados para cada tipo de micro-organismo padrão.

Código	Micro-organismo	Meio de cultura	Incubação
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Ágar sangue + H e K	37°C por 3 dias em anaerobiose
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>	Ágar sangue + H e K	37°C por 3 dias em anaerobiose
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Muller Hinton Agar</i>	37°C por 24h em aerobiose
Ec	<i>Escherichia coli</i>	<i>Muller Hinton Agar</i>	37°C por 24h em aerobiose
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Tryptic Soy Agar</i>	37°C por 24h em capnofilia
Ef	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Tryptic Soy Agar</i>	37°C por 24h em capnofilia
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Muller Hinton Agar</i>	37°C por 24h em aerobiose
Ca	<i>Candida albicans</i>	<i>Saboraud Dextrose Agar</i>	37°C por 24h em aerobiose

Legenda: ATCC, *American Type Culture Collection*; + H e K, suplementado com hemina e menadiona.

A partir das culturas recentes, com auxílio de alça de níquel-cromo previamente esterilizada em bico de Bunsen, transferiram-se os inóculos microbianos para tubos de ensaio (150 x 25 mm) com 20 mL de solução salina a 0,85% e pérolas de vidro (Figura 24).

Figura 24 - A) e B) - Transferência de inóculo microbiano com meio de cultura e cultura recente para tubo de ensaio

Em seguida, a homogeneização dos inóculos foi realizada em agitador de tubos AP-56 Phoenix por 10 segundos (Figura 25).

Figura 25 - Homogeneização do tubo de ensaio (150 x 25 mm) com inóculo microbiano.

A padronização dos inóculos bacteriano ($\sim 10^8$ UFC/mL) e fúngico ($\sim 10^6$ UFC/mL) foi realizada em espectrofotômetro Spectrumlab modelo 22PC, com a leitura da absorbância entre 0,080 a 0,100 em comprimento de onda de 625nm. Quando a leitura da absorbância correspondia a um valor do intervalo desejado, a

suspensão microbiana era reservada para utilização em até 15 minutos após sua preparação; entretanto, se a leitura estivesse fora desse intervalo, o inóculo era descartado e um novo inóculo padrão obtido a partir das culturas recentes (Figura 26).

Figura 26 - Vista panorâmica: **A)** inóculo microbiano sendo transferido para cubeta de quartzo e **B)** leitura de absorvância (0,090 / $\lambda=625\text{nm}$) realizada com auxílio de espectrofotômetro.

4.2.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

A análise da atividade antimicrobiana dos espécimes foi realizada em triplicata por meio da técnica de corpo-de-prova difusão.

Após a padronização dos inóculos microbianos, alíquotas de 4,0 mL foram semeadas com pipeta automática HTL modelo LMP 1000 na superfície de placas de Petri (140 x 15mm) contendo 40 mL de meio de cultura, selecionado de acordo com o micro-organismo a ser avaliado (Quadro 3); e em seguida, o excesso do inóculo foi removido (Figura 27).

Figura 27 - Vista panorâmica: **A e B)** Transferência do inóculo microbiano padronizado para superfície da placa de Petri (140x15mm) com meio de cultura e **C)** remoção do excesso do inóculo microbiano da superfície do meio de cultura.

As placas foram mantidas abertas dentro da Cabine de Segurança Biológica Classe II durante 15 minutos, com o intuito de secar completamente a superfície do meio de cultura.

Os corpos de prova foram posicionados com o auxílio de uma pinça sobre o meio de cultura e inóculo microbiano; e pressionados delicadamente a fim de obter um íntimo contato da superfície do filme de glaze ou esmalte com o meio de cultura. Com a finalidade de permitir uma distribuição equidistante entre os corpos de prova na placa de Pétri, foi delimitada uma distância mínima de cerca de 20 mm entre eles, e deles com as bordas da placa. Um mapa pré-definido de posicionamento dos corpos de prova (Figura 28) foi colocado embaixo da placa de Petri (Figura 29) para funcionar como guia.

Figura 28- Mapa de posicionamento dos corpos de prova
 T= teflon, P= polietileno, R=resina acrílica
 E= esmalte, G= glaze
 (0), (2,5), (5), (10) = valor da porcentagem de vanadato de prata no filme

Figura 29 - Posicionamento dos corpos de prova sobre o meio de cultura com inóculo microbiano na placa de Pétri.

As placas foram pré-incubadas a temperatura ambiente (25°C) por 2 horas para permitir a difusão dos produtos no meio de cultura.

Decorrido o período de pré-incubação, as placas foram incubadas em estufa Quimis em diferentes condições (Quadro 3), ressaltando a colocação de papel de

filtro absorvente entre o fundo e a tampa das placas, com o propósito de evitar o contato da água de condensação com o meio de cultura (Figura 30).

Figura 30 - Placa de Petri preparada para incubação.

Após o período de incubação procedeu-se a leitura da atividade antimicrobiana dos grupos utilizando uma fonte de luz contra a placa e uma régua milimétrica. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros a partir do ponto onde foi observado o crescimento bacteriano a olho nu, incluindo o corpo de prova.

4.2.5 Análise das propriedades físicas

As análises rugosidade e dureza superficial foram realizadas no Laboratório de Metrologia do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Foram analisados 10 corpos de prova de cada grupo de resina acrílica, teflon e poliacetal com aplicação de filmes de esmalte e glaze nas 3 concentrações propostas de vanadato de prata e sem a incorporação; além de um grupo de cada

material sem a aplicação de tratamento superficial, totalizando 270 amostras para estas análises.

4.2.5.1 Análise da Rugosidade Superficial

A realização da análise de rugosidade seguiu a norma técnica (NBR) 4287/2002 da ABNT.

A rugosidade superficial média (R_a) foi avaliada em corpos de prova com o mesmo método de obtenção e conformações idênticas às amostras avaliadas quanto à atividade antimicrobiana - 3 mm de altura e 5 mm de diâmetro.

Para esta análise foi utilizado o rugosímetro digital Surftest Mitutoyo modelo SJ-201P. O aparelho opera com uma ponta de diamante analisadora em formato de agulha com 5 μm de raio e precisão de 0,01 μm , junto a uma unidade motorizada. O conjunto é fixado a uma haste vertical presa em uma base de granito com baixo potencial de dilatação, a qual evita a descalibragem do aparelho (Figura 31).

Figura 31 – Rugosímetro fixado a haste vertical presa à base de granito.

Ao acionar o aparelho, a ponta analisadora do rugosímetro encosta no espécime (Figura 32) e percorre uma única direção com a distância limitada de 3,2 mm, sendo 0,4 mm de aceleração, 2,4 mm de leitura e 0,4 mm de desaceleração; com uma força constante de 4 mN, cut-off de $3 \times 0,8$ mm, e velocidade de 0,5 mm/s.

Figura 32 – Agulha do rugosímetro encostada no corpo de prova.

A leitura das irregularidades da superfície – picos e vales; foi feita três vezes em cada corpo de prova de acordo com os eixos delineados com 60° entre si em um disco de papel, colado na mesa a qual era sobreposto o corpo de prova (Figura 33). A média das leituras foi registrada como o valor da rugosidade (parâmetro R_a) em micrômetros.

Figura 33 A) B) C) – Leitura da rugosidade superficial do corpo de prova em três eixos.

4.2.5.2 Análise da Dureza Superficial

Para a determinação da dureza superficial foram utilizados os mesmos corpos de prova de todos os grupos avaliados quanto à rugosidade superficial.

O ensaio realizado foi o Teste de Dureza Superficial Rockwell adaptado, empregando o durômetro Wolpert SussenTM tipo Testor- HT1; e baseado na profundidade de penetração de uma esfera de aço temperado de 1/2", sob uma carga determinada no corpo de prova a ser testado (Figura 34). O padrão para este teste seria a utilização de uma esfera 1/8" ou 1/16", entretanto a utilização das mesmas provocaria um aprofundamento no corpo-de-prova que ultrapassaria a sua linha do equador.

Cada corpo de prova foi posicionado na plataforma do durômetro e submetido inicialmente a uma pré-carga de 3 kg e o medidor foi acertado em "zero". Em seguida foi aplicada uma força de 15 kg, somada a pré-carga, durante 30 segundos até o ponteiro do indicador estabilizar. A carga suplementar foi retirada e posteriormente feita a leitura da dureza superficial.

Os valores obtidos foram dados em HR15Y_{adaptado}, no qual H= ensaio dureza (Hardner), R= tipo de técnica de dureza (Rockwell), 15Y= método com emprego de pré-carga de 3 kg, carga de 15 kg e penetrador esférico 1/2" polegada (Ávila, 2009; Pereira et al., 2010).

Figura 34 A) Ensaio de dureza superficial e **B)** aplicação de pré-carga

4.2.6 Forma de Análise dos Resultados

Após a obtenção dos dados, a fim de se analisar a influência da incorporação do vanadato de prata na efetividade antimicrobiana, e dos tipos de filme aplicados e dos substratos sugeridos para o uso na Implantodontia, na rugosidade e dureza superficial; foi realizada a análise estatística paramétrica por meio do Teste ANOVA e para a diferenciação entre as médias foi utilizado o Teste de Tukey com nível significância a 5%.

4.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) EVO® MA 10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), que opera nos modos de alto vácuo e baixo vácuo (Figura 35).

Figura 35 – Microscópio Eletrônico de Varredura EVO® MA 10.

Um corpo de prova de cada grupo - 27 amostras, equivalentes às testadas nas outras análises, e um espécime de cada material sem aplicação de filme, tiveram a morfologia das superfícies avaliada qualitativamente. As amostras foram montadas em suportes metálicos, colocados sobre fita adesiva de carbono, e então cobertos em ouro em um metalizador Bal Tec SCD 050, para finalmente serem colocadas na base metálica que seria acoplada no MEV (Figura 36). Tiveram analisada a caracterização microestrutural sob aumento 100 vezes e EHT de 2000 kV, de modo a verificar possíveis alterações na estrutura topográfica com a aplicação do filme incorporado com vanadato de prata.

Figura 36 – A) Suporte B) com corpos de prova C) colocados em base metálica D) para análise no MEV

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para análise dos resultados foi realizada a análise estatística citada no capítulo “Material e Métodos”. Os resultados estão apresentados de acordo com os valores obtidos nas diferentes análises em função das variáveis e dos fatores de variação estudados em seus diferentes níveis.

5.1 Análises Microbiológicas

A influência na atividade antimicrobiana do composto nanoestruturado AgVO_3 nas suas concentrações selecionadas, do tipo de filme veículo da substância aplicado, e do substrato utilizado como sugestão de material para a confecção de dispositivos protéticos na Implantodontia; foram analisadas separadamente em cada microorganismo selecionado no estudo, a fim de cruzar valores com mesmo padrão de meio microbiano.

5.1.1 *Porphyromonas gingivalis*

Ao analisar a atividade antibacteriana do AgVO_3 frente a *P. gingivalis* foi possível verificar que não houve nenhuma formação de halo de inibição de crescimento bacteriano, como demonstrado na figura 37; porém foi possível notar a presença de lise de hemácias no meio Ágar Sangue com hemina e menadiona.

Figura 37 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *P. gingivalis*.

5.1.2 *Prevotella intermedia*

A atividade antimicrobiana de AgVO_3 em relação a *P. intermedia* se mostrou negativa, como observado na figura 38, onde foi concluída a formação de nenhum halo de inibição; entretanto foi constatada a lise de hemácias ao redor de alguns corpos de prova.

Figura 38 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *P. intermedia*.

5.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Uma das placas utilizadas para análise da atividade antibacteriana do AgVO_3 com a *P. aeruginosa*, está demonstrada na figura 39. Nas três placas analisadas com esse micro-organismo, notou-se efetividade nas amostras com todas as concentrações de AgVO_3 analisadas – 2,5%, 5% e 10%, com algumas exceções nos grupos de 2,5% - teflon e poliacetal com glaze e resina acrílica com glaze e esmalte.

Figura 39 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *P. aeruginosa*.

Após a obtenção da média dos três valores obtidos da análise em triplicata de cada grupo do presente estudo, foi aplicado o teste estatístico das médias e desvios-padrão dos diâmetros dos halos de inibição formados nos substratos poliacetal, teflon e resina acrílica, independente do tipo de filme aplicado e da concentração de AgVO_3 ; os quais encontram-se especificados na tabela 1 e gráfico 1, e mostram que não houve diferença entre os variados materiais ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *P. aeruginosa* de acordo com o substrato com AgVO₃:

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetal ^a	4,70	3,16
Teflon ^a	4,89	3,33
Resina Acrílica ^a	3,58	3,14

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 1 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *P. aeruginosa* nos substratos com AgVO₃ com diferentes concentrações.

Em relação à variação do tipo de filme incorporado com AgVO₃ – glaze ou esmalte, os valores encontrados (Tabela 2 e Gráfico 2) revelaram que os grupos também foram semelhantes quanto ao diâmetro do halo de inibição ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *P. aeruginosa* de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos:

Tratamento	Média	Desvio-Padrão
Glaze ^a	4,47	3,52
Esmalte ^a	4,31	2,94

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 2 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *P. aeruginosa* nos filmes glaze e esmalte com aplicação de AgVO_3 com as diferentes concentrações.

Entretanto, as diferentes proporções de AgVO_3 nos variados substratos e sob a forma de filmes glaze e esmalte mostraram valores médios com seus respectivos desvios-padrão (Tabela 3 e Gráfico 3) estatisticamente significantes pela análise de variância, onde todos os grupos mostraram diferença entre si ($p < 0,05$), com exceção das concentrações de 5% e 10% ($p = 0,68$), apresentado pela diferenciação entre as médias Tukey com nível de significância de 5%.

Tabela 3 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *P. aeruginosa* de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
0% ^a	0	—
2,5% ^b	4,47	2,90
5% ^c	6,22	1,88
10% ^c	6,88	0,96

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 3 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *P. aeruginosa* nas diferentes proporções de AgVO₃.

5.1.4 *Escherichia coli*

Conforme observado na figura 40, houve atividade antibacteriana do AgVO₃ perante o microrganismo *E.coli* nas três concentrações analisadas, sendo observada algumas vezes a ausência do halo de inibição em amostras de 2,5% - no teflon e no poliacetal com aplicação de esmalte.

Figura 40 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *E. coli*.

Como na *P.aeruginosa*, o tipo de substrato não interferiu nos resultados, sendo que o teflon, poliacetal e resina acrílica não tiveram diferença estatística (Tabela 4 e Gráfico 4) entre suas médias; assim como o tipo de veículo do nanocomposto (Tabela 5 e Gráfico 5) ($p>0,05$).

Tabela 4 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. coli* de acordo com o substrato com AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetal ^a	4,97	3,43
Teflon ^a	4,60	3,45
Resina Acrílica ^a	5,02	3,16

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 4 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E.coli* nos substratos com AgVO_3 em diferentes concentrações.

Tabela 5 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. coli* de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos:

Tratamento	Média	Desvio-Padrão
Glaze^a	5,51	3,63
Esmalte^a	4,22	2,85

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 5 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E. coli* nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO_3 em diferentes concentrações.

Da mesma forma que as análises do substrato e do filme veículo do AgVO_3 , os valores da *E. coli* obtiveram resultados semelhantes aos da bactéria *P. aeruginosa* quando analisada a influência da concentração do antibacteriano; evidenciando que as únicas proporções que se mostraram sem diferença estatística foram 5 e 10% ($p=1,00$) (Tabela 6 e Gráfico 6).

Tabela 6 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. coli* de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
0% ^a	0	–
2,5% ^b	5,08	2,40
5% ^c	7,16	1,33
10% ^c	7,22	1,27

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 6 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E. coli* nas diferentes proporções de AgVO_3 .

5.1.5 *Streptococcus mutans*

Ao analisar todos os grupos em relação à efetividade antibacteriana do nanocomposto, constatou-se que apenas o teflon e a resina acrílica com aplicação de AgVO_3 a 10% sob a forma de glaze mostraram resultados positivos, com médias respectivas de 10 mm e 7,3 mm (Figura 41).

Figura 41 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *S. mutans*.

5.1.6 *Enterococcus faecalis*

A efetividade antibacteriana contra *E. faecalis* pôde ser constatada apenas nos grupos de teflon e poliacetal com 5% e 10% de AgVO_3 , sendo que em algumas amostras de poliacetal com esmalte com 5% de AgVO_3 não foi identificado halo de inibição; e o mesmo na resina acrílica, sendo que neste material com 2,5% de AgVO_3 no esmalte foi notada a ação do produto (Figura 42).

Figura 42 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *E. faecalis*.

Os substratos não tiveram diferença estatística entre si, incluindo todos os valores de proporção de AgNO_3 e os dois tipos de veículo para a substância – glaze e esmalte (Tabela 7 e Gráfico 7) ($p>0,05$). Da mesma forma, não houve diferença entre esses tratamentos superficiais (Tabela 8 e Gráfico 8) ($p>0,05$).

