

MILENA MIORALLI

**ADERÊNCIA BACTERIANA E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE TITÂNIO
COMERCIALMENTE PURO DE USO
ODONTOLÓGICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin
Pizzolitto

São Carlos,
2009

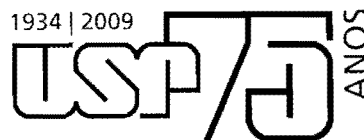
AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

M669a Mioralli, Milena
Aderência bacteriana e formação de biofilme em
superfície de titânio comercialmente puro de uso
odontológico / Milena Mioralli ; orientador Elisabeth
Loshchagin Fizzolitto. São Carlos, 2009.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola
de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2009.

1. *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 2. *Staphylococcus
epidermidis* ATCC 12228 RP 62A. 3. Titânio comercialmente
puro (Ti cp). I. Título.



MILENA MIORALLI
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 24/06/2009

PROFA. DRA. ELISABETH LOSHCHAGIN
PIZZOLITTO (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho"

Julgamento: aprovado

Assinatura: 

PROF. DR. ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

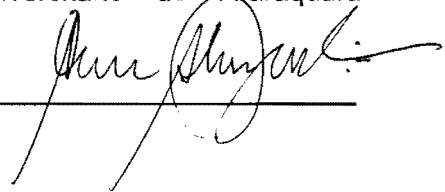
Julgamento: aprovado

Assinatura: 

PROF. DR. ADILSON CESAR ABREU
BERNARDI

Centro Universitário de Araraquara -
UNIARA

Julgamento: aprovado

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Antônio e minha mãe Rita, obrigada por estarem sempre ao meu lado me apoiando e pelo incentivo na persistência do meu sonho.

AMO VOCÊS...

Ao meu irmão, Paulo que me incentivou nesta jornada, me auxiliando, sem medir esforços nos momentos mais difíceis, obrigada por tudo...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto, minha sincera gratidão pelo desprendimento e empenho com que lançou a luta da nobre missão do ensino, estendendo a mão nas horas de dúvidas e nos momentos difíceis, apoiando em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que incomparável e inconfundível na sua infinita bondade, compreendeu, meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir o meu objetivo, pedindo força para sempre agir com eficiência em meu estudo.

Aos meus familiares por todos os momentos que passei em busca da realização desse meu sonho egocêntrico, não estive sozinha estivestes ao meu lado a me apoiar e a sofrer a dor da distância, que por muitos momentos nos separaram.

Ao meu namorado Romão que esteve sempre ao meu lado me apoiando, obrigada.

As funcionárias do setor de Microbiologia Clínica do CRD/NAC Benedita Reis de Abreu e Aline Voltan, pela colaboração e paciência, que também contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero obrigado.

Ao Instituto de Química-campus de Araraquara-UNESP, meus mais sinceros agradecimentos

À Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ- Rio de Janeiro, obrigada pela colaboração.

Aos demais professores da Bioengenharia obrigada pelo engrandecimento da minha cultura, que pelo resultado de um esforço comum, repartiram seus conhecimentos, transformando meus ideais em realizações.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia da UNESP de Araraquara, Flávio, Ana, Gabriela, Bruna e Cássio, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas de curso, tempos de passos e descompassos... Desses tempos, a certeza de que fica em nós a imagem do olhar embaraçado...o incômodo da dor...a necessidade do abraço apertado...a saudade de nós.

As minhas amigas de trabalho, Francini, Mayara, Andréia, Cristiane, Maristela, Márcia e Juliana do Laboratório Municipal de Araraquara, obrigada por tudo.

Enfim, o tempo passou e com ele o sofrimento das horas tristes, das despedidas e da ausência. Aos meus amigos, que foram presença constante na minha maneira de amar e de crescer. A homenagens se estendem a todos vocês, que sempre estiveram ao meu lado.