Tabela 7 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. faecalis* de acordo com o substrato com AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetel ^a	1,87	3,44
Teflon ^a	2,45	3,29
Resina Acrílica ^a	2,58	3,51

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 7 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E. faecalis* nos substratos com AgVO_3 em diferentes concentrações.

Tabela 8 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. faecalis* de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos:

Tratamento	Média	Desvio-Padrão
Glaze^a	1,41	2,69
Esmalte^a	3,19	3,78

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 8 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E. faecalis* nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO_3 em diferentes concentrações.

Em relação à diferenciação entre as concentrações notou-se que 5% e 10% de AgVO_3 apresentaram efeito antibacteriano semelhante ($p=0,17$), da mesma forma que não houve diferença estatística entre filmes com 0% e 2,5% de AgVO_3 ($p=0,98$) (Tabela 9 e Gráfico 9).

Tabela 9 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *E. faecalis* de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
0% ^a	0	—
2,5% ^a	0,33	1,41
5% ^b	3,55	3,31
10% ^b	5,33	3,71

Gráfico 9— Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *E. faecalis* nas diferentes proporções de AgVO_3 .

5.1.7 *Staphylococcus aureus*

Em relação a *S. aureus* o resultado foi satisfatório em todas as concentrações de AgVO_3 (Figura 43), apesar de que em algumas amostras não foi possível detectar a presença de halo de inibição na concentração de 2,5% e 5% no esmalte aplicado; além de 10% sob a forma de esmalte no teflon e poliacetal. As médias e desvios-padrão foram calculados estatisticamente avaliando a influência do substrato nos

resultados (Tabela 10 e Gráfico 10) que revelaram que os materiais não apresentaram diferença entre si ($p=0,58$).

Figura 43- Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *S. aureus*.

Tabela 10 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *S. aureus* de acordo com o substrato com AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetal ^a	2,87	3,26
Teflon ^a	3,87	3,44
Resina Acrílica ^a	3,52	3,42

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 10 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *S.aureus* nos substratos com AgVO_3 em diferentes concentrações.

A diferença entre o tipo de filme para tratamento superficial aplicado sobre os substratos, entretanto, mostraram-se com diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$) (Tabela 11 e Gráfico 11).

Tabela 11 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *S. aureus* de acordo com o tipo de tratamento superficial nos substratos:

Tratamento	Média	Desvio-Padrão
Glaze ^a	4,23	3,54
Esmalte ^b	2,61	2,99

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 11 – Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *S. aureus* nos filmes glaze e esmalte com aplicação AgVO_3 em diferentes concentrações.

Assim como nos outros micro-organismos que mostraram atividade similar entre as concentrações de 5 e 10% de AgVO_3 , a análise da *S. aureus* revelou diferença estatística entre todos os outros grupos apenas ($p<0,05$) (Tabela 12 e Gráfico 12).

Tabela 12 - Valores médios e desvios-padrão do diâmetro do halo de inibição (mm) da *S. aureus* de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
0% ^a	0	–
2,5% ^b	2,13	2,75
5% ^c	5,36	2,65
10% ^c	6,19	2,49

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 12– Diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento da *S. aureus* nas diferentes proporções de AgVO_3 .

5.1.8 *Candida albicans*

Todas as amostras sobre o meio de cultura com *C. albicans* não mostraram formação de halo de inibição, revelando que o AgVO_3 em qualquer concentração não possui efetividade antibacteriana (Figura 44).

Figura 44 - Placa com corpos de prova posicionados sobre meio de cultura de *C.albicans*.

De modo geral, a ação antibacteriana esteve presente nos micro-organismos: *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S mutans*, *E. faecalis* e *S.aureus*. Entre os materiais utilizados avaliados como substratos sugeridos para aplicação do antimicrobiano não houve diferença, assim como entre os tipos de filme veículos para o AgVO_3 , com exceção do *S. aureus*. A concentração de 10% sempre mostrou maior efetividade, no entanto, sem diferença estatística com 5%.

5.2 Rugosidade Superficial

A rugosidade superficial foi analisada conforme os seus fatores de variação nos diferentes níveis: substrato para aplicação de filme antimicrobiano, tipo de filme veículo e concentração de AgVO_3 . Estas concentrações também foram comparadas separadamente em cada substrato e em cada veículo.

Os valores médios de rugosidade de superfície (R_a) dos substratos estão apresentados na tabela 13 e gráfico 13. Quando os valores foram submetidos a análise de variância, de acordo com o teste ANOVA, mostrou-se que não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,53$).

Tabela 13 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com a substrato com AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetel ^a	3,95	1,92
Teflon ^a	4,30	2,15
Resina Acrílica ^a	4,34	3,45

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 13 – Rugosidade superficial (Ra) dos substratos poliacetel, teflon e resina acrílica.

Ao analisar a rugosidade superficial (Ra) dos grupos sem filme, com glaze, e com esmalte; encontraram-se os valores médios e desvios-padrão representados na tabela 14 e gráfico 14. Segundo os testes de Tukey, entre o glaze e esmalte não houve diferença estatística ($p=0,49$); no entanto, o grupo com ausência do tratamento, com rugosidade superficial menor, foi diferente estatisticamente destes ($p=0,00$).

Tabela 14 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com o tipo de veículo para tratamento superficial nos substratos:

Tratamento	Média	Desvio-Padrão
Sem filme^a	2,62	0,96
Glaze^b	4,58	2,45
Esmalte^b	4,21	2,85

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 14 – Rugosidade superficial (Ra) dos filmes aplicados com AgVO_3 e com ausência de filme.

A Tabela 15 e o gráfico 15 demonstram os resultados da rugosidade superficial (Ra) obtidos em todos os substratos conforme a concentração de AgVO_3 . Ao analisar apenas as concentrações de AgVO_3 , sem considerar o tipo de filme aplicado e o substrato utilizado, a análise de variância mostrou que a diferença entre os grupos foi estatisticamente diferente ($p=0,00$). O Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5%, revelou as amostras com ausência de filme sem diferença estatística com aplicação de filme sem a incorporação de AgVO_3 ($p=1,00$); no entanto, foi diferente dos outros grupos que tiveram a incorporação do pó de AgVO_3 – 2,5%; 5% e 10% ($p=0,00$). O grupo AgVO_3 (2,5%) não teve diferença estatística com AgVO_3 (5%) ($p=0,99$); e AgVO_3 (10%) apresentou diferença com todos os outros grupos ($p=0,00$).

Tabela 15 - Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
Sem filme ^a	2,62	0,96
0% ^a	2,57	1,36
2,5% ^b	4,08	1,80
5% ^b	3,92	2,01
10% ^c	7,02	2,99

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 15 – Rugosidade superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO_3 .

Ao analisar as diferentes concentrações do AgVO_3 incorporado em cada substrato sob a forma de filme de glaze ou esmalte, foram encontrados os valores especificados na tabela 16:

Tabela 16 – Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada substrato:

Concentração AgNO_3	SUBSTRATO					
	Poliacetel		Teflon		Resina Acrílica	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Sem filme	2,81 ^a	0,76	3,12 ^a	0,99	1,92 ^{abc}	0,73
0%	3,16 ^a	1,21	2,84 ^a	1,64	1,70 ^a	0,48
2,5%	4,35 ^b	1,74	4,21 ^{ab}	1,70	3,67 ^{bd}	1,98
5%	3,49 ^a	1,71	4,73 ^{abc}	2,56	3,54 ^{cd}	1,42
10%	5,36 ^b	2,39	6,02 ^c	1,63	9,66 ^e	2,85

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) - em cada coluna de substrato separadamente.

O substrato poliacetal sem aplicação de filme, com filme sem incorporação, e com 5% de AgVO_3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa, apenas com a concentração 10% de AgVO_3 ($p = 0,00$). Dessa forma, a maior concentração da substância antimicrobiana só não foi diferente da concentração de 2,5% ($p > 0,05$) (Tabela e Gráfico 16).

A ausência de filme no teflon não apresentou diferença significativa com todas as concentrações de AgVO_3 , a exceção de 10% ($p = 0,00$), que por sua vez só não apresentou diferença com 5% de AgVO_3 ($p > 0,05$). A aplicação de glaze ou esmalte sem incorporação de AgVO_3 , foi semelhante a 2,5% de AgVO_3 , além da ausência de filme; e 2,5% e 5% de AgVO_3 também não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela e Gráfico 16).

O substrato resina acrílica mostrou diferença estatística entre as diferentes concentrações de AgVO_3 . A ausência de filme foi diferente apenas da concentração de 10%, porém esta apresentou esta diferença também com todas as concentrações ($p = 0,00$). A aplicação de filme sem AgVO_3 não apresentou diferença estatística com

a ausência do filme, e foi semelhante as concentrações diversas. 2,5% de AgVO_3 foi semelhante a 5% ($p>0,05$) (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Rugosidade Superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO_3 em cada substrato.

Os valores médios da rugosidade superficial nos distintos filmes glaze e esmalte e seus respectivos desvios-padrão estão especificados na tabela 17:

Tabela 17 – Valores médios e desvio-padrão da rugosidade superficial (Ra) de acordo com a concentração de AgVO_3 em cada tipo de tratamento superficial:

Concentração AgVO_3	Glaze		Esmalte	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
0%	2,80 ^a	1,28	2,33 ^a	1,41
2,5%	4,63 ^b	1,90	3,52 ^a	1,54
5%	4,61 ^b	2,40	3,23 ^a	1,20
10%	6,65 ^c	2,80	7,38 ^b	3,17

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$) - em cada coluna de tipo de veículo de AgVO_3 separadamente.

De acordo com resultados expostos, amostras com glaze sem incorporação de AgVO_3 foram diferentes estatisticamente de todas as amostras que tiveram aplicação do antimicrobiano em qualquer concentração ($p=0,00$). Entre 2,5% e 5%

de AgVO_3 não houve diferença estatística ($p>0,05$) e a proporção de 10% apresentou diferença significativa com todas as outras concentrações ($p=0,00$). No esmalte todos os valores de concentração de AgVO_3 só tiveram diferença estatística com a concentração de 10% ($p=0,00$), assim como observado no grupo com glaze (Tabela 17 e Gráfico 17).

Gráfico 17 – Rugosidade Superficial (Ra) das diferentes concentrações de AgVO_3 em cada tipo de tratamento superficial.

5.3 Dureza Rockell Superficial

As médias e desvios-padrão obtidos na análise da dureza superficial de cada grupo de substrato estão especificado na tabela 18 e no gráfico 18:

Tabela 18 - Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) de acordo com o substrato com aplicação de AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Poliacetel ^a	83,0	10,2
Teflon ^b	67,1	19,6
Resina Acrílica ^b	62,3	22,2

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 18 – Dureza superficial dos substratos poliacetal, teflon e resina acrílica.

De acordo com os resultados da análise da dureza superficial em cada substrato, somente os grupos de teflon e resina acrílica foram semelhantes ($p > 0,05$), havendo diferença estatística entre o poliacetal com os demais grupos ($p = 0,00$).

Nos materiais que não tiveram filme aplicado, e com glaze ou esmalte, foram encontrados os valores especificados na tabela 19 e gráfico 19; sendo que a presença de tratamento superficial não apresentou diferença com o grupo controle sem filme ($P > 0,05$), com diferença estatística apenas entre o glaze e esmalte ($p = 0,02$).

Tabela 19 - Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial (HR15Y adaptado) de acordo com o tipo de tratamento superficial com AgVO_3 :

Substrato	Média	Desvio-Padrão
Sem filme ^{ab}	72,8	18,6
Glaze ^a	73,9	18,6
Esmalte ^b	67,2	21,4

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Gráfico 19 – Dureza superficial (HR15Y_{adaptado}) dos filmes aplicados com vanadato de prata e com ausência de filme.

A análise dos valores das diferentes concentrações de incorporação de AgVO_3 , demonstradas na tabela 20 e gráfico 20; apontaram que só houve diferença significativa entre as concentrações de 5 e 10% ($p=0,00$), sendo todos os outros grupos e o grupo com a ausência de filme semelhantes entre si ($p>0,05$).

Tabela 20 - Valores médios e desvios-padrão da dureza superficial (HR15Y_{adaptado}) de acordo com a concentração de AgVO_3 :

Concentração de AgVO_3	Média	Desvio-Padrão
Sem filme ^{ab}	72,8	18,6
0% ^{ab}	69,8	20,2
2,5% ^{ab}	70,1	21,7
5% ^a	79,1	14,5
10% ^b	63,1	21,0

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p<0,05$).

Gráfico 20 – Dureza superficial ($\text{HR15Y}_{\text{adaptado}}$) das diferentes concentrações de AgVO_3 .

Ao avaliar a influência das concentrações da incorporação de AgVO_3 em cada material, foi possível encontrar as médias e desvio-padrão especificados na tabela 21. Nos grupos em que o poliacetal e a resina acrílica foram analisados foi possível notar que o tratamento de superfície, independente de sua concentração, não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, no grupo de teflon, as amostras AgVO_3 (10%) e os grupos com ausência de filme e AgVO_3 (5%), tiveram diferença significativa ($p = 0,00$) (Tabela e Gráfico 21).

Tabela 21 – Valores médios e desvio-padrão da dureza Rockwell superficial (HR15Y_{adaptado}) de acordo com a concentração de AgVO₃ em cada substrato:

Concentração AgNO ₃	SUBSTRATO					
	Poliacetel		Teflon		Resina Acrílica	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Sem filme	87,9 ^a	2,23	76,2 ^{ab}	12,6	54,5 ^a	17,8
0%	77,9 ^a	18,3	65,9 ^{abc}	18,4	65,7 ^a	22,2
2,5%	83,3 ^a	6,39	66,1 ^{abc}	19,8	61,1 ^a	27,4
5%	85,5 ^a	4,55	79,6 ^{ab}	12,4	72,4 ^a	19,7
10%	83,1 ^a	6,56	52,2 ^c	19,8	53,9 ^a	17,6

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) - em cada coluna de tipo de veículo de AgVO₃ separadamente.

Gráfico 21 – Dureza Rockwell Superficial (HR15Y_{adaptado}) das diferentes concentrações de AgVO₃ em cada substrato.

As diferenças entre os valores de dureza das concentrações de AgVO₃ em cada tipo de filme veículo da substância (tabela 22 e gráfico 22) demonstraram que no glaze a diferença estatística ocorreu somente entre 10% com 2,5% e 5% ($p = 0,00$); e no esmalte todos os grupos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$).

Tabela 22 – Valores médios e desvio-padrão da dureza superficial (HR15Y_{adaptado}) de acordo com a concentração de AgVO₃ em cada tipo de tratamento superficial:

Concentração AgVO ₃				
	Glaze		Esmalte	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
0%	72,6 ^{ab}	17,6	67,1 ^a	22,5
2,5%	78,3 ^a	14,9	62,0 ^a	24,6
5%	82,7 ^a	10,0	75,6 ^a	17,3
10%	62,1 ^b	23,2	64,0 ^a	19,0

Letras minúsculas diferentes na linha indicam resultados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) - em cada coluna de tipo de veículo de AgVO₃ separadamente.

Gráfico 22 – Dureza Rockwell Superficial (HR15Y_{adaptado}) das diferentes concentrações de AgVO₃ em cada tipo de filme aplicado.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As figuras 45 a 53 foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e mostram os substratos poliacetal, teflon e resina acrílica com a aplicação gradativamente crescente de vanadato de prata nos filmes glaze e

esmalte, em comparação a ausência de aplicação de tratamento superficial. Foi possível notar em todas as amostras que cada superfície onde foi aplicado o filme era homogênea em relação à concentração de alterações; no entanto, foram selecionadas imagens que apresentassem uma melhor visibilidade das irregularidades superficiais.

Figura 45 –Superfície de poliacetal sem aplicação de filme superficial.

Figura 46 –Superfície de poliacetal com glaze incorporado com AgVO₃ em
A) 0%; **B)** 2,5%, **C)** 5%; **D)** 10%.

Figura 47 –Superfície de poliacetal com esmalte incorporado com AgVO_3 em A) 0%; B) 2,5%, C) 5%; D) 10%.

Figura 48 - Superfície de teflon sem aplicação de filme superficial.

Figura 49 – Superfície de teflon com glaze incorporado com AgVO_3 em
A) 0%; B) 2,5%; C) 5%; D) 10%.

Figura 50 – Superfície de teflon com esmalte incorporado com AgVO_3 em
A) 0%; B) 2,5%; C) 5%; D) 10%.

Figura 51 – Superfície de resina acrílica sem aplicação de filme superficial.

Figura 52 – Superfície de resina acrílica com glaze incorporado com AgVO₃ em A) 0%; B) 2,5%, C) 5%; D) 10%.

Figura 53 – Superfície de resina acrílica com esmalte incorporado com AgVO_3 em **A)** 0%; **B)** 2,5%, **C)** 5%; **D)** 10%.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os biofilmes são colonizações bacterianas que se formam nos tecidos da cavidade oral, e constituem um problema geral para os biomateriais, como os implantes dentais (De Giglio et al., 2013). Apesar de dispositivos instalados em outras partes do corpo humano também serem vulneráveis ao depósito de biofilme, existem diferenças na interpretação da formação do biofilme intra-oral, pois o meio bucal é naturalmente colonizado por uma grande variedade de espécies microbianas, e a doença que nele se instala, resulta do desequilíbrio entre os diferentes micro-organismos (Busscher et al., 2010).

Próteses de quadril, de joelho, enxertos vasculares, são inseridos em ambientes que normalmente são completamente desprovidos de micro-organismos. Diferentemente, próteses intra-orais inseridas no meio bucal, recebem a saliva que possui uma concentração de micro-organismos na ordem de 10^9 unidades formadoras de colônia por mL^{-1} (Busscher et al., 2010), um sistema de fluido perfeito que permite que a sua microbiota presente colonize os dentes e superfícies artificiais que possuem uma película adquirida de glicoproteína, e até mesmo os sulcos peri-implantares (Lang et al., 2000).

Apesar da saliva conter algumas substâncias antimicrobianas tais como a lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase e IgA secretoras; se apresenta também como um suporte significativo para adesão bacteriana, sendo um aspecto crítico para a colonização e determinante para o tipo e quantidade de bactérias que irá aderir às superfícies. Isso ressalta a importância das análises *in vivo*, para um trabalho posterior na observação da influência que a saliva pode ter tanto na adesão bacteriana, como na inibição de crescimento (Almaguer-Flores et al., 2010).

Além disso, características clínicas que refletem a resposta inflamatória tais como sangramento à sondagem, inflamação da mucosa e acúmulo de placa bacteriana peri-implantar, devem ser analisados frente a aplicação de uma substância antimicrobiana tópica, como o vanadato de prata sugerido; tal como foi observado por Andrade et al. (2012) ao analisar a pasta de iodofórmio aplicada em cicatrizadores após a reabertura de implantes. Apesar de não encontrarem clinicamente resultados estatísticos significantes que diferenciasssem as regiões com e sem aplicação da pasta, foi possível verificar que o maior tempo de análise seria necessário para avaliar a eficácia do efeito antimicrobiano, enfatizando a importância das avaliações clínicas.

Apesar da maioria dos biofilmes orais serem removidos por medidas de higiene oral, como a escovação; o processo de acúmulo se reinicia constantemente. Além disso, existem nichos que proporcionam condições ecológicas ideais para o crescimento bacteriano como as amígdalas e dobras da língua (Lang et al., 2000), e existem espaços que facilitam a deposição do agregado polimicrobiano e possuem a remoção dificultada; como bolsas subgengivais, fissuras e espaços interproximais (Busscher et al., 2009).

Nos implantes a situação se torna ainda mais preocupante, pois não é possível a remoção mecânica do biofilme, sendo preciso recorrer a intervenções cirúrgicas (Busscher et al., 2009). Assim, muitas vezes os implantes ou dispositivos infectados têm que ser substituídos causando um desconforto ao paciente e uma responsabilidade significativa ao cirurgião (Busscher et al., 2010).

Com a contaminação bacteriana nos implantes dentários, inicia-se como reação de defesa a inflamação dos tecidos peri-implantes. Esta resposta do hospedeiro pode afetar os tecidos de sustentação, inicialmente como uma

inflamação nos tecidos moles – a mucosite; a qual pode evoluir para processo que acarreta a perda óssea de caráter irreversível – a peri-implantite. Nesses estágios da doença infecciosa, ocorre a diminuição gradual da estabilidade do implante até sua consequente perda (Andrade et al., 2012, De Giglio et al., 2013).

De acordo com os fatores envolvidos no desenvolvimento da doença peri-implantar, assim como a gravidade das suas possíveis consequências, mais estudos são necessários, sobretudo de caráter clínico, que avaliem possíveis formas de combate às infecções, redução dos fatores que facilitem o seu desenvolvimento, ou formas de prevenção da doença.

Segundo Berglundh et al. (2002), ao analisarem 29 estudos que forneciam informações sobre a peri-implantite; constataram que a perda dos implantes ocorre em cerca de 2,5% dos casos antes da aplicação de carga sobre a prótese dentária a ser instalada; portanto, provavelmente causada por infecção peri-implantar. Entretanto, os mesmos autores relataram que a interpretação dos dados sobre a incidência da doença peri-implantar é difícil, pois existem diferentes métodos e tipos de abordagem nos processos de avaliação. Dessa forma, os índices de perda de implante e peri-implantite variam consideravelmente, também influenciadas pela diferença nas populações estudadas e nos fatores de risco incluídos nas amostras em análise, como os diferentes períodos de tempo da instalação da prótese (Costa et al., 2012).

Estudos que abordam dados sobre a incidência de fatores biológicos ou técnicos na falha ou contaminação bacteriana dos implantes ainda devem ser interpretados com cautela, pois representam respectivamente 40- 60% e 60-80% dos estudos sobre implantes avaliados com pelo menos 5 anos de instalação, sendo

a maioria dos trabalhos (96-100%) atribuída aos índices de perda do implante (Berglundh et al., 2002).

No entanto, muitos estudos apontam que a incidência da peri-implantite está associada a presença de periodontite ativa, representando 54,4% dos pacientes no estudo de Charalampakis et al. (2012). Provavelmente, a presença de micro-organismos periodontais que permanecem por um longo período de tempo nos sítios infectados, torna pacientes que receberam implantes, mais suscetíveis a doença peri-implantar, pois as bolsas periodontais funcionam como reservatórios de bactérias que podem colonizar implantes (Quirynen et al., 2006). Assim, com a indicação gradativamente crescente dos implantes dentais, cirurgiões devem se manter em alerta sobre a manutenção de um meio bucal com ausência de infecção, sobretudo, periodontal (Charalampakis et al., 2012; Esposito et al., 2012).

O controle das infecções periodontais e da sua consequente resposta inflamatória, é sugerido como forma preventiva no desenvolvimento da doença peri-implantar (Andrade et al., 2012), permitindo que se mantenha a osseointegração e dessa forma, o sucesso do implante.

Costa et al. (2012) mostrou altos valores de incidência da peri-implantite em seu estudo clínico, mas diferenciou grupos que receberam manutenção preventiva e que não tiveram acompanhamento após a instalação do implante, sendo 18% e 43,9%, respectivamente. Na população total estudada, a presença de 31,2% dos pacientes com peri-implantite pode ser explicada pelo fato que a maioria da amostra populacional não frequentou as visitas de manutenção, um significativo potencial de risco para a suscetibilidade da doença peri-implantar. Isto ressalta que, estando presente a mucosite, é recomendada uma manutenção e um contínuo acompanhamento dos parâmetros clínicos da alteração dos tecidos adjacentes aos

implantes, principalmente em indivíduos periodontalmente comprometidos (Heitz-Mayfield et al., 2014)

Por meio de revisão sistemática, Heitz-Mayfield et al. (2014) procuraram avaliar os efeitos da adesão à terapia periodontal de suporte (TPS) na ocorrência de complicações biológicas e perda do implante. Apesar da falta de ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais incluindo a adesão e falta de adesão ao TPS foram considerados valiosos no fim de estimar seus efeitos sobre a longevidade dos implantes. Seus resultados mostraram que as altas taxas de sucesso podem ser alcançadas por pacientes totalmente desdentados que aderem a TPS.

Sabe-se que existem resultados satisfatórios à longo prazo no tratamento da periodontite com instruções detalhadas de higiene oral juntamente ao debridamento mecânico das superfícies radiculares, além da administração profissional na terapia de manutenção. Apesar do tratamento da peri-implantite indicado ser semelhante, o debridamento mecânico em superfícies de implantes é dificultado, pois o uso de curetas de aço deve ser evitado. Os resultados do tratamento cirúrgico ainda são imprevisíveis, pois não garantem estabilidade sem a reinfecção (Esposito et al., 2012). Além disso, o formato e o *design* dos implantes muitas vezes impossibilitam o acesso às regiões contaminadas para um completo debridamento (Heitz-Mayfield et al., 2010)

Dessa forma, embora o debridamento da superfície dos dentes contaminados muitas vezes seja indicado como tratamento da periodontite; a descontaminação da superfície de implantes é mais sugerida como terapia das infecções peri-implantares. Agentes antimicrobianos com eficácia comprovada, utilizados em sulcos peri-implantares ou como enxaguatório bucal, devem ser utilizados a fim de eliminar os reservatórios de placa. Independente da rugosidade da superfície do implante e da

sua configuração, o debridamento cirúrgico não é eficaz sozinho, sendo então sugerido o uso de soluções antissépticas (Heitz-Mayfield et al., 2010). Assim, a liberação controlada de agentes antibacterianos diretamente no local do implante pode ser uma abordagem eficaz no tratamento das infecções peri-implantares (De Giglio et al., 2013).

O mecanismo tópico de ação do vanadato de prata foi indicado nesse trabalho para aplicação em dispositivos na Implantodontia, de acordo com essas limitações do tratamento da doença peri-implantar, assim como devido aos índices tão frequentes de incidência desse desequilíbrio da saúde bucal inerente aos implantes dentais.

Apesar dos dados relatados, e da sugestão de um novo antimicrobiano para impedir a peri-implantite, deve-se haver prudência na extrapolação dos resultados das análises laboratoriais para a prática clínica (Estrela et al., 2006). Ainda existem poucos estudos que avaliaram a eficácia dos protocolos antissépticos combinados ao debridamento cirúrgico, apesar de muitos serem relatados como suficientes para tratar a mucosite peri-implantar (Heitz-Mayfield et al., 2010).

Entretanto, embora a resposta do hospedeiro ao desafio microbiano na mucosite peri-implantar pareça ser idêntica à observada na gengivite, a resposta inflamatória provocada pode ser mais pronunciada e com progressão mais rápida nos tecidos da mucosa peri-implantar que na unidade dento-gengival, provavelmente devido as diferenças estruturais. Apesar da periodontite e peri-implantite não apresentam diferenças significantes nas perspectivas da etiologia, patogênese, fatores de risco, diagnóstico e terapia; existe diferença na resposta do hospedeiro, o que pode explicar a rápida progressão das lesões de peri-implantite. Dessa forma, o

diagnóstico da peri-implantite deve ser o mais precoce possível (Heitz-Mayfield et al., 2010).

A contaminação bacteriana é motivo de bastante preocupação não só em equipamentos e materiais odontológicos, mas também em variadas áreas como dispositivos médicos, hospitais, produtos de saúde, sistemas de purificação de água, embalagens e armazenamento de alimentos e saneamento doméstico. Entretanto, atenção especial tem sido dada nas áreas médicas e odontológicas que utilizam dispositivos biomédicos como cateteres permanentes ou implantes.

Pesquisadores preocupam-se com o emprego dos biomateriais, pois podem levar a serias infecções associadas ao seu uso, e muitas vezes são resistentes a múltiplos antibióticos (Di Giulio et al., 2013). Os implantes já representam quase metade de todas as infecções nosocomiais. Estas infecções muitas vezes requerem a remoção do implante, devido ao sucesso deficiente do tratamento, devendo ser mais pesquisadas as formas de prevenção da doença, como a liberação de substâncias antimicrobianas (Kenawy et al., 2007).

Para aplicação clínica na área médica e/ou odontológica, compostos químicos antimicrobianos precisam ser previamente desenvolvidos e avaliados laboratorialmente. Diversos métodos que estudam o crescimento e a maturação da placa bacteriana são utilizados em superfícies naturais e artificiais; como a microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e cultura bacteriana. A presença de bactérias em sítios peri-implantares, indicativas de uma microbiota patogênica; pode ser detectada por meio de ensaios enzimáticos, ensaios com sondas de DNA, cultura anaeróbia e os ensaios de PCR em tempo real (Galassi et al., 2012).

Variadas metodologias são indicadas, contudo, o meio de cultura bacteriano, apesar de suas limitações como a probabilidade da recuperação das bactérias periodontopatogênicas não corresponderem às proporções reais no paciente; demorada preparação de culturas devido às bactérias periodontais normalmente serem anaeróbias com tendência ao crescimento lento; e meios seletivos serem restritos ao crescimento de muitas espécies (Casado et al., 2011; Galassi et al., 2012); é considerado como o padrão ouro do diagnóstico de quantificação e detecção da microbiota patogênica dos sítios periodontais (Galassi et al., 2012). Este método foi escolhido em nosso estudo para avaliar a eficácia do antimicrobiano proposto contra os micro-organismos selecionados.

Existe um crescente interesse no desenvolvimento de sistemas de prevenção alternativos seguros, eficazes e econômicos, bem como em novos tratamentos e produtos para doenças orais. Durante as últimas décadas muitos estudos têm se preocupado com a avaliação da atividade antimicrobiana de materiais poliméricos. Uma grande contribuição para a melhoria das terapias inovadoras para doenças relacionadas com o biofilme é dada por sistemas em nanoescala devido ao seu tamanho sintonizável (Di Giulio et al., 2013).

Após pesquisa em bases de dados eletrônicas, apesar de encontrados estudos que avaliassem a efetividade antimicrobiana em diversos nanocompostos, não foi encontrado nenhum estudo semelhante a ser comparado com os resultados desse estudo. AgVO_3 é uma substância antimicrobiana desenvolvida recentemente (Holtz et al., 2010) e poucas aplicações foram testadas até o presente momento (Holtz et al., 2012), sobretudo em materiais odontológicos. Portanto, este trabalho foi discutido de acordo com análises de outras substâncias químicas antimicrobianas, principalmente nanoparticuladas e com prata na sua composição; com objetivo de se

mostrar sua efetividade, relacionada ao uso de diferentes substratos, filmes superficiais e concentrações do nanocomposto.

A seleção dos micro-organismos padrão para análise da efetividade antimicrobiana do AgVO_3 , foi baseada em alguns estudos que apresentaram dados de patógenos presentes em sítios peri-implantares / periodontais. Devido à alta complexidade e variedade de espécies no meio bucal, esta escolha se preocupou em incluir espécies de tipos diferentes de fisiologia e características morfológicas.

Sabe-se que a microbiota presente na cavidade oral tem um impacto substancial na formação de biofilme em implantes recém-instalados, evidenciado pela presença da composição microbiana bastante semelhante à dos tecidos saudáveis circundantes aos elementos dentais. Também há o conhecimento de que, de maneira geral, a etiologia e patogênese da periodontite e da peri-implantite possuem muitas semelhanças. Ambas são dependentes inicialmente de um biofilme contendo patógenos e possuem uma microbiota rica em bactérias gram-negativas (Heitz-Mayfield et al., 2010). Assim, os micro-organismos selecionados neste trabalho para análise antimicrobiana da nanocomposto, não precisaram ser os característicos da microbiota peri-implantar, abrangendo essa análise a outras bactérias e leveduras presentes no meio bucal, que podem também ser observadas em sulcos peri-implantares devido ao complexo sistema.

Utilizando o método de reação de cadeia da polimerase (PCR), o estudo de Casado et al. (2011) avaliou quais espécies de periodontopatógenos estão presentes em sítios peri-implantares subgingivais em pacientes desdentados parciais. Os fluidos dos sulcos peri-implantes coletados demonstraram a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. No entanto, as bactérias

foram encontradas tanto em áreas periodontais saudáveis como em sítios com a presença das doenças mucosite ou peri-implantite; o que levou a conclusão de que o histórico da doença periodontal pode estar ligado a infecção de tecidos peri-implantares (Heitz-Mayfield et al., 2014).

Ainda existem muitas controvérsias e variedades nos resultados de quais seriam os micro-organismos responsáveis pela infecção peri-implantar, como a observação da presença de *P. gingivalis* apenas em sítios infectados, assim como o *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*; dados contraditórios aos estudos de Casado et al. (2011), que encontraram os mesmos em tecidos saudáveis. Não obstante, o crescimento de *A. actinomycetemcomitans* foi notado apenas em 6% dos pacientes com doença peri-implantar, segundo Charamlapakis et al. (2012); não sendo uma bactéria indispensavelmente representativa da peri-implantite, e não estando presente neste estudo.

O mesmo foi observado em *S. aureus*, que apesar de muitas vezes discutido na etiopatogenia da peri-implantite, identificado como um agente patogênico na iniciação de alguns casos de peri-implantite; não foi detectado em 91,9% dos casos, avaliados por Charamlapakis et al. (2012). Entretanto, o mesmo foi selecionado como micro-organismo padrão deste trabalho por ser identificado em estudo anterior como sensível ao AgVO₃ (Holtz et al., 2010; 2012), objetivando-se analisar essa mesma atividade quando aplicado nos substratos e tipos de veículos utilizados. Além disso, apesar de poder permanecer em estado dormente por vários anos após a entrada no corpo, pode compor o biofilme com sinais clínicos de infecção quando o hospedeiro é imunocomprometido (Busscher et al., 2010).