Onde você vê um obstáculo, alguém vê o
término da viagem e o outro vê uma chance de
crescer.
Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.
Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...
Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor
e a miséria total.
Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do
companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu
próprio passo.
E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue
enxergar.
"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

FERNANDO PESSOA

RESUMO

MIORALLI, M. **Aderência bacteriana e formação de biofilme em superfície de titânio comercialmente puro de uso odontológico.** 2009. 96f. Dissertação - (mestrado), Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

O objetivo deste estudo foi avaliar por métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura a aderência bacteriana sobre superfície lisa e rugosa (modificada por irradiação a laser) de titânio comercialmente puro (Ti cp). Os corpos-de-prova eram em forma de discos (12,0mm x 2,0mm). *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 RP 62A foram às bactérias selecionadas. A topografia das superfícies foram avaliadas por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV). As medidas do ângulo de contato permitiram conhecer a molhabilidade (hidrofobicidade) das superfícies. Os discos de Ti cp foram incubados em meio de cultura caldo Mueller Hinton inoculado com suspensão bacteriana da ordem de 10^8 (UFC)/mL, durante 1, 6, 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo de tempo, os discos foram retirados, lavados em solução salina fisiológica e após este procedimento foram colocados em novos tubos contendo 5,0mL de solução salina fisiológica esterilizada e submetidos ao banho ultrassônico de 40kHz por oito minutos. A seguir, da suspensão bacteriana resultante foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-6}), semeadas em ágar Mueller Hinton e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C para aguardar o desenvolvimento bacteriano. As colônias crescidas foram contadas, enumeradas e o valor expresso em UFC/mL para cada diluição. Os discos removidos do banho ultrassônico foram preparados para observação por MEV. A medida do ângulo de contato foi realizada em equipamento denominado goniômetro. O resultado da avaliação da viabilidade das células de biofilme de *S. mutans* sobre superfície lisa em média foi de $1,66 \pm 1,67 \times 10^6$ e sobre superfície rugosa $1,06 \pm 1,07 \times 10^6$ a nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes. Em média as células viáveis do biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície lisa foram de $6,68 \pm 5,83 \times 10^6$ a nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes. As células viáveis do biofilme de *S. epidermidis*, recuperadas em vários intervalos de tempo (1, 6, 24, 48 e 72h) da superfície rugosa $7,16 \pm 2,34 \times 10^6$ a nível 0,05 são significativamente diferentes. Em

relação à molhabilidade a superfície lisa é hidrofóbica, com um ângulo de 75° e a superfície rugosa hidrofílica, com um ângulo < 7°. Apesar da superfície lisa ser hidrofóbica e a superfície rugosa hidrofílica ambas as superfícies permitiram a aderência bacteriana e formação de biofilme, fato comprovado por MEV e por cultura. Comparando-se as superfícies lisa e rugosa - modificada por meio físico (aplicação de feixe de laser de alta intensidade Nd:YAG) não foi observada redução significativa no número de bactérias aderidas à superfície rugosa, o que permite concluir que a modificação de superfície por laser de alta intensidade cria superfície favorável para aderência de *S. mutans* e *S. epidermidis*, sem reduzir a aderência bacteriana, o que pode ser fator de risco para adquirir infecção.

Palavras chaves: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 RP 62A e Titânio comercialmente puro (Ti cp).

ABSTRACT

MIORALLI, M. **Adhesion bacterial and formation of biofilm on the surface of commercially pure titanium for dental use.** 2009. 96f. Dissertação - (mestrado), Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2009.

The objective of this study was assessed by microbiological methods and the scanning electron microscope on bacterial adhesion to smooth and rough (modified by laser irradiation) of commercially pure titanium (Ti cp). The bodies-of-proof was in the form of discs (12,0mm x 2,0mm). *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 RP62A were selected bacteria. The topography of the areas were evaluated by scanning electron microscope (SEM). Measures the angle of contact allowed to know the wettability (hydrophobicity) of the areas. Of Ti cp discs were incubated in culture media Mueller Hinton broth inoculated with bacterial suspension of approximately 10^8 (CFU)/mL, for 1, 6, 24, 48 and 72 hours. Each time, the discs were removed, washed in saline solution and after this procedure were placed into new tubes containing 5.0 mL of sterile saline solution and submitted to the ultrasonic bath for eight minutes of 40kHz. Then, the resulting bacterial suspension were serially diluted (10^{-1} - 10^{-6}), grown in Mueller Hinton agar plates and incubated in bacteriological incubator at 37°C to await the development blight. The grown colonies were counted, listed and the value expressed in CFU/mL for each dilution. Discs removed from the ultrasonic bath were prepared for observation by SEM. The measure of the angle of contact was made in equipment called goniometer. The result of evaluating the viability biofilm cells of *S. mutans* on smooth surface was on average of $1,66 \pm 1,67 \times 10^6$ at the 0,05 and on area rugosa $1,06 \pm 1,07 \times 10^6$ at the 0,05 average is not significantly different. On average the cells of the biofilm of *S. epidermidis* on smooth $6,68 \pm 5,83 \times 10^6$ at the 0,05 average is not significantly surface were different. The cells of the biofilm of *S. epidermidis*, recovered at various at intervals of time (1, 6, 24, 48 and 72h) of the area rugosa $7,16 \pm 2,34 \times 10^6$ 0,05 are significantly different. In relation to the smooth surface wettability is hydrophobic, with an angle of 75 ° and the hydrophilic surface rough, with an angle <7°. Despite the smooth surface is rough hydrophobic and