Por outro lado, análises de cultura revelaram que *P. intermedia* foi uma das espécies mais frequentemente encontrada com moderado ou intenso crescimento

em doenças peri-implantares (27,3%); assim como *Pseudomonas spp.* (18,6%) (Charamlapakis et al. 2012); ambas selecionadas na nossa análise de efetividade do antimicrobiano proposto.

Assim, apesar de designações associadas à progressão da doença periodontal como o complexo vermelho, formado pela tríade de bactérias *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*; estas não podem refletir um padrão descritivo da doença em todos os casos, uma vez que as espécies podem variar. Bactérias específicas ou grupos de bactérias não devem ser responsáveis por uma caracterização padrão da peri-implantite, pois a mesma pode se designar como uma infecção endógena subepitelial polimicrobiana ou até menos uma infecção oportunista exógena com a detecção de bacilos aeróbicos gram-negativos prevalentes; e não uma mono-infecção específica (Charamlapakis et al. 2012). Além disso, nem todos os indivíduos são igualmente sensíveis e / ou existe variação na virulência e potencial de patogenicidade das bactérias (Mombelli et al., 2002).

O que se sabe é que existe uma relação da periodontite e peri-implantite, com uma fisiopatologia e um perfil bacteriano semelhante. A informação de que a colonização nos tecidos peri-implantes ocorre em cerca de 1 a 2 semanas após a colocação do *abutment* (Quirynen et al. 2006), sugere como tratamento da infecção bacteriana em implantes, o usado com sucesso na periodontite (Cho-yan Lee et al., 2012), uma vez que provavelmente deve ocorrer a translocação dos periodontopatógenos para os sítios adjacentes ao implante.

Por isso, a *P. gingivalis*, sendo frequentemente encontrada em bolsas periodontais, foi selecionada para este trabalho. Mesmo quando a doença periodontal recebe tratamento, bolsas residuais podem atuar como reservatórios desta bactéria, de acordo com Galassi et al. (2012) e Heitz-Mayfield et al. (2014); e

podem influenciar na colonização dos sulcos peri-implantares (Lang et al., 2000), região em que o dispositivo de Implantodontia proposto com AgVO₃ estaria em contato numa situação clínica. Além disso, *P. gingivalis* é considerada um fator etiológico chave para as fases precoces da doença periodontal e peri-implantar, justificando mais uma vez sua avaliação, já que sugerimos, sobretudo, a possibilidade de uso no nanocomposto nos cicatrizadores de implantes, componentes de contato inicial com a microbiota do meio bucal.

A colonização dos implantes orais já vem sendo estudada desde o final da década de 1980 em desdentados, por meio da técnica do meio de cultura. Relatam que após uma semana de instalação do implante é observada uma microbiota predominantemente gram-positiva, com micro-organismos facultativos; e durante 6 meses se estabelece um meio rico em bactérias gram-negativas anaeróbias. Estudos mais recentes têm avaliado a colonização de implantes em indivíduos desdentados parciais, evidenciando que ocorre uma colonização bacteriana imediatamente após a colocação transmucosa do implante, o qual permanece estável durante 2 semanas; e modifica-se após o terceiro mês, já se apresentando preditiva para a colonização após 1 ano (Heitz-Mayfield et al., 2010).

Portanto, os biofilmes são multi-espécies e se comportam dinamicamente com constante evolução, não devendo ser vislumbrados como a soma de todos os componentes. Assim, são mais importantes os conhecimentos sobre a complexidade das comunidades e suas interações (Moons et al., 2009). Dessa forma, este estudo se preocupou em selecionar micro-organismos variados presentes na cavidade bucal, para se determinar a eficácia do AgVO₃ frente a variadas situações, tal como ocorre no complexo sistema microbiótico oral.

Estudos relatam que a mudança do biofilme bacteriano de uma composição de perfil mais comensal para mais patogênica, com a inclusão de leveduras, é mais influenciada pela condição geral do paciente, que pelo material da prótese e suas propriedades de superfície (Avon et al., 2007). Portanto, os resultados encontrados nesse estudo, no qual todos os substratos propostos não apresentaram diferença no efeito antimicrobiano aos micro-organismos que apresentaram resultado, corroboram com essa afirmação. Pois essa análise avaliou a diferença entre os materiais sem considerar o tipo de filme aplicado e a porcentagem do AgVO_3 ; e por ser uma avaliação laboratorial não considerou alterações sistêmicas e de infecções locais com toda sua complexidade, que podem ocorrer em situações clínicas.

O conhecimento das possíveis diferenças entre o mecanismo de adesão bacteriana nas superfícies metálicas e nos polímeros não condutores é limitado. Entretanto, sugere-se que a transferência de elétrons desempenha uma influência na adesão bacteriana aos materiais condutores, como os metais utilizados nos dispositivos da Implantodontia, por meio de uma força atrativa eletrostática (Busscher et al., 2010). Assim, a sugestão dos materiais não condutores elétricos – como o teflon e a resina acrílica; apesar de escolhidos por prover uma melhor adesão dos filmes glaze/esmalte que o metal; podem desenvolver bons resultados no impedimento da adesão bacteriana.

Mudanças na superfície dos implantes e de seus componentes podem afetar a capacidade de ligação inicial de micro-organismos e, portanto, segundo Moons et. al. (2009) poderiam ser usadas nas aplicações médicas como forma de reduzir o número de agentes patogênicos persistentes.

Os recentes avanços na nanotecnologia têm permitido a modificação do tamanho e da forma das nanopartículas favorecendo diversas aplicações na área da

biociência como o diagnóstico, a prevenção e a terapia de várias doenças (Acosta-Torres et al., 2012, Rai et al., 2014), como o tratamento superficial antimicrobiano de componentes de implantes.

Devido ao uso extensivo de antibióticos de amplo espectro há uma resistência crescente a agentes antimicrobianos clássicos no tratamento das doenças infecciosas (Rai et al., 2014, Rizzello & Pompa, 2014). Quase todos os micro-organismos têm uma notável capacidade intrínseca a desprezar muitas intervenções terapêuticas, graças aos seus mecanismos genéticos evolutivos fáceis e rápidos de ocorrerem (Rizzello & Pompa, 2014). Assim, uma grande ameaça à saúde global tem levado a urgente necessidade de busca de novas alternativas para o tratamento e controle de doenças infecciosas. As AgNPs são consideradas um forte potencial como novos agentes antimicrobianos, por oferecerem vantagens como atividade de amplo espectro e menor tendência para induzir a resistência dos micro-organismos (Rai et al., 2014).

Estudos mostram que as nanopartículas de prata mostram resultados satisfatórios contra diversos patógenos (Ahmad et al. 2011, Rizzello & Pompa, 2014). Neste estudo essa situação favorável da atividade antimicrobiana foi encontrada quando utilizado o AgVO_3 contra a bactéria aeróbia tipo bastonete gram-negativo - *P. aeruginosa*; e contra as bactérias anaeróbias facultativas tipo cocos gram-positivas – *S. mutans*;; *E.faecalis* e *S. aureus* e tipo cocos gram-negativas – *E. coli*;. A análise também revelou que as bactérias anaeróbias tipo bastonetes gram-negativas – *P.intermedia* e *P. gingivalis*, mostraram-se resistentes a ação bactericida do AgVO_3 , assim como a levedura *C. albicans*.

Estes resultados revelam que a ação de materiais nanoparticulados pode ser variada em nível de resposta bactericida de acordo com a bactéria analisada.

A bactéria oportunista *P. aeruginosa*, foi a única bactéria aeróbia analisada em relação a sua resistência contra o nanocomposto sugerido. Sua alta resistência aos antibióticos, que a torna uma importante causa das infecções hospitalares; mostram o resultado positivo perante AgVO_3 como de grande interesse para sua aplicação. Possui capacidade de formação de biofilmes, sendo o mais frequente colonizador de equipamentos médicos, podendo também estar presente na corrente sanguínea e infecções periodontais.

Assim como em nosso estudo, Kwakye-Awuah et al. (2008), também encontraram como resultado a atividade antimicrobiana eficaz contra a *P. aeruginosa*, com o uso de um produto a base de prata. Além dessa bactéria, o zeólito de prata também mostrou resultados positivos contra a *E. coli* e *S. aureus*, dado também observado neste estudo com AgVO_3 . Segundo os autores, sua ação bactericida se deve a lenta, estável e gradual liberação de íons de prata, diferentemente dos antimicrobianos tradicionais que os liberam rapidamente (Matssura et al., 1997; Kwakye-Awuah et al., 2008).

Matssura et al. (1997) também comprovaram, por meio do uso em condicionadores de tecido para prótese total, a ação antibacteriana do zeólito de prata contra a *P. aeruginosa*, além da ação contra *S. aureus*, ambas causadoras de infecção hospitalar respiratória. Monteiro et al. (2009) perceberam que o seu uso não somente em condicionadores de tecido, mas também em enxaguatórios bucais, possui atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* ainda após 4 semanas para os condicionadores e 5 dias para os enxaguatórios. A prolongada capacidade antimicrobiana e a ação contra muitas espécies de micro-organismos, inerentes ao zeólito de prata, reforça a ação positiva que íons de prata podem ter na aplicação da biociência, assim como o encontrado neste trabalho.

A ação inibitória eficaz da prata em relação a *P. aeruginosa* e a *E. coli* também foi notada por Morones et al. (2005), que a utilizou sob a forma de nanopartícula, como neste estudo; o que permite extrapolar o uso do nanocomposto de prata para a área odontológica e sobretudo, para a Implantodontia, área tão vulnerável às infecções.

Utilizando finos filmes de polímeros carregados com nanopartículas de prata como na superfície de implantes, De Giglio et al. (2013) também encontraram inibições bacterianas satisfatórias contra a *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*; além de não encontrarem nenhum efeito citotóxico em osteoblastos humanos após 1 semana de exposição. Os autores sugerem mais estudos para a possível aplicação do seu nanocomposto desenvolvido nos implantes odontológicos e ortopédicos.

A variação da concentração do AgVO_3 foi o único fator de variação que provocou alteração nos resultados da *P. aeruginosa*. Apesar de haver diferença no diâmetro do halo de inibição, todas as proporções do nanocomposto nos veículos aplicados sobre os substratos tiveram ação bactericida. A menor concentração (2,5%) apresentou diferença com a ausência da substância no filme de glaze ou esmalte, e com 5% de AgVO_3 . A maior concentração (10%) já não possuiu diferença com 5%, o que torna dispensável a incorporação de uma maior quantidade de vanadato de prata, com risco de aumento da rugosidade superficial e consequente facilidade de acúmulo de biofilme.

A atividade antibacteriana do AgVO_3 contra *E.coli*, também gram-negativa porém cocos e anaeróbia facultativa, foi bastante similar com a ação contra *P. aeruginosa*, demonstrando efetividade em todas as concentrações do nanocomposto, e proporções de 5 e 10% sem diferença estatística. Entretanto, algumas amostras que possuíam 2,5% de AgVO_3 , tiveram ausência da formação de

halo de inibição, compostas por teflon e poliacetal com esmalte, sugerindo que estes materiais podem ter uma influência negativa.

Uma outra justificativa que permite a compreensão do fato de ora as amostras do mesmo grupo apresentarem efetividade, ora não; seria que os filmes aplicados nesses substratos possuíam áreas com menos AgVO_3 , uma vez que a aplicação não permitia uma perfeita distribuição homogênea da substância antimicrobiana. Alguns aglomerados de pó não se dissolviam por completo, formando áreas com maior deposição, como observado nas figuras obtidas com o MEV, como exemplo as figuras 49-B e 49-D.

O habitat natural da *E. coli* é o lúmen intestinal, entretanto também pode estar presente no meio bucal em menor quantidade. A ação de nanopartículas de prata e seus compostos contra a *E. coli* além de observada no presente estudo e nos trabalhos de Morones et al. (2005) e Kwakye-Awuah et al. (2008), também já foi encontrada no estudo realizado na Universidade de Londres, Reino Unido, demonstrada juntamente a ação contra *S. aureus* resistentes a Meticilina (MRSA), além de alguns vírus (Allaker & Ren, 2008). Por meio da respirometria e ensaio de fluorescência de microtitulação, Choi et al. (2008) avaliaram os efeitos inibidores da nanopartículas de prata sobre o crescimento microbiano e observaram que cerca de 0,5 mg / L de prata inibiram o crescimento da *E. coli* em $55 \pm 8\%$, provavelmente pela corrosão da parede celular, indicando o uso dessa substância no tratamento de água.

O nanocomposto AgVO_3 mostra uma efetividade antibacteriana 30 vezes mais eficiente que a Oxacilina contra a *E.coli*, além de MRSA e *E. faecalis* no estudo de Holtz et al. (2012). Os resultados dos nanofios $\beta\text{-AgVO}_3$, apesar de semelhantes aos encontrados em AgNPs com diâmetros de 20 a 25 nm, se analisados em termos

de conteúdo de massa de Ag, apresentam maior atividade. Assim, sugere-se que os nanofios β -AgVO₃ podem ter influenciado positivamente nos resultados, uma vez que atuam como suporte para AgNPs, conduzindo a um processo contínuo de liberação de íons de prata e evitando o possível problema da aglomeração, importante para manutenção de uma grande área de superfície (Holtz et al. 2012).

A ótima ação do AgVO₃ pode ser explicada pelas possíveis mudanças por ele causadas como: alteração da morfologia da célula bacteriana, ligação ao DNA afetando o metabolismo da bactéria como a divisão celular e até a morte, aumento da permeabilidade da membrana, e formação de espécies reativas de oxigênio pelos íons de Ag. O nível de oxidação das células foi mostrado também no estudo de Holtz (2012) como influente na atividade antibacteriana, onde a *E. coli* tratada com AgNPs parcialmente oxidadas demonstraram uma diminuição de 90% do nível de ATP celular bacteriano; em detrimento de AgNPs com valência zero que mostrou os mesmos níveis de ATP que as estirpes controle de *E.coli*.

O AgVO₃, além das suas atividades favoráveis a morte celular e inibição do crescimento bacteriano, possui os nanofios β -AgVO₃ com uma atividade antibacteriana intrínseca. O vanádio no estado oxidado também pode se ligar aos grupos tiol de proteínas celulares e formarem complexos estáveis. Além disso, o próprio processo de oxidação-redução leva ao estresse oxidativo das células bacterianas, e melhoram ainda mais o potencial do β -AgVO₃. As AgNPs não foram possíveis de serem isoladas do β -AgVO₃ para este ser avaliado sem sua adição, porque este material é híbrido, obtido por um processo de etapa única. Entretanto, o desenvolvimento desse nanofio por Holtz et al. (2012) com as AgNPs se mostra bastante promissor, com seus resultados tão satisfatórios em amplo espectro.

Dessa forma, o efeito antibacteriano de vanadato de prata contra *E. coli*, como em nosso estudo, também foi pesquisado por Holtz et al. (2012); que avaliaram sua utilização em concentração de 1% (m/v) em tintas à base de água para locais com maiores chances de contaminações e infecções, como hospitais. Os autores também constataram resultados favoráveis; assim como em outras bactérias tais como MRSA, *E. faecalis* e outras bactérias tipo gram-negativas – concordando com achados em nosso estudo, o que indica um amplo espectro de efeito antimicrobiano.

Apesar desse resultado favorável, essa pequena porcentagem de 1% provavelmente não se mostraria eficaz com a utilização dos substratos e veículos selecionados, pois apenas 5 e 10% mostraram atividade antibacteriana em todas as amostras analisadas em triplicata, havendo algumas vezes a ausência da formação do halo de inibição em amostras com proporções de AgVO_3 em 2,5%. Mais uma vez, entre 5 e 10%, assim como na avaliação da *P. aeruginosa*, houve eficácia semelhante do nanocomposto, o que sugere a desconsideração dessa concentração.

A utilização de *S. mutans*, apesar de ser uma bactéria específica associada a cárie (Di Giulio et al., 2013), foi selecionada nesse estudo, considerando está presente no meio bucal e que seu acúmulo permite a formação de um biofilme mais patogênico, envolvendo a agregação de leveduras (Busscher et al. 2010).

A substantividade de antibióticos, como a Vancomicina e Tetraciclina na formação da placa bacteriana e cárie dental, já é mostrada à longa data *in vivo* por meio do uso em enxaguatórios ou géis bucais na supressão de *S. mutans* (Baker et al. 1983).

Sabendo que a redução na aderência de *S. mutans* nos compósitos adesivos ortodônticos é essencial para a prevenção da desmineralização do esmalte, Ahn et al. (2009) incorporou nanopartículas de prata nesses materiais. Os resultados encontrados mostraram efeito inibidor do crescimento da bactéria cariogênica e segundo os autores, provavelmente pelo contato direto com o micro-organismo e não pela liberação de íons de prata. Esta suposição é relatada como favorável, pois a não liberação do agente ativo permite que não se formem espaços de vacuolização na matriz e dessa forma, enfraquecimento e deterioração dos compósitos em ambiente úmido. Sabendo que a meio bucal é um ambiente constantemente banhado pela saliva, a utilização desses materiais então se mostra favorável, como o AgVO_3 que também foi relatado por uma ação de contato com a membrana bacteriana (Holtz et al., 2010).

AgVO_3 mostrou eficácia contra essa bactéria também gram-positiva de anaerobiose facultativa, no entanto apenas quando foi utilizada a concentração de 10% e nos materiais teflon e a resina acrílica com aplicação sob a forma de glaze.

Uma proporção menor de adição de nanopartículas de prata em resina composta – 0,08%, indicada por não afetar as propriedades estéticas, mecânicas e de manipulação; mostrou eficácia na redução da cobertura por *S. mutans* (Cheng et al., 2012). Avaliando a adição da nanopartículas de prata na fração de 0,042% em resinas compostas com Ca e PO_4 , Cheng et al. (2012) mostraram redução na viabilidade de biofilme, atividade metabólica e contagens de UFC em 20-30% em comparação a um grupo controle de resina comercial. Essa mesma quantidade de adição das nanopartículas também não influenciaram na resistência flexural e no módulo elástico, propriedades mecânicas importantes aos compósitos, uma vez que

a fratura junto a formação de cáries secundárias, são os maiores fatores de falha das restaurações.

Usando outro nanocomposto bactericida à base de prata – o zeólito de prata, Casemiro et al. (2008) encontrou efetividade contra *S. mutans* em concentrações reduzidas em resinas acrílicas para base de dentadura, como 2,5%, 5,0%, 7,5%, além de 10%. Entretanto a adição maior que 2,5% provocou uma diminuição significativa na resistência mecânica do material.

Esses casos ressaltam a importância de avaliar outras propriedades dos materiais que sofrem alguma modificação química, e pressupõe-se que a adição de maior concentração da substância química provoca mais alterações, como seria nesse estudo, com 10% de AgVO_3 para obter eficácia contra *S. mutans*. Nesse micro-organismo ainda supõe-se que o poliacetal poderia ter uma influência negativa na efetividade do nanocomposto, assim como o esmalte.

O trabalho de Di Giulio et al. (2013) mostrou eficácia da atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, ao inibir seu crescimento com a concentração de 0,2% de nanopartículas de prata em um nanocompósito desenvolvido por eles – Chitlac-nAg. Estas proporções se apresentaram bem menores a encontradas neste estudo, o que sugere que os métodos para a obtenção do resultado podem ter tido alguma influência, como a presença de saliva natural e a utilização de outros substratos

Similarmente a atividade observada contra a *S. mutans*, as amostras com 10% de concentração de AgVO_3 se mostraram mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano da *E. faecalis*. Também foi observado halo de inibição na concentração de 5% de AgVO_3 e, apesar da semelhança estatística, em algumas amostras de poliacetal com esmalte com 5% de AgVO_3 não foi identificado halo de inibição; o que

sugere mais uma vez, este tipo de substrato e veículo para o nanocomposto, como menos indicados, ou mesmo a distribuição aleatória de grânulos insolúveis na superfície do corpo de prova.

O estudo de Holtz et al. em 2012, também mostrou a atividade antibacteriana dos nanofios β -AgVO₃ decorados com nanopartículas de prata contra a *E.faecalis*, concordando com nossos resultados que utilizaram o nanocomposto em diferentes condições de veículo. Dessa forma, provavelmente o uso do glaze ou esmalte como veículos não teriam efeito negativo na ação antibacteriana, além de não possuírem diferença entre eles.

A bactéria gram-positiva e anaeróbia facultativa *S.aureus*, foi selecionada no presente estudo devido sua alta resistência aos antibióticos, sendo responsável pela maioria das infecções hospitalares. Holtz et al. (2012) como já relatado, demonstrou ação inibitória desse micro-organismo com a utilização de AgVO₃ na concentração de 1% (m / v) em amostra comercial de tinta à base de água desta espécie resistente a Meticilina – a MRSA.

Encontrou-se esse resultado também nesse estudo, entretanto em concentrações de 2,5%; 5% e 10%. Apesar da formação do halo de inibição em todas as concentrações propostas, as proporções menores - 2,5% e 5% não tiveram eficácia em 100% das amostras quando aplicada sob a forma de esmalte em todos materiais e como glaze no poliacetal e teflon a 10%. Apesar de 5% e 10% não mostrarem diferença estatística, assim como observado nas outras bactérias, 10% mostrou-se uma eficiência maior. O esmalte, mais uma vez, mostrou-se como um veículo não indicado se comparado ao glaze, principalmente na avaliação desse micro-organismo onde demonstrou maiores valores representativos de atividade bacteriana, com diferença estatística com o esmalte.

O uso das AgNPs ancorados nos nanofios de prata, ao prevenir a formação de aglomerados das nanopartículas, mantendo-as dispersas, possibilita que se mantenha uma elevada área de superfície de prata disponível para o contato com as bactérias. Assim, Holtz et al. (2010) sugerem o uso de AgVO_3 como agente de apoio e de liberação de AgNPs, principalmente contra a cepa MRSA de *S. aureus*. Os mesmos autores sugerem o desenvolvimento de testes genotóxicos e citotóxicos em células humanas e micro-organismos, a fim de avaliar as possibilidades de aplicação desses agentes nanoestruturados como agentes antibacterianos, sendo a sua indicação na Odontologia feita por meio desse estudo na aplicação de cicatrizadores e outros componentes protéticos.

Assim como no presente estudo e nos trabalhos de Matssura et al. (1997) e Kwakye-Awuah et al. (2008) a efetividade das nanopartículas de prata contra o *S. aureus* também foi encontrada por Duran et al. (2007). Eles aplicaram seu uso em tecidos de algodão utilizados em hospitais com o objetivo de prevenir ou minimizar as infecções; e encontraram atividade antibacteriana significativa.

A ação antimicrobiana da prata também foi observada por Kumar et al. (2005) que encontraram em 4 dias um aumento marginal da liberação de partículas antimicrobianas em poliamida (PA). Após esse tempo, o lançamento encontrado foi constante, com uma subida abrupta após uma semana, especialmente para os compósitos com maiores concentrações de prata. As menores taxas de liberação dos íons de prata na primeira semana foram correlacionadas com a ausência de efetividade antibacteriana contra *S. aureus*, assim como *E. coli* e *C. albicans*.

A atividade antibacteriana têxtil é relatada como uma propriedade relevante na aplicação de roupas e produtos de uso doméstico e na medicina. Jeong et al. (2005) analisou esta ação com a incorporação pó de prata de dimensão nanométrica

no polipropileno, encontrando excelente atividade em relação a amostras que continham partículas de micro tamanho. Sua análise utilizou a bactéria gram-positiva *S. aureus* e a bactéria gram-negativa *E. coli* para mostrar essa efetividade das nanopartículas de prata em diversas proporções. Mostraram que os compostos poliméricos com 0,1% apresentaram excelente efeito antibacteriano - redução bacteriana de 99,9%; e que as menores partículas possuem atividade mais acentuada para ambas as classes de bactérias.

A forte afinidade da prata pelo zeólito por meio da ligação eletrostática, foi aplicada na odontologia na incorporação condicionadores de tecido, resinas acrílicas e bochechos pois este composto inibe as bactérias sob condições aneróbias (Kawahara et al. 2000). O estudo de Matssura et al. (2007) mostrou essa atividade durante 4 semanas contra a *S. aureus*.

Niakan et. al (2013) por meio de análise *in vitro* de disco-difusão, avaliaram a estabilidade das propriedades antibacterianas de soluções de nanopartículas de prata durante um período de 9 meses contra *S. aureus*, e também *S. mutans* e *P. aeruginosa*. Não foram encontradas mudanças significativas durante o tempo analisado com a utilização de 4000 µg.ml⁻¹, com exceção de *S. mutans*; no entanto utilizando concentrações mais baixas foi observada redução da atividade antibacteriana. Portanto, apesar de serem estudadas as concentrações com melhor eficácia antibacteriana do AgVO₃, estudos futuros devem avaliar sua atividade a longo prazo, uma vez que os dispositivos da Implantodontia a serem usadas permanecerão em meio bucal por um tempo maior que o tempo que foi avaliado no presente estudo.

A espécie de *S. aureus* resistente a metilicina se mostrou sensível ao vanadato de prata no estudo de Holtz et al. (2012) que o incorporou à 1% em tintas

à base de água. Causaram uma zona de inibição do MRSA em 4 mm, média superior à obtida nesse trabalho na menor proporção avaliada (2,5%) – $2,13 \pm 2,75$. Assim, nossos resultados mostraram uma ação na qual os materiais propostos necessitariam de uma proporção maior de AgVO_3 , implicando em maiores mudanças estruturais nos substratos. Portanto, análises de propriedades físicas foram avaliadas, com a finalidade de se observar quais alterações poderiam ter efeito negativo nas aplicações químicas.

Além das bactérias, a colonização por leveduras, como a *Candida albicans*, tem sido constantemente pesquisada em materiais odontológicos, sobretudo à base de resina acrílica, como as bases e reembasadores de próteses totais. As infecções fúngicas, comuns em desdentados, podem acarretar problemas clínicos e até mesmo a deterioração do material. Portanto, *C. albicans* foi selecionada para análise da atividade bacteriana neste estudo.

O biofilme maduro com células de leveduras *C. albicans* são altamente resistentes a agentes antifúngicos como o fluconazol, nistatina, anfotericina B e clorexidina. A progressão da resistência aos medicamentos está associada ao aumento da atividade metabólica e da maturação dos biofilmes. Harrison et al. (2007) sugerem que os íons de prata possuem efeito na diferenciação celular fúngica. Entretanto em biofilmes maduros, o polimorfismo celular nas populações de *Cândida spp.* tornam-nos mais resistentes aos antifúngicos do que nas fases anteriores de desenvolvimento.

Bulad et al., (2004) compararam entre o grupo que recebeu Nistatina e um que não recebeu, a adesão da *C. albicans* às seis marcas comerciais de reembasadores de prótese total por meio da contagem microscópica de células coradas por acridina laranja. Concluíram que a zona de inibição se apresentou no

grupo controle com uso da Nistatina, e que não houve diferença entre as superfícies lisas; contudo as superfícies rugosas mostraram influenciar significativamente na adesão de da *C. albicans*.

O uso das nanopartículas de prata contra a *C. albicans*, mostraram eficácia quando utilizadas em alguns materiais dentais. O estudo de Acosta-Torres et al. (2012) avaliou o efeito inibidor da *C. albicans* na incorporação de nanopartículas de prata em resinas acrílicas (PMMA) para uso em dentaduras. Observaram uma redução estatisticamente significativa no número dos fungos e sua aderência, em comparação à resina acrílica comercial padrão, levando-os a sugerir a nanopartículas de prata no impedimento de infecções pela levedura.

Allaker et al. (2010) também relataram uso de nanopartículas como anti-aderentes e anti-fúngicas em células epiteliais bucais. Os autores também sugerem o seu uso em aplicações poliméricas, como o realizado em nosso estudo, que não incorporou nos substratos, mas avaliou sob a forma de filme superficial

A fixação e retenção da *C. albicans* nas superfícies dos materiais, assim como outros micro-organismos, são influenciadas pela rugosidade superficial (Bulad et al. 2004). Estudos *in vitro* e *in vivo* sobre superfícies de pilares protéticos mostram que podem haver diferenças no biofilme bacteriano relacionadas com as propriedades químicas e físicas da superfície sobre a qual ele se estabelece, como o material de composição, a rugosidade e energia de superfície (Lang & Berglundh 2011).

O método de preparação do material também pode ter efeito na adesão de bactérias e leveduras. A presença de porosidades no interior da matriz do material facilita a penetração de blastósporos, uma forma celular que a *C. albicans* pode apresentar, talvez até por capilaridade. Entretanto, materiais mais duros impedem o

desenvolvimento de hifas, as quais apresentaram formação considerável nos reembasadores mais macios no estudo de Bulad et al. (2004). Diante da influência que o substrato pode apresentar, nos preocupamos em também avaliar a dureza superficial dos materiais.

Baseado nessa informação, esse trabalho selecionou diferentes tipos de substratos para confecção de dispositivos protéticos sobre implantes. A formulação do AgVO_3 é apresentada sob a forma de pó. Sendo assim, se faz necessário o uso de um veículo para aplicação do antimicrobiano nos componentes protéticos. O glaze e esmalte foram selecionados por serem formas práticas de aplicação e que, além disso, ficariam sobre os substratos como uma fina película, sem alteração substancial da superfície. Os metais utilizados nos componentes protéticos disponíveis no mercado, como o titânio e o alumínio; não possuem boa adesão desses dois filmes, conforme foi observado por nós em estudo piloto. Além disso, os processos de transporte de componentes químicos, como os íons de prata, são influenciados pelas propriedades dos polímeros (Monteiro et al. 2009). Por isso, foram selecionados os materiais alternativos: poliacetal, teflon e resina acrílica.

O poli metil metacrilato, conhecido como resina acrílica, foi desenvolvido em 1928 e introduzido no mercado em 1933 pela Rohm and Haas Company. Pouco tempo após, em 1946, começou a ser amplamente utilizado pela classe odontológica, compondo 98% das próteses. Atualmente, possui uma vasta variedade de aplicações na odontologia, como base e dentes artificiais de próteses totais e outros tipos de próteses unitárias (Busscher et al. 2010), sendo também proposta como material de composição dos componentes de implante nesse estudo.

Contudo, um problema clínico associado a seu uso é a adesão pela *C. albicans* e outras bactérias como estirpes de *Streptococcus*, *Prevotella*, e

Actinomyces spp., que permitem a formação de biofilme na superfície dos biomateriais (Busscher et al. 2010). Também se tem sugerido que a própria adesão bacteriana melhora subsequentemente a adesão de *C. albicans*, já que as bactérias já são encontradas na superfície do acrílico em poucas horas de exposição ao meio ambiente oral, enquanto que as leveduras são observadas apenas após dias (Avon et al. 2007).

Dessa forma, publicações têm destacado a necessidade de se desenvolver uma estratégia para reduzir a adesão bacteriana aos materiais dentários. Neste sentido, nanopartículas de prata têm sido adicionadas à resina acrílica utilizada na construção de próteses com objetivo de prevenir as infecções; como o uso de coberturas ou tratamentos superficiais. Estas tem se mostrado eficazes na redução da adesão bacteriana *in vitro* e, em alguns casos, na diminuição dos efeitos da infecção associada ao implante *in vivo* (Monteiro et al. 2009).

A adição de prata ao zeólito de zinco para o uso em resinas acrílicas consiste com essa tendência atual da incorporação de antimicrobianos em materiais dentários. No entanto é sugerida sua avaliação de viabilidade no desempenho clínico, quanto as suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas, como realizado por Casemiro et al. (2008), que analisaram a resistência a flexão e ao impacto após a incorporação do zeólito de prata nas resinas acrílicas odontológicas. Apesar de concluírem que a adição de 2,5% do composto à base de prata foi o suficiente para notar atividade antimicrobiana, amostras de 10% contra *C. albicans* formaram maiores halos de inibição de crescimento. Os autores explicam a prata e zinco como importantes antifúngicos, além de antibacterianos; entretanto sugerem uma avaliação clínica quanto às outras propriedades.

Contrário às publicações científicas relatadas, O estudo presente não encontrou efetividade na *C. albicans* em nenhum grupo analisado, mostrando que o nanoestruturado vanadato de prata não seria a forma do nanocomposto indicada para combater infecções fúngicas.

O mesmo foi encontrado em relação as bactérias anaeróbias gram-negativas, *P. gingivalis* e *P.intermedia*, onde não foi possível notar a formação do halo de inibição com a utilização do AgVO₃ em nenhuma proporção. A ausência da atividade bacteriana do nanocomposto sugerido vanadato de prata não possui nenhum relato na literatura contra esses micro-organismos, conforme pesquisa recente em base de dados. O material ainda necessita de mais estudos de efetividade contra as inúmeras espécies de bactérias existentes no meio bucal para avaliar quais seriam as aplicações viáveis nas diversas áreas da odontologia.

Sabe-se que a microbiota patogênica da doença peri-implantar também possui um caráter anaeróbio. Portanto outras análises antimicrobianas, utilizando outras metodologias, assim como o uso com outros tipos de veículos ou até outras concentrações de incorporação do AgVO₃; são necessários em estudos futuros para que se alcance o objetivo de prevenir as infecções de implantes com a utilização dessa substância que apresenta um excelente espectro de ação e estabilidade.

Nas bactérias anaeróbias, além da ausência da atividade antibacteriana, foi notada uma suposta lise de hemácias, o que sugere uma citotoxicidade a células hemácias do meio de cultura. A exploração das propriedades tóxicas das nanopartículas de metal, em especial aquelas que produzem espécies reativas de oxigênio, é realizada cada vez mais nas formulações antimicrobianas dentro e fora do ambiente hospitalar (Allaker & Ren, 2008).