hydrophilic surface areas have both the adhesion and formation of bacterial biofilm, a fact evidenced by SEM and by culture. Comparing the smooth and rough surfaces - modified by the physical environment (application of the laser beam of high intensity Nd: YAG) was not observed a significant reduction in the number of bacteria adhered to the surface rough, which indicates that the modification of surface by high-intensity laser creates favorable surface for adhesion of *S. mutans* and *S. epidermidis*, without reducing the bacterial adhesion, which may be a risk factor for acquiring infection.

Key words: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 RP 62A and commercially pure titanium (Ti cp).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL (JSM-T330A).....	51
Figura 2: Imagem dos discos de Ti cp polidos.....	52
Figura 3: Imagem do equipamento Yb pulsado e aplicação do laser.....	53
Figura 4: Imagem dos discos de Ti cp de superfície rugosa.....	53
Figura 5: Esquema da formação <i>in vitro</i> de biofilme sobre a superfície lisa e rugosa.....	56
Figura 6: Esquema da avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme de <i>S. mutans</i> e <i>S. epidermidis</i>	59
Figura 7: Micrografia, com aumento de 1000 (esquerda - a) e 3.500X (direita - b), da superfície lisa do corpo-de-prova de Ti cp.....	61
Figura 8: Micrografias, com aumentos de 50X (a), 200X (b), 750X (c) e 1000X (d), da superfície rugosa do corpo-de-prova de Ti cp.....	62
Figura 9: Micrografia de superfície do Ti cp após 48h de incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>S. mutans</i> em (a) superfície lisa e em (b) superfície rugosa.....	63
Figura 10: Micrografia de superfície lisa do Ti cp após 48 h incubação em Mueller Hinton inoculado com suspensão de <i>S. mutans</i> em vários intervalos de tempo e submetidos à sonicação.....	64
Figura 11: Micrografia de superfície rugosa do Ti cp após incubação do corpo-de-prova em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>S. mutans</i> (10^8 ufc/mL) por 1, 6, 24, 48, 72 horas e submetido a sonicação.....	65
Figura 12: Micrografia de superfície do Ti cp após 48h de incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>S. epidermidis</i> em (a) superfície lisa e em (b) superfície rugosa.....	66
Figura 13: Micrografia de superfície lisa do Ti cp após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>S. epidermidis</i> (10^8 UFC/mL) por 1, 6, 24, 48, 72 horas e submetido a sonicação.....	67
Figura 14: Micrografia de superfície rugosa de Ti cp após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com <i>S. epidermidis</i> (10^8 UFC/mL) por 1, 6, 24, 48, 72 horas e submetidos a sonicação.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ti cp e suas composições máximas. ASTM F67-88.....	45
Tabela 2: Concentração máxima permitida para o Ti cp segundo a norma ASTM F67-88 (% m/m).....	45
Tabela 3: Distribuição da aderência do <i>S. mutans</i> em diferentes intervalos de tempo.....	69
Tabela 4: Distribuição da quantificação das células viáveis de <i>S. mutans</i> recuperadas dos discos de Ti cp após banho ultrassônico.....	69
Tabela 5: Distribuição da aderência do <i>S. epidermidis</i> em diferentes intervalos de tempo.....	71
Tabela 6: Distribuição da quantificação das células viáveis de <i>S. epidermidis</i> recuperadas dos discos de Ti cp após banho ultrassônico...	71
Tabela 7: Distribuição da molhabilidade das superfícies de Ti cp.....	73
Tabela 8: Distribuição das medidas de ângulo de contato das superfícies de Ti cp.....	73

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

Ca⁺: Íon calcio

N⁺: Íon nitrogênio

F⁺: Íon fluor

Ag: Íon prata

Sn: Íon estrôncio

Pt: Íon Platina

Cr: Íon cromo

Cu: Íon cobre

Pb: Íon chumbo

Zn: Íon zinco

P: Íon fósforo

C: Íon carbono

O: Íon Oxigênio

H: Íon Hidrogênio

Fe: Íon Ferro

Sn: Íon estrôncio

Pt: Íon Platina

Ar: Íon Argônio

Ti cp: Titânio comercialmente puro

UFC: Unidades formadoras de colônias

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

PMMA: Polimetilmetacrilato

TSA: Agar de soja tríptica

TSB: Caldo Triptona Soja

BHI: Infusão de Cérebro-coração

ATR: Resposta de ácido tolerância

DO: Densidade óptica

Ti6Al4V: Titânio alumínio vanádio

Rpm: Revoluções por minuto

PBS: Salina tamponada com fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos Gerais.....	43
3.1 Objetivos Específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODO	44
4.1 Material.....	45
4.1.1 Titânio comercialmente puro (Ti cp) – discos de superfície lisa e rugosa..	45
4.1.2 Microrganismos.....	46
4.1.2.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 RP62 A.....	46
4.1.2.2 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	46
4.1.3 Meios de cultura e reagentes.....	46
4.1.3.1 Caldo Triptona Soja (TSB).....	46
4.1.3.2 Infusão de Cérebro-Coração (BHI).....	47
4.1.3. 3 Caldo Mueller Hinton.....	47
4.1.3. 4 Ágar Mueller Hinton.....	47
4.1.3. 5 Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1).....	48
4.1.3.6 Solução A.....	48
4.1.3.7 Solução B.....	48
4.1.3.8 Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1).....	49
4.1.3.9 Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5%.....	49
4.1.3.10 Solução de etanol a 15%.....	49
4.1.3.11 Solução de etanol a 30%.....	49
4.1.3.12 Solução de etanol a 50%.....	49
4.1.3.13 Solução de etanol a 70%.....	49
4.1.3.14 Solução de etanol a 95%.....	50
4.1.3.15 Salina fisiológica a 0,85%.....	50
4.1.4 Goniômetro.....	50
4.1.5 Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV.....	50
4.1.6 Análise Estatística.....	51
4.2 MÉTODOS.....	51

4.2.1	Corpos-de-prova de Titânio comercialmente puro de superfície lisa.....	51
4.2.2	Corpos-de-prova de Titânio comercialmente puro de superfície rugosa....	52
4.2.3	Análise da molhabilidade das superfícies lisa e rugosa do Ti cp por meio de medida de ângulo de contato.....	53
4.2.4	Preparação das suspensões microbianas (MONTVILLE e SCHAFFNER, 2003).....	55
4.2.5	Formação <i>in vitro</i> de biofilme sobre a superfície lisa e rugosa de Ti cp (PIZZOLITTO et al., 2000; PIZZOLITTO et al., 2001).....	55
4.2.6	Avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme de <i>S. mutans</i> e <i>S. epidermidis</i> (MYANO et al., 2003).....	56
4.2.7	Diluições seriadas.....	57
4.2.8	Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície).....	58
4.2.9	Análise das superfícies lisa e rugosa de Ti cp, após a aderência bacteriana inicial e formação do biofilme de <i>S. mutans</i> e <i>S. epidermidis</i> , por meio de microscópio eletrônico de varredura - MEV (PIZZOLITTO, 1997).....	58
4.2.10	Análise Estatística.....	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Aspectos topográficos da superfície lisa e rugosa do Ti cp observados por MEV, antes da imersão em fase líquida.....	61
5.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da aderência inicial e formação do biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> sobre superfície lisa do Ti cp e superfície rugosa do Ti cp (modificada por irradiação a laser).	63
5.2.1	Resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de <i>S. mutans</i> em superfície lisa do Ti cp.....	63
5.2.2	Resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme em superfície rugosa do Ti cp, obtida por irradiação a laser.	64
5.3	Aderência inicial e formação do biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> sobre superfície lisa do Ti cp e superfície rugosa do Ti cp (modificada por irradiação a laser).....	66
5.3.1	Resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas.....	66