Ressalta-se a importância de garantir um potencial mínimo de citotoxicidade nos materiais dentários. Embora o desenvolvimento da nanotecnologia seja de grande importância, tanto na área industrial, como de consumo, ainda são limitados os estudos que analisaram e estudaram extensivamente os efeitos tóxicos das nanopartículas em geral (Allaker et al. 2010) e das nanopartículas de prata (Acosta-Torres et al. 2012).

À respeito dos metais em forma não-particulada, sabe-se que enquanto o cobre é ativamente excretado, a prata pode acumular dentro do organismo (Allaker et al. 2010). No entanto, há o conhecimento de que a ação antibacteriana, antiviral e antifúngica dos íons prata apresentam baixa toxicidade para a célula humana (Gogoi et al. 2006, Cheng et al. 2012, Rai et al., 2014), não possuem efeitos secundários e obtêm resultados satisfatórios mesmo em baixas concentrações (Jeong et al 2005, Cheng et al. 2012). A citotoxicidade em forma de nanopartículas ainda não foi claramente esclarecida, sendo necessário o conhecimento das propriedades toxicocinéticas como a absorção, distribuição, metabolismo, e excreção das nanopartículas.

Sabe-se que algumas nanopartículas podem ser retidas no interior das células em um período maior que o desejado. Além disso, são capazes de atravessar membranas e células de tecidos e órgãos, que partículas maiores não conseguiriam (Allaker et al. 2010). Apesar das nanopartículas de prata serem consideradas como compostos não tóxicos para o organismo humano (Kim et al. 2007) partículas que podem ser modificadas na sua superfície, hidrofobia e outras características físico-químicas devem ser mais pesquisadas para então serem consideradas nas aplicações biomédicas (Allaker et al. 2010).

Apesar de a prata ser considerada um componente padrão ouro no tratamento tópico de queimaduras, sob a forma de sulfadiazina; recentes descobertas indicam que esta retarda o processo de cicatrização devido a uma atividade citotóxica grave em células hospedeiras. Portanto ensaios clínicos têm sido realizados com o objetivo de mostrar a liberação da prata na reparação de feridas e regeneração por meio da eficácia antimicrobiana (Atiyeh et al. 2007). Relata-se que, independente do uso de cremes ou pomadas, o nanocristalino de prata é altamente tóxico aos fibroblastos e queratinócitos, além de ter se observado em grandes centros de queimadura o surgimento de cepas de bactérias resistentes a prata, como a *E.coli*.

Entretanto, a diferença de toxicidade pode ser atribuída a diferentes condições de crescimento e propriedades celulares, assim como a quantidade e força dos ligantes com íons de prata. Além disso, as nanopartículas têm propriedades físico-químicas substancialmente diferentes, e variadas concentrações, que mesmo que com a mesma composição, possivelmente resultam em diferentes mecanismos de toxicidade aos sistemas biológicos (Choi et al. 2008).

Acosta-Torres et al. (2012) por meio do ensaio MTT compararam o potencial citotóxico de discos de PMMA e PMMA com nanopartículas de prata. Os comportamentos encontrados foram biocompatíveis para ambos os grupos na análise de 24 horas e 72 horas de exposição das células. Allaker et al. (2010) considera que a prata, em comparação a outros metais, apresenta-se menos tóxicas às células humanas.

O zeólito de prata, apesar de considerado um material apropriado para o uso em materiais dentários, pode causar efeitos tóxicos, mesmo em pequena quantidade de prata liberada. Portanto, Matssura et al. (1997) relataram a necessidade do

conhecimento da quantidade ótima de nanocomposto de prata para uma aplicação clínica segura.

Conforme resultados encontrados por Panacek et al. (2009), nanopartículas de prata permitiram a inibição de *Candida spp.* na concentração de 0.2 µg/mL, o que se mostra bastante favorável, uma vez que também observaram que 30 µg/mL demonstraram efeito tóxico a célula humana. Baseado nessa afirmação, pode-se considerar que a lise de hemácias encontrada nas bactérias anaeróbias pode ser devido a concentração de AgVO₃.

As concentrações de AgVO₃ foram selecionadas de acordo com estudo piloto realizado por nosso grupo de pesquisa que avaliou a efetividade antimicrobiana das concentrações de 5% e 10% de vanadato de prata diluído em glaze e esmalte aplicado sobre corpos de prova de resina acrílica. No presente estudo ainda foi incluída a concentração de 2,5%. As baixas concentrações de nanopartículas de prata podem ser utilizadas devido à elevada área de superfície em relação à massa, o que, o que permite forte ação antibacteriana sem alterações significativas de outras propriedades do material (Cheng et al. 2012).

Quando analisada a *P. gingivalis* e *P. intermedia* nas concentrações de 5% e 10% de AgVO₃, foi detectada o possível efeito citotóxico. Assim, idealmente deveria ser recomendada a porcentagem de 2,5% como mais segura. Esta concentração poderia ser aplicada, entretanto sua atividade eficaz poderia ser encontrada apenas contra as bactérias *P.aeruginosa*, *E. coli* e *S aureus*, conforme nossos resultados obtidos.

Assim, deve-se sempre ponderar qual concentração pode trazer benefício como antimicrobiano, atingindo um maior número de bactérias, no entanto, sem efeitos citotóxicos. Também é importante ressaltar que essa lise de hemácias

encontradas não obrigatoriamente é considerada um efeito tóxico às células humanas com seus sinais e sintomas. Portanto, estudos de citotoxicidade específicos devem ser utilizados para o conhecimento mais confiável dessa afirmação.

Muitos trabalhos encontrados sobre a análise de nanopartículas de prata utilizam metodologias *in vitro* por que as preocupações que abordam o assunto da toxicidade ainda não foram totalmente esclarecidas ou resolvidas. Portanto, mais estudos são necessários para se ter o conhecimento da quantidade ideal das nanopartículas incorporada ou aplicada sobre dos materiais poliméricos, não deixando também de ressaltar a importância nos efeitos adversos das propriedades físicas dos materiais que deve ser a mais reduzida. Sendo assim, este estudo analisou a dureza e rugosidade superficial dos substratos propostos com a aplicação dos vanadato de prata.

Apesar de não haver diferença entre os substratos na análise antimicrobiana preocupou-se em analisar a propriedade da dureza superficial com objetivo de avaliar dentre os materiais qual teria uma maior resistência a deformação. Foi selecionado o teste de Dureza Rockwell Superficial, que apesar de indicado para metais, permite que sejam avaliados diversos tipos – dos mais duros aos mais moles; e possui facilidade em se detectar pequenas diferenças de durezas e pequenos tamanhos da impressão. Dessa forma, os corpos de prova de tamanho reduzido (3 mm de altura x 5 mm de diâmetro) poderiam ser usados nesse ensaio.

Os testes de dureza recomendam ensaios em amostras de superfície plana e lisa. Entretanto, os corpos de prova deste trabalho quando receberam a aplicação dos filmes superficiais, inevitavelmente adquiriram um aspecto mais irregular, pelo fato do vanadato de prata ser apresentado sob a forma de pó com alguns grânulos

insolúveis na sua integridade no filme de glaze ou esmalte. A aplicação de pré-carga neste método permite um contato firme do penetrador esférico selecionado e o material a ser ensaiado; ou seja, minimiza as imperfeições na superfície.

O valor alcançado no ensaio é representado pela profundidade causada no corpo de prova após aplicação da carga com diminuição da sua recuperação elástica após a retirada da força, e da profundidade causada pela aplicação da pré-carga. Foi selecionada escala HR15Y, com a esfera de ½ polegada, designando-o como método “adaptado”, uma vez que não se utilizou esferas de aço menores para o emprego de carga de 15 kg já que elas causariam, conforme observado no estudo piloto, profundidades que ultrapassariam o limite permitido - mínimo de espessura de 10 vezes a profundidade da penetração.

O poliacetal foi o substrato que obteve o melhor resultado da dureza superficial ($83,0 \pm 10,2$ HR15Y_{adaptado}) diferente estatisticamente dos outros materiais que apresentaram semelhança entre si ($p=0,00$). Este material é considerado rígido, com elevada resistência a abrasão, ao atrito, a fadiga por vibrações e com alta estabilidade dimensional. Além disso, possui resistência aos agentes químicos e tem baixa absorção à umidade, o que sugere o como um material favorável para o uso no meio bucal. Sua fácil usinagem também permite a configuração da peça de acordo com a aplicação a qual é necessária, e a confecção de peças de precisão e pequeno porte como os cicatrizadores de implantes. Além disso, não permitem porosidades, uma vantagem ideal para o não acúmulo de biofilme e seus problemas recorrentes.

Entre os tipos de filmes aplicados foi possível notar que o esmalte levou aos substratos terem uma dureza superficial menor, e o glaze os valores mais elevados; entretanto, não tiveram diferença com a ausência de tratamento superficial, o que

revela que a aplicação de filme não influencia nesta propriedade. Apesar desses dados, o glaze poderia ser indicado como um veículo mais apropriado para aplicação do AgVO_3 , já que além de influenciar em valores mais altos de dureza superficial, em algumas bactérias analisadas favoreceu os melhores resultados antimicrobianos.

Da mesma forma, a concentração de AgVO_3 não interferiu na dureza superficial, pois a ausência de aplicação de filme superficial e o filme sem a incorporação de nanocomposto foram semelhantes às diferentes proporções. A diferença significativa ocorreu apenas entre as concentrações de 5 e 10%, maior e menor dureza respectivamente. Sendo assim, a concentração de 10% poderia ser descartada de suposta proporção ideal para o uso do vanadato de prata, reforçada pelo fato de que na análise antimicrobiana de forma geral não apresentou diferença com a concentração mais baixa de 5%.

A concentração também pareceu não influenciar na dureza superficial ao analisar cada substrato, pois não houve diferença entre todos os grupos de poliacetal e de resina acrílica; e no teflon a diferença da ausência de filme foi apenas com a concentração de 10% de AgVO_3 , o que faz notar mais uma vez que essa proporção de antimicrobiana não seria a mais favorável por diminuir a resistência do material, além de não ser necessária pela semelhança antimicrobiana com 5%.

10% de AgVO_3 no glaze também seria dispensável pois 2,5% e 5% já seriam semelhantes a ausência de filme, assim como no esmalte onde não houve diferença entre as proporções.

Mais estudos são necessários para avaliar as propriedades físicas de resistência dos materiais candidatos a receber substâncias químicas antimicrobianas, seja por meio de tratamento superficial ou por meio na

incorporação no substrato. Ao propor uma ação eficaz antibacteriana na área biomédica, pretende-se aplicar de alguma forma no cotidiano ou na terapia e prevenção de infecções, o que requer uma avaliação clínica para testar a viabilidade do produto. Casemiro et al. (2008) ao avaliarem o outro nanocomposto zeólito de prata na aplicação em resinas acrílicas para próteses odontológicas, ressaltaram a importância da avaliação das propriedades mecânicas, sobretudo nos biomateriais sugeridos para o meio bucal, já que estes estão vulneráveis a constantes forças oriundas do sistema mastigatório. Em seu estudo encontraram diminuição na flexão e na resistência ao impacto o que leva a reflexão da viabilidade clínica do material testado.

O estudo de Ahn et al (2009), apesar de afirmar que as propriedades mecânicas de um polímero podem ser alteradas ao se incorporar agentes microbianos devido ao rompimento da forma física do material, observaram em seu estudo que a incorporação de nanopartículas de prata em compósitos adesivos causaram um efeito mínimo na resistência ao cisalhamento. Os autores sugerem que os efeitos adversos podem ser mínimos se a quantidade adequada das nanopartículas é utilizada.

Assim, nosso estudo selecionou as diferentes concentrações não só para avaliar qual possui melhor atividade antibacteriana, mas para propor qual causaria menos efeitos secundários desvantajosos para outras propriedades do material. Como exemplo, a proporção de 10% de AgVO_3 provocou possíveis efeitos citotóxicos demonstrados pela lise de hemácias, além da diminuição da dureza superficial - desvantagens para a aplicação clínica. Apesar do efeito antimicrobiano com a *S.mutans* só ser observada com essa concentração, seu uso deve ser refletido, abordando a quantidade de benefícios *versus* malefícios.

O uso de vanadato de prata, como relatado, aplicado aos substratos por meio de filme superficial, inevitavelmente provocou uma mudança na superfície caracterizada pelas irregularidades superficiais com a formação de picos e vales, visíveis nas imagens obtidas com o MEV (Figuras 45 à 53). Entretanto, sabe-se que o acúmulo de biofilme está relacionado a essa rugosidade superficial, podendo favorecer a resposta inflamatória local e infecções periodontais e peri-implantares.

A ocorrência de peri-implantite em implantes rugosos é provavelmente maior, uma vez que foi observado em uma revisão sistemática que implantes de superfície áspera em comparação às superfícies usinadas tiveram estatisticamente mais peri-implante após três anos de acompanhamento. Junto às intervenções como debridamento mecânico, procedimento cirúrgicos e antibioticoterapia; intervenções de alisamento da superfície do implante para redução da sua rugosidade, como a remoção das roscas do parafuso sem suporte ósseo, têm sido sugeridas. Entretanto, existem ainda poucos estudos clínicos que avaliem, e por mais que seus objetivos sejam alcançados, são necessárias correções das condições anatômicas para melhorar o controle de placa e eliminar ambientes favoráveis para bactérias anaeróbicas, como procedimentos de ressecção ou de regeneração óssea com enxertos (Esposito et al., 2012).

Muitos estudos relatam a influência da rugosidade da superfície de implantes de titânio nos tecidos peri-implantares adjacentes (Abrahamsson et al. 2012). Contudo, poucas análises foram realizadas nos componentes protéticos que são utilizados após a reabertura do implante.

Ahn et al. (2009) notaram que a adesão de estreptococos cariogênicos pode estar associada às diferenças na superfície dos compósitos adesivos avaliados que recebem nanopartículas. As cargas nanométricas, apesar de possuírem tamanhos

reduzidos, afetam a rugosidade do material, o que foi notado no nosso estudo a medida que se aumentava a concentração do nanocomposto AgVO_3 . A adesão bacteriana se demonstrou menor nos materiais sem nanopartículas de prata, pois a superfície menos irregular reduz as oportunidades de colonização por diminuir a área de adesão. No entanto Ahn et al. (2009) observam que, apesar de uma maior aderência bacteriana nas superfícies ásperas, a presença de nanopartículas de prata pode evitar esse mesmo processo devido as suas propriedades antimicrobianas.

No trabalho realizado por Almaguer-Flores et al. (2010), a influência da rugosidade foi claramente observada no número de bactérias (UFC) aderidas às superfícies ásperas de carbono e titânio; indicando que a rugosidade da superfície tem um importante efeito na colonização bacteriana ora, assim como observado por Ahn et al. (2009). Foi observado um acréscimo de 1,5 vezes no número de bactérias nas superfícies rugosas em relação às lisas, também representado por imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura com superfícies ásperas com picos e vales completamente cobertos por bactérias.

Apesar desses achados ainda existem autores que consideram a rugosidade o fator de menor influência na formação do biofilme inicial (Bos et al. 1999), como até mesmo observado por Almaguer-Flores et al. (2010) que observaram uma maior proporção de *P. intermedia* em superfícies lisas. Assim, há uma influência das propriedades físicas, mas também das propriedades químicas do substrato, na colonização de bactérias orais, mostrando-se uma das principais determinantes; apesar de algumas espécies como a *P. gingivalis* mostrarem-se mais sensíveis a rugosidade do que a superfície química. Charalampakis et al. (2012) também observou que superfícies rugosas de implantes não foram associadas com o

desenvolvimento da doença peri-implantar, no entanto, superfícies quimicamente modificadas estavam relacionadas.

Idealmente, a superfície de um biomaterial presente no meio bucal deveria ser a mais lisa e polida possível a fim de dificultar a deposição de placa bacteriana, sendo o valor de 0,2 μm considerado um limite além do qual haveria maior possibilidade de acúmulo de biofilme (Bollen et al. 1997). A maioria dos implantes disponíveis no mercado são de superfície áspera e tem uma rugosidade moderada (entre 1,0 e 2,0 μm) (Heitz –Mayfield et al. 2008). A influência da superfície do implante para a doença peri-implantar ainda é contraditória mas muitos estudos observam maior perda óssea e doença peri-implantar em implantes de maior aspereza superficial (Lang & Berglundh, 2011).

Entretanto Monteiro et al. (2009) relatam que a quantidade adequada de nanopartículas de prata adicionada a materiais poliméricos pode ser fundamental para não causar efeito adverso sobre as propriedades físicas do substrato. Em seu estudo, mesmo com o aumento da rugosidade superficial em compósitos adesivos ortodônticos incorporados com AgNPs, houve uma redução significativa na aderência de *S mutans* e a resistência a união não foi afetada.

No presente estudo, em relação a análise dos substratos com todas as concentrações de AgVO_3 e os diferentes filmes, não houve diferença na rugosidade superficial; assim como entre os tratamentos superficiais de acordo com o veículo glaze e esmalte. Apesar disso, a aplicação do filme já provoca uma alteração no substrato, visto que a ausência do tratamento teve média de rugosidade menor ($2,62 \pm 0,96 \text{ Ra}$) com diferença estatística com os dois tipos de filme ($p=0,00$). Assim, a aplicação de filme e a concentração do nanocomposto seriam responsáveis por alterar a rugosidade dos materiais.