5.3.2 Resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> sobre superfície rugosa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas.....	68
5.3.3 Resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas.....	69
5.3.4 Quantificação de células viáveis de <i>Streptococcus mutans</i> recuperadas das superfícies lisa e rugosa de Ti cp.....	69
5.3.5 Estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa e rugosa de Ti cp incubado com <i>S. mutans</i>	70
5.3.5.1 Teste t – Student – superfície lisa.....	70
5.3.5.2 - Teste t – Student – superfície rugosa.....	70
5.3.5.3 – One Way – ANOVA.....	70
5.3.6 Resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas.....	71
5.3.7 Quantificação de células viáveis de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	71
5.3.8 Estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa e rugosa de Ti cp incubado com <i>S. epidermidis</i>	72
5.3.8.1 Teste t – Student – superfície lisa.....	72
5.3.8.2 Teste t – Student – superfície rugosa.....	72
5.3.8.3 One Way – ANOVA.....	72
5.3.9 Molhabilidade das superfícies de Ti cp: lisa e rugosa.....	72
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O titânio comercialmente puro tem sido o biomaterial mais comumente utilizado no campo da odontologia (LIU et al., 2004; VERSICK et al., 2004), para recolocar perdas dentárias, devido à sua excelente resistência à corrosão combinada com o excelente grau de biocompatibilidade no meio ambiente oral. A superfície do titânio é muito reativa principalmente devido à camada de óxido que recobre sua superfície (KASEMO e LAUSMAA, 1988).

O titânio adsorve proteínas, como a albumina, colágeno, fibronectina e fibrinogênio dos fluídos biológicos da cavidade bucal (STEINEMANN, 1998). As diferentes propriedades do titânio são capazes de influenciar a formação do osso no contato com o implante. A superfície rugosa oferece melhor ancoragem ao osso, quando comparada com a superfície lisa do titânio (WENNERBERG et al., 1995).

A rugosidade da superfície do titânio é também conhecida desempenhar um papel preponderante na adesão bacteriana (QUIRYNEN et al., 1996).

Os implantes dentais fornecem uma superfície para colonização microbiana (O'MAHONY et al., 2000). Estudos sobre a microbiota relacionada ao implante mostram que a bactéria sub e supragengival do implante é originalmente derivada da microbiota da cavidade bucal (HEIMDAHL et al., 1983). Os patógenos periodontais oportunistas, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e *Fusobacterium nucleatum* tem sido associados com peri-implantite e falha de implantes (LEONHARDT et al., 1999; VAN WINKELHOFF et al., 2000).

Um dos fatores para o sucesso dos implantes dentais é a manutenção dos tecidos saudáveis em volta deles. A acumulação de biofilme sobre o implante na cavidade bucal induz a uma inflamação nos tecidos moles em volta desse implante e pode levar a uma progressiva destruição (peri-implantite) e à falha do implante. Quando o tecido do hospedeiro é inadequado para estabelecer ou manter a osseointegração ocorre falha do implante (ESPÓSITO et al., 1998). A peri-implantite é um sítio específico de infecção resultando na perda do suporte do osso em volta de um implante osseointegrado (MOMBELLI et al., 1987).

Em 1952 Bränemark denominou osseointegração a integração dos implantes dentários com o osso (osseointegrados). Estes implantes formam a principal ferramenta na prótese dentária, desde reposição de um único dente até próteses dentárias totais (WEBER e LANG, 1991). No entanto, esses implantes podem falhar, por dois motivos, infecção bacteriana e stress mecânico (BECKER et al., 1990).

A infecção bacteriana dos biomateriais é o fator mais importante para a falha destas próteses médicas (RAZATOS et al., 1998), a adesão bacteriana inicial e o adicional desenvolvimento de complexo biofilme multibacteriano sobre a superfície do biomaterial é um problema clínico comum (COSTERTON et al., 1999; DRAKE et al., 1999).