A aplicação de filme sem incorporar o vanadato de prata, designado como grupo controle, mostrou semelhança com o grupo de substratos sem tratamento superficial ($p=1,00$). Isto ressalta que a influência maior na rugosidade superficial seria do aumento da concentração, no qual 2,5% ($4,08 \pm 1,80$) e 5% ($3,92 \pm 2,01$) tiveram diferença com esses grupos sem AgVO_3 . A maior proporção do nanocomposto é que apresentou uma diferença mais significativa, com aumento considerável em relação a todos os grupos analisados ($7,02 \pm 2,99$) ($p=0,00$).

Isto foi observado distintamente em cada substrato em separado, sendo que no poliacetal houve semelhança entre 10% e 2,5% ($p>0,05$). No teflon apenas a aplicação de vanadato de prata a 10% ($p=0,00$) influenciou na rugosidade do substrato, visto a semelhança de todas as outras concentrações com a ausência de filme, e entre 2,5% e 5% não diferença estatística ($p>0,05$), o que possibilita o uso da concentração maior.

O substrato resina acrílica também revelou a concentração de 10% de AgVO_3 , diferente de todos os outros grupos ($p=0,00$), e a o grupo sem aplicação de filme semelhante de todos os outros grupos, o que mostra mais uma vez uma maior alteração superficial quando utilizada a maior proporção de nanopartículas. Assim, como no teflon, a semelhança entre 2,5% de AgVO_3 e 5% ($p>0,05$) permite o uso da maior concentração se mais efetiva na atividade bacteriana.

Nos tratamentos superficiais também foi possível constatar que a maior concentração de AgVO_3 seria a responsável pela maior alteração superficial, com dados diferentes estatisticamente ($p=0,00$). No glaze, novamente 2,5% se apresentou com igualdade estatística com 5% ($p>0,05$), mas estes se apresentaram diferentes dos substratos sem incorporação do nanocomposto.

Os resultados discutidos neste trabalho, revelam que apesar de utilizar variados substratos e tipos de veículo para aplicação do AgVO_3 , de maneira geral o fator de variação que mais influenciou nas análises foi a concentração do nanocompostos. Assim, apesar de algumas vezes o filme de esmalte e o poliacetal se apresentarem como fatores que apresentaram resultados negativos, isso não elimina a sugestão de seu uso.

Pesquisas clínicas futuras sobre as medidas preventivas devem ser realizadas por meio de ensaios clínicos randomizados, comparando os protocolos TPS em populações caracterizadas com diferentes fatores de risco, a fim de investigar medidas substitutas de intervenções (Heitz-Mayfield et al., 2014).

Embora ensaios clínicos randomizados e estudos prospectivos sejam desejáveis, os estudos observacionais bem conduzidos e relatados podem ser úteis, tendo em conta o longo prazo necessário para se detectar a peri-implantite (Heitz-Mayfield et al., 2014).

As análises com o vanadato de prata ainda são recentes, e na prática odontológica um antimicrobiano com suas propriedades favoráveis poderia ser aplicado em diversas áreas, já que o meio bucal apresenta-se suscetíveis às infecções.

Dentro dos resultados encontrados, foi possível observar que o vanadato de prata apresentou-se como um eficaz produto antimicrobiano, com efeitos favoráveis; cuja alteração nas propriedades mecânicas ocorreu efetivamente somente com a aplicação da porcentagem mais alta. Entretanto, a partir da faixa de 2,5% já foi observado efeito antimicrobiano para alguns micro-organismos.

O veículo de aplicação utilizado nesse estudo foi uma opção inicial, podendo ser modificado para apresentação em escala industrial tanto para a sua aplicação

como glaze ou esmalte, como para a aplicação direta no componente a partir de princípios industriais como a extrusão e obtenção de pallets, onde a partir dos mesmos, os componentes podem ser torneados.

O grande objetivo desse estudo foi avaliar a efetividade antimicrobiana do vanadato de prata para bactérias específicas da doença peri-implantar, bem como a sua associação a materiais já utilizados para esse fim. Assim, podemos afirmar que foram obtidos neste estudo resultados altamente satisfatórios, e a partir deste, vários projetos poderão ser delineados, para que se proponha comercialmente e/ou para a aplicação e mistura clínica local, um novo método para prevenção de problemas associados a microbiota causadora da doença peri-implantar.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos, considerando as limitações existentes, foi possível concluir que:

- 1- Houve atividade antimicrobiana do vanadato de prata nas bactérias: *P. aeruginosa*, *E. coli*; *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*, sendo 10% de AgVO₃ a concentração que se mostrou mais efetiva em todas as análises. O tipo de substrato e filme para aplicação do nanocomposto não influenciaram nos resultados, com exceção do *S. aureus*, que obteve maior média com o uso do glaze.
- 2- A rugosidade superficial após a aplicação de AgVO₃ não apresentou diferença entre os substratos e os tipos de veículos. Entretanto houve um aumento significativo em comparação aos substratos sem filme. A aplicação do nanocomposto influenciou nos resultados, sendo que 10% causou a alteração superficial mais significativa.
- 3- A dureza Rockwell superficial foi maior no poliacetal e os filmes aplicados não influenciaram nestes valores de resistência em todos os substratos. A concentração de AgVO₃ não influenciou nos resultados do poliacetal e da resina acrílica. No teflon, a incorporação de 10% do antimicrobiano alterou significativamente a dureza superficial do material.
- 4- Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível notar que o aumento da incorporação de vanadato de prata na superfície de substratos foi proporcional as alterações na microestrutura de cada material.

- 5- Apesar de 10% ser a concentração do vanadato de prata que atingiu um maior número de espécies, essa concentração deve ser ponderada sobre o seu uso, e avaliada em estudos futuros sobre a sua viabilidade de uso clínico em função das alterações nas propriedades físicas.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Lekholm, U.; Grondahl, K.; Jemt, T. (2006) Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 8: 178–186.
2. Astrand, P.; Ahlqvist, J.; Gunne, J.; Nilson, H. (2008) Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 10: 207–217.
3. Kim, D.M.; Badovinac, R.L.; Lorenz, R.L.; Fiorellini, J.P.; Weber, H.P. (2008) A 10-year prospective clinical and radiographic study of one-stage dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 19: 254–258.
4. Heitz-Mayfield, L.J., Needleman, I.; Salvi, G.E.; Pjetursson, B.E. (2014) Consensus statements and clinical recommendations for prevention and management of biologic and technical implant complications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 29 Suppl: 346-50.
5. Salvi, G.E. & Zitzmann, N.U. (2014). The Effects of Anti-infective Preventive Measures on the Occurrence of Biologic Implant Complications and Implant Loss: A Systematic Review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 29 : 292-307.
6. Berglundh, T.; Persson, L.; Klinge, B. (2002) A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *Journal of Clinical Periodontology* 29(Suppl 3): 197–212; discussion: 232–193.
7. Renvert, S.; Roos-Jansaker, A.M.; Lindahl, C.; Renvert, H.; Rutger Persson, G. (2007) Infection at titanium implants with or without a clinical diagnosis of inflammation. *Clinical Oral Implants Research* 18: 509–516.
8. Alsaadi, G.; Quirynen, M.; Komarek, A.; van Steenberghe, D. (2008a) Impact of local and systemic factors on the incidence of late oral implant loss. *Clinical Oral Implants Research* 19: 670–676.
9. Alsaadi, G.; Quirynen, M.; Michiles, K.; Teughels, W.; Komarek, A.; van Steenberghe, D. (2008b) Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 51–57.
10. Lindhe, J. & Meyle, J. (2008). Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 282–285.

11. Busscher H.J.; Rinastiti M.; Siswomihardjo W.; van der Mei, H.C. (2010) Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *Journal of Dentistry Research* 89: 657-65.
12. Galassi, F.; Kaman, W.E.; Anssari Moin, D.; van der Horst, J.; Wismeijer, D.; Crielaard, W.; Laine, M.L.; Veerman, E.C.I.; Bikker, F.J.; Loos, B.G. (2012) Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections. *Journal of Periodontology Research* 47: 616–625.
13. Zitzmann, N.U. & Berglundh, T. (2008) Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 286–291.
14. Lang, N. P. & Berglundh, T. (2011) Peri-implant diseases: where are we now? Consensus of the seventh European workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 38 (suppl).
15. Graziani, F.; Figuero, E.; Herrera, D. (2012) Systematic review of quality of reporting, outcome measurements and methods to study efficacy of preventive and therapeutic approaches to peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 39 (Suppl. 12): 224– 244.
16. Romeo, E.; Lops, D.; Chiapasco, M.; Ghisolfi, M.; Vogel, G. (2007) Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part II: radiographic outcome. *Clinical Oral Implants Research* 18: 179–187.
17. de Waal, Y.C.M.; Raghoobar, G.M.; Meijer, H.J.A.; Winkel, E.G.; van Winkelhoff, A.J. (2014) Implant decontamination with 2% chlorhexidine during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Oral Implant Research*. 00; 1–9.
18. Lang, N.P.; Wilson, T.G.; Corbet, E.F. (2000) Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. *Clinical Oral Implant Research* 11: 146–155.
19. Heitz-Mayfield, L.J. & Lang, N.P. (2010) Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontology* 2000, 53: 167–181.
20. Claffey, N.; Clarke, E.; Polyzois, I. & Renvert, S. (2008) Surgical treatment of peri-implantitis. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 316–332.
21. Sahrmann, P.; Attin, T.; Schmidlin, P.R. (2011) Regenerative treatment of peri-implantitis using bone substitutes and membrane: a systematic review. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 13: 46–57.

22. Renvert, S.; Roos-Jansaker, A.M.; Claffey, N. (2008) Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *Journal Clinical Periodontology* 35: 305–315.
23. Sambhy, V.; MacBride, M.M.; Peterson, B.R.; Sem, A. (2006) Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *Journal of the American Chemical Society* 128: 9798–808.
24. Kenawy, E.R.; Worley, S.D.; Broughton, R. (2007) The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 8: 1359–84.
25. Dellasega, D.; Facibeni, A.; Di Fonzo, F.; Bogana, M.; Polissi, A.; Conti, C.; et al. (2008) Nanostructured Ag₄O₄ films with enhanced antibacterial activity. *Nanotechnology* 19, 475602.
26. Duran, N.; Marcato, P.D.; De Souza, G.I.H.; Alves, O.L.; Esposito, E. (2007) Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluente treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3: 203–8.
27. Kumar, A., Vemula, P.K.; Ajayan, P.M; John, G. (2008). Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials* 7: 236–41.
28. Kwakye-Awuah, B.; Williams, C., Kenward, M.A., Radecka, I. (2008) Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X *Journal of Applied Microbiology* 104: 1516–24.
29. Cheng, L.; Weir, M.D.; Xu, H.H.; Antonucci, J.M.; Lin, N.J.; Lin-Gibson, S.; Xu, S.M.; Zhou, X. (2012). Effect of amorphous calcium phosphate and silver nanocomposites on dental plaque microcosm biofilms. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100: 1378-1386.
30. Holtz, R.D.; Lima, B.A.; Souza Filho, A.G.; Brocchi, M.; Alves, O.L. (2012) Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine* 8:935-940.
31. Niakan, M.; Azimi, H.R.; Jafarian, Z.; Mohammadtaghi, G.; Niakan, S.; Mostafavizade, S.M. (2013). Evaluation of Nanosilver Solution Stability against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6: e8570.
32. Morones J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramírez, J.T.; Yacaman, M.J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16: 2346-53.

33. Jeong, S.H.; Yeo, S.Y.; Yi, C.S. (2005) The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. *Journal of Materials Science*. 40: 5407–5411.
34. Allaker, R.P. & Ren, G. (2008). Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:1-2.
35. Monteiro, D.R.; Gorup, L.F.; Takamiya, A.S.; Ruvollo-Filho, A.C.; de Camargo, E.R.; Barbosa, D.B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34:103-110.
36. Rizzello, L. & Pompa, P. P. (2014). Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chemical Society Reviews* 43: 1501-1518.
37. Casemiro, L.A.; Gomes-Martins, C.H.; Pires-de-Souza F de C.; Panzeri, H. (2008). Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology* 25:187-94.
38. Balan, L.; Malval, J. P.; Schneider, R.; Burget, D. (2007) Silver nanoparticles: new synthesis, characterization and photophysical properties *Materials Chemistry and Physics* 104: 417–21.
39. Holtz, R.D.; Souza Filho, A.G.; Brocchi, M.; Martins, D.; Duran, N.; Alves, O.L. (2010) Development of nanostructured silver vanadates decorated with silver nanoparticles as a novel antibacterial agent. *Nanotechnology* 21, 1-8.
40. Li, G.C.; Chao, K.; Ye, C.S.; Peng, H.R. (2008) One-step synthesis of Ag nanoparticles supported on AgVO₃ nanobelts *Materials Letters* 62: 735–8.
41. Liu, Y.; Zhang, Y.G.; Zhang, M.; Qian, Y.T. (2006) A facile hydrothermal process of fabricating beta-Ag_{0.33}V₂O₅ single-crystal nanowires. *Journal of Crystal Growth* 289:197–201
42. Anner, R., Grossmann, Y., Anner, Y. & Levin, L. (2010) Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factor associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dentistry* 19: 57–64.
43. Moons P, Michiels CW, Aertsen A. (2009) Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3): 157–168.
44. Di Giulio, M.; Di Bartolomeo, S.; Di Campli, E.; Sancilio, S.; Marsich, E.; Travan, et al. (2013). The Effect of a Silver nanoparticle polysaccharide system on streptococcal and saliva-derived biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 13615-13625.

45. Sbordone, L. & Bortolaia, C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical of Oral Investigation* 7: 181-8.
46. Allaker, R. P. (2010). The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *Journal of Dental Research* 89: 1175-1186.
47. Hannig, C.; Hannig, M. (2009). The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigation* 13: 123-139.
48. Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147: 3-9.
49. Kolenbrander, P.E.; Palmer, R.J.; Rickard, A.H.; Jakubovics, N.S.; Chalmers, N.I.; Diaz, P.I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000 42: 47-79.
50. Esposito, M.; Grusovin, M. G.; Worthington, H. V. (2012). Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. *European Journal of Oral Implantology* 5(Suppl): S21-S41.
51. Nevins, M.; Camelo, M.; Nevins, M.L.; Schupbach, P.; Kim, D. (2012a) Connective Tissue Attachment to Laser-Microgrooved Abutments: A Human Histologic Case Report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 32: 385-392.
52. Hermann, J.S.; Schoolfield, J.D.; Nummikoski, P.V.; Buser, D.; Schenk, R.D.; Cochran, D.L. (2001). Crestal bone changes around titanium implants: A methodologic study comparing linear radiographic with histometric measurements. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants* 16:475–485.
53. Nevins, M; Camelo, M.; Nevins M.L.L.; Schupbach, P.; Kim, D.M. (2012b). Reattachment of connective tissue fibers to a laser-microgrooved abutment surface. *International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*. 32: e131-4.
54. Sawase, T.; Wennerberg, A.; Hallgren, C.; Albrektsson, T.; Baba, K. (2000) Chemical and topographical surface analysis of five diferente implant abutments. *Clinical Oral Implants Research* 11: 44–50.
55. Nevins, M.; Nevins, M.L.; Camelo, M.; Boyesen, J.L.; Kim, D.M. (2008). Human histologic evidence of a connective tissue attachment to a dental implant. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*; 28:110–121.
56. Leonhardt, A; Gröndahl, K.; Bergström, C.; Lekholm, U. (2002) Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clinical Oral Implants Research* 13: 127–132.

57. Roos-Jansaker, A.M.; Lindahl, C.; Renvert, H.; Renvert, S. (2006a) Nine- to fourteen-year followup of implant treatment. Part II: presence of periimplant lesions. *Journal of Clinical Periodontology* 33: 290–295.
58. Aglietta, M.; Siciliano, V.I.; Rasperini, G.; Cafiero, C.; Lang, N.P.; Salvi, G.E. (2011) A 10-year retrospective analysis of marginal bone-level changes around implants in periodontally healthy and periodontally compromised tobacco smokers. *Clinical Oral Implants Research*. 22: 47-53.
59. Simonis, P.; Dufour, T.; Tenenbaum, H. (2010) Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants *Clinical Oral Implants Research*. 21:772-7.
60. Casado, P.L.; Balduino, A.; de Mello, W.; Barboza, E.P.; Duarte, M.E..(2011) Identification of periodontal pathogens in healthy peri-implant sites. *Implant Dentistry* 20:226-235.
61. Koldslund, O.C.; Scheie, A.A.; Aass, A.M. (2010) Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *Journal of Periodontology*. 81: 231-8.
62. Costa, F. O.; Takenaka-Martinez, S.; Cota, L.O.M.; Ferreira, S.D.; Silva, G. L.M.; Costa, J.E. (2012). Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *Journal of Clinical Periodontology*, 39: 173-181.
63. Mir-Mari, J.; Mir-Orfila, P.; Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellón, E.; Gay-Escoda, C. (2012). Prevalência de doenças peri-implante. Um estudo transversal de base em uma clínica privada. *Journal of Clinical Periodontology*, 39: 490-494.
64. Mombelli, A. & Lang, N.P. (1998).The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology* 2000 17: 63-76.
65. Fransson, C.; Lekholm, U.; Jemt, T.; Berglundh, T. (2005) Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clinical Oral Implants Research*, 16: 440–446.
66. Fransson, C.; Wennström, J.; Tomasi, C.; Berglundh, T. (2009), Extent of peri-implantitis-associated bone loss. *Journal of Clinical Periodontology*, 36: 357–363.
67. Ferreira, S. D.; Silva, G.L.M.; Cortelli, J.R.; Costa, J.E.; Costa, F.O. (2006), Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 33: 929–935.
68. Charalampakis, G.; Leonhardt, A.; Rabe, P.; Dahlén, G. (2012) Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clinical Oral Implants Research* 23: 1045-1054.

69. Seymour, G.J. & Gemmel, E. (2001) Cytokines in periodontal disease: where to from here. *Acta Odontologica Scandinavica* 59: 167-173.
70. Jankovic, D.; Sher, A.; Yap, G. (2001) Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision make by committee. *Current Opinion in Immunology* 13:403-409.
71. Andrade, C.F.C.; Silva, L.C.L.; Barros, M.B.; Casado, P.L. (2012) análise clínica da utilização da pasta de iodofórmio na região peri-implantar: série de casos. *Brazilian Journal of Periodontology* 22: 47-5.
72. Abrahamsson, I.; Zitzmann, N.U.; Berglundh, T.; Linder, E.; Wennerberg, A.; Lindhe, J. (2002) The mucosal attachment to titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *Journal Clinical Periodontology* 29: 448–455.
73. Cho-Yan Lee, J.; Mattheos, N.; Nixon, K.C.; Ivanovski, S. (2012) Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clinical Oral Implants Research* 23: 325–333.
74. Quirynen, M.; Vogels, R.; Pauwels, M.; Haffajee, A.D.; Socransky, S.S.; Uzel, N.G.; van Steenberghe, D. (2005) Initial subgingival colonization of pristine pockets. *Journal of Dentistry Research* 84:340–344.
75. Mombelli, A.; Marxer, M.; Gaberthüel, T.; Grander, U.; Lang, N.P. (1995), The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 22: 124–130
76. Jepsen, S.; Rühling, A.; Jepsen, K.; Ohlenbusch, B.; Albers, H.-K. (1996). Progressive peri-implantite. Progressive peri-implantitis. Incidence and prediction of peri-implant attachment loss. *Clinical Oral Implants Research* 7: 133-142
77. Tonetti, M.S.(1998). Risk factors for osseodisintegration. *Periodontology* 2000. 17:55-62.
78. Luterbacher, S.; Mayfield, L.; Brägger, U.; Lang, N.P. (2000), Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clinical Oral Implants Research*, 11: 521–529.
79. Mombelli, A.; Casagni, F.; Madianos, P.N. (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 29 Suppl 3:10-21; discussion 37-8.
80. Karoussis, I. K.; Müller, S.; Salvi, G. E.; Heitz-Mayfield, L. J.A.; Brägger, U.; Lang, N. P. (2004), Association between periodontal and peri-implant conditions: a 10-year prospective study. *Clinical Oral Implants Research*,15: 1–7.

81. Heitz-Mayfield, L.J.A. (2008), Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clinical Periodontology* 35: 292–304.
82. Anner, R.; Grossmann, Y.; Anner, Y., Levin, L. (2010) Smoking, diabetes mellitus, periodontitis, and supportive periodontal treatment as factors associated with dental implant survival: a long-term retrospective evaluation of patients followed for up to 10 years. *Implant Dentistry*. 19(1):57-64.
83. Zupnik, J.; Kim, S.W.; Ravens, D.; Karimbux, N.; Guze, K. (2011) Factors associated with dental implant survival: a 4-year retrospective analysis. *Journal of Periodontology* 82:1390-5.
84. Donos, N.; Laurell, L.; Mardas, N. (2012) Hierarchical decisions on teeth vs. implants in the periodontitis-susceptible patient: the modern dilemma. *Periodontology* 2000.591: 89-110.
85. Silva, G.L.M.; Ferreira, S.D.; Zenóbio, Z.E.; Soares, R.V.; Costa, F.O.; (2007) Mucosite peri-implantar e peri-implantite: prevalência e indicadores de risco em indivíduos parcialmente edêntulos . *Revista de Periodontia* 17: 90-97.
86. Karoussis, I. K.; Salvi, G. E.; Heitz-Mayfield, L. J.; Brägger, U.; Hämmerle, C. H.; Lang, N.P. (2003) Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI® Dental Implant System. *Clinical Oral Implants Research* 14: 329-339.
87. Sumida, S.; Ishihara, K.; Kishi, M.; Okuda, K. (2002). Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 17: 696-702.
88. Brocard, D.; Barthet, P.; Baysse, E.; Duffort, J.F.; Eller, P.; Justumus, P.; et al. (2000) A multicenter report on 1,022 consecutively placed ITI implants: a 7-year longitudinal study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 15: 691–700.
89. Evian, C.I.; Emling, R.; Rosenberg, E.S.; Waasdorp, J.A.; Halpern, W.; Shah, S.; Garcia, M. (2004) Retrospective analysis of implant survival and the influence of periodontal disease and immediate placement on long-term results. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 19: 393–398.
90. Renvert, S., Samuelsson, E.; Lindahl, C.; Persson, G. (2009). Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *Journal of Clinical Periodontology* 36: 604-609.
91. Sahm, N.; Becker, J.; Santel, T.; Schwarz, F. (2011). Non-surgical treatment of peri-implantitis using an air-abrasive device or mechanical debridement and local application of chlorhexidine: a prospective, randomized, controlled clinical study. *Journal of Clinical Periodontology* 38: 872-878.

92. Persson, G.R.; Roos-Jansåker, A.M.; Lindahl, C.; Renvert, S. (2011). Microbiologic results after non-surgical erbium-doped: yttrium, aluminum, and garnet laser or air-abrasive treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology* 82: 1267-1278.
93. Heitz-Mayfield, L.J.A.; Salvi, G.E.; Mombelli, A.; Faddy, M.; Lang, N.P. (2012). Anti-infective surgical therapy of peri-implantitis. A 12-month prospective clinical study. *Clinical Oral Implants Research* 23: 205–210.
94. Fransson, C.; Tomasi, C.; Pikner, S.S.; Gröndahl, K.; Wennström, J.L.; Leyland, A.H.; Berglundh, T. (2010). Severity and pattern of peri-implantitis-associated bone loss. *Journal of Clinical Periodontology* 37:442-8.
95. Stewart, P.S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology* 185:1485-1491.
96. Wilson, M. (1996). Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology* 44:79-87.
97. Adell, R.; Lekholm, U.; Rockler; Brånemark, P.I. (1981). A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery* 10: 387-416.
98. Quirynen, M.; Vogels, R.; Peeters, W.; van Steenberghe, D.; Naert, I.; Haffajee, A. (2006). Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clinical Oral Implants Research* 17: 25–37.
99. Eisenbarth, E.; Meyle, J.; Nachtigall, W.; Breme, J. (1996). Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. *Biomaterials*, 17: 1399-1403.
100. Quirynen, M.; Van Der Mei, H.C.; Bollen, C.M.L.; Schotte, A.; Marechal, M.; Doornbusch, G.I. et al. (1993). An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra-and subgingival plaque. *Journal of Dental Research* 72: 1304-1309.
101. Zitzmann, N. U.; Abrahamsson, I.; Berglundh, T.; Lindhe, J. (2002). Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. *Journal of Clinical Periodontology* 29: 456-461.
102. Hallström, H.; Persson, G. R.; Lindgren, S.; Olofsson, M.; Renvert, S. (2012). Systemic antibiotics and debridement of peri-implant mucositis. A randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*, 39(6), 574-581.
103. Park, J. B. (2012). Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a case report. *Gerodontology* 29: 145-149.

104. Jovanovic, S.A.; Kenney, E.B.; Carranza Jr., F.A.; Donath, K. (1993). The regenerative potential of plaque-induced peri-implant bone defects treated by a submerged membrane technique: an experimental study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 8: 13-8.
105. Machado, M.A.; Stefani, C.M.; Sallum, E.A.; Sallum, A.W.; Tramontina, V.A.; Nogueira-Filho, G.R.; et al. (2000). Treatment of ligature-induced peri-implantitis defects by regenerative procedures. Part II: A histometric study in dogs. *Journal of Oral Science* 42: 163-168.
106. Mombelli, A.; Feloutzis, A.; Brägger, U.; Lang, N.P. (2001). Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. *Clinical Oral Implants Research* 12: 287-294.
107. Estrela, C.; Estrela, C.R.D.A.; Hollanda, A.C.B.; Decurcio, D.D.A.; Pécora, J.D. (2006). Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. *Journal of Applied Oral Science* 14: 33-37.
108. Fernandes, K.P.S.; Puertas, K.V.; Bussadori, S.K. (2008) Análise comparativa in vivo da biocompatibilidade de pastas de iodofórmio. *ABO Nacional* 15:342-46.
109. Junior, J.A.S.; Wassall, T.; Ramalho, S.A (2006). Aplicação da pasta de iodofórmio em implantes. *Revista Gaúcha de Odontologia*. 54: 21-26.
110. Gomi, K.; Yashima, A.; Lino, F.; Kanazashi, M.; Nagano, T.; Shibukawa, et al. (2007). Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithromycin. *Journal of Periodontology* 78: 918-923.
111. Khan, W. A.; Saha, D.; Rahman, A.; Salam, M.A.; Bogaerts, J.; Bennish, M.L. (2002) Comparison of single-dose azithromycin and 12-dose, 3-day erythromycin for childhood cholera: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 360: 1722–1727.
112. Lai, P. C., Ho, W., Jain, N. & Walters, J. D. (2011) Azithromycin Concentrations in Blood and Gingival Crevicular Fluid After Systemic Administration. *Journal of Periodontology* 82, 1582–1586.
113. Golub, L.M.; Ramamurthy, N.; McNamara, T.F.; Gomes, B.; Wolff, M.; Casino, A. (1984) Tetracycline inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 19: 651–655.
114. Baker, P.J.; Evans, R.T.; Coburn, R.A.; Genco, R.J. (1983) Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *Journal of Periodontology* 54: 580–585.

115. Park, S.H.; Sorensen, W.P.; Wang, H.L. (2004) Management and prevention of retrograde peri-implant infection from retained root tips: two case reports. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 24: 422–433.
116. Choi, O.; Deng, K.K.; Kim, N.J.; Ross, L.; Surampalli, R.Y.; Hu, Z.Q. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 42: 3066–74
117. Gogoi, S.K.; Gopinath, P.; Paul, A.; Ramesh, A.; Ghosh, S.S.; Chattopadhyay, A. (2006) Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles *Langmuir* 22: 9322–8.
118. Atiyeh, B.S.; Costagliola, M.; Hayek, S.N.; Dibo, S.A (2007) Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 33: 139–48.
119. Watson, P.S.; Pontefract, H.A.; Devine, D.A.; Shore, R.C.; Nattress, B.R.; Kirkham, J., et al. (2005). Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *Journal of Dental Research* 84:451-455.
120. Wood, S.R.; Kirkham, J.; Marsh, P.D.; Shore, R.C.; Nattress, B.; Robinson, C. (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dental Research* 79:21-27.
121. Nel, A.E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.; Somasundaran, P.; et al. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* 8: 543-557.
122. Soni, I. & Salopek-Soni, B. (2004). Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid Interface Science* 275:177-182.
123. Cioffi, N.; Torsi, L.; Ditaranto, N.; Sabbatini, L.; Zambonin, P.G.; Tantillo, G.; et al. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials* 17:5255-5262.
124. Niakan, M.; Azimi, H. R.; Jafarian, Z.; Mohammadtaghi, G.; Niakan, S.; Mostafavizade, S.M. (2013). Evaluation of Nanosilver Solution Stability against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(6).

125. Rai, M.; Kon, K.; Ingle, A.; Duran, N.; Galdiero, S.; Galdiero, M. (2014). Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 98: 1951-1961.
126. Naddafi, K.; Jabbari, H.; Chehrehei, M. (2010) Effect of nanosilver painting on control of hospital air-transmitted microorganisms. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 7:223-8.
127. Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 3:95-101.
128. Elechiguerra, J.L.; Burt, J.L.; Morones, J.R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H.H., et al. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J Nanobiotechnol* 3: 6.
129. Cushing, B.L.; Kolesnichenko, V.L.; O'Connor, C.J. (2004). Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Review* 104:3893-3946.
130. Verran, J.; Sandoval, G.; Allen, N.S.; Edge, M.; Stratton, J. (2007). Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes and Pigments* 73:298-304.
131. Pal, S.; Tak, Y.K.; Song, J.M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1712-20.
132. Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R.R.; Feld, M.S. (1999) Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy *Chemical. Review* 99: 29-57.
133. Acosta-Torres, L.S.; Mendieta, I.; Nuñez-Anita, R.E.; Cajero-Juárez, M.; Castaño, V.M. (2012) Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine* 7: 4777–4786.
134. Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R.E.; Rubner, M.F. (2006). Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Langmuir* 22:9820-9823.
135. Boldryeva, H., Umeda, N., Plaskin, O.A.; Takeda, Y.; Kishimoto, N. (2005). High fluence implantation of negative metal ions into polymers for surface modification and nanoparticle formation. *Surface and Coatings Technology* 196:373-377.

136. Lee, W.F.; Tsao, K.T. (2006). Preparation and properties of nanocomposite hydrogels containing silver nanoparticles by ex situ polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* 100:3653-3661.
137. O'Hanlon, S.J. & Enright, M.C. (2009) A novel bactericidal fabric coating with potent in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 427–31.
138. Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52:662-668.
139. Yamanaka, M.; Hara, K.; Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7589-7593.
140. Giertsen, E. (2004). Effects of mouth rinses with triclosan, zinc ions, copolymer, and sodium lauryl sulphate combined with fluoride on acid formation by dental plaque in vivo. *Caries Research* 38:430-435.
141. Monteiro, D.R.; Gorup, L.F.; Takamiya, A.S.; Rodrigues, D.; Ruvoilo, A.C.; Barbosa, D.B. (2012) Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *Journal of Prosthodontics* 21:7–15.
142. International Standard. (1999). ISO 1567 for Dentistry-Denture base polymers.
143. Bulad, K.; Taylor, R.; Verran, J. (2004) Colonization and penetration of denture soft lining materials by *Candida albicans*. *Dental Materials*.20:167–175.
144. Matsuura, T.; Abe, Y.; Sato, Y.; Okamoto, K.; Ueshige, M.; Akagawa, Y. (1997). Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silverzeolite. *Journal of Dentistry* 25:373-377.
145. Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M.; Uchida, M. (2000). Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials* 16:452-455.
146. Ahn, S.J.; Lee, S.J.; Kook, J.K.; Lim, B.S. (2009). Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental Materials* 25:206-213.

147. Almaguer-Flores, A.; Ximenez-Fyvie, L.A.; Rodil, S.E. (2010). Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *Journal of Biomed Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 92:196-204.
148. Teughels, W.; Van Assche, N.; Sliepen, I.; Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* 17: 68-81.
149. Avila, G.B.D. Resina industrial de poliuretano modificada com terra diatomácea para ser empregada na modelagem odontológica (Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo).
150. Pereira, P.H.; Dias, S.C.; Ávila, G.B.; Ribeiro, J.C.R.; Moysés, M.R.; Agnelli, J. A.M.; Pereira, L.J. (2010). Avaliação do comportamento mecânico de modelos odontológicos obtidos em resina de poliuretano. *Arquivos em Odontologia*, 46:17-21.
151. Ahmad, N.; Sharma, S.; Shamsi, V.N.; Fatma, A.; Mehta, B.R. (2011) Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: a novel approach towards weed utilization. *Biotechnol Res Int.* 2011. 454090
152. New EU project AEROPATH takes on 'superbugs' (em inglês) (2008-11- 17). Página visitada em 03/07/2014.
153. Kumar, R.; Howdle, S.; Münstedt, H.(2005) Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 75:311–9.
154. Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M.; Uchida, M. (2000) Antibacterial effect of silver–zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater* 16:452–5.
155. Harrison, J.J.; Ceri, H.; Yerly, J.; Rabiei, M.; Hu, Y.; Martinuzzi R.; et al. (2007) Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilms. *Applied Environmental Microbiology* 73:4940–9.
156. Panacek, A.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R.; Soukupova, J.; Krystof, V.; et al. (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 30:6333-6340.

157. Bos, R.; Van Der Mei, H.C.; Busscher, H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiology Reviews 23:179–230.