A adesão da bactéria a superfícies sólidas depende de muitos fatores, inclusive das características bacterianas, fatores ambientais, como a presença de proteínas do soro e depende das propriedades de superfície do biomaterial (MABBOUX et al., 2004).

Para uma dada superfície do material, diferentes espécies bacterianas e cepas aderem de forma diferente e isto pode ser explicado por suas diferentes características físico-químicas. A rugosidade aumenta a área disponível para adesão, bem como os *pits* (orifícios pontuais) e defeitos de usinagem que fornecem sítios favoráveis para colonização (B RECX et al., 1983; NAKAZATO et al., 1989).

As diferentes propriedades e modificações na superfície do titânio são capazes de influenciar a formação do osso no contato com o implante, como também aumentar a velocidade e o sucesso da osseointegração. (PIER-FRANCESCO et al., 2006). A resposta do hospedeiro a formação do biofilme na superfície do implante incluem reações inflamatórias, que iniciam em tecidos moles, posteriormente a infecção da mucosa peri-implantada, ou seja, nas regiões adjacentes ao implante, definido como um processo inflamatório que afeta a função dos tecidos ao redor do implante osseointegrado, resultando na perda de suporte alveolar do osso (ALBREKTSSON et al.; 1994).

Embora a superfície rugosa possa albergar mais placa do que a superfície lisa (BOLLEN et al., 1996), ainda não está claro quando todas as espécies dos primeiros colonizadores preferem as superfícies rugosas e irregulares para a adesão inicial. Diferentes próteses ou implantes dentários tem acabamento ou rugosidade de superfície diferente e isto pode ter influência na aderência bacteriana e início da infecção relacionada ao biomaterial, pois uma superfície inorgânica como a do biomaterial pode ser colonizada por bactérias da cavidade bucal que colonizam os dentes e formam a placa dental (AN et al., 1997). As interações entre diferentes bactérias e entre bactéria e hospedeiro são fatores que controlam o equilíbrio da microbiota e o desenvolvimento de possíveis condições patológicas (KOLENBRANDER, 1988).

Todas as superfícies expostas da cavidade bucal são banhadas com uma camada de glicoproteínas (camada condicionante), fornecendo sítios receptores para a adesão bacteriana (GRISTINA, 1987). A película adquirida recobre tecidos moles e duros (LENDENMANN et al., 2000). Os primeiros colonizadores que incluem os *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* são capazes de reconhecer os componentes proteínicos (KOLENBRANDER e LONDON, 1993).

A composição da camada condicionante varia em diferentes partes da dentição (CARLEN et al., 1998), assim as diferentes propriedades dos biomateriais podem também influenciar a composição da película e iniciar a formação da placa dentária (LEONHARD et al., 1995). A adesão geralmente acontece por meio de adesinas, localizadas na superfície bacteriana ou por meio de fímbrias, as quais interagem com moléculas alvo específicas ou ligantes (ELLEN et al., 1997).

Quando a bactéria estiver firmemente aderida, começa a crescer e comunicar-se e começa o desenvolvimento do biofilme (QUIRYNEM e BOLLEN, 1995; COSTERTON, 1999) e as bactérias podem aderir entre si por meio de moléculas específicas, fazendo um processo de coagregação (WHITAKER et al., 1996; RICKARD et al., 2003).

No processo de coagregação a cepa bacteriana liga-se especificamente a outra bactéria e cada espécie parece ter um parceiro específico, como *Streptococcus* spp. com *Phorphyromonas gingivalis* com *Actinomyces naeslundii* e *Prevotella loescheii* com *Actinomyces israelii* (KOLENBRANDER, 1988).

A aderência é um passo essencial para colonização e o processo entre bactérias ocorre de maneira altamente seletiva; diferentes espécies entre gêneros, como por exemplo, *Streptococcus* spp., aderem melhor na língua e/ou bochecha, enquanto outros preferem não se desprender da superfície dentária (FRANDBSEN et al., 1991). A maioria das bactérias na cavidade bucal são transitórias, enquanto outras conseguem encontrar uma superfície adequada para colonização persistente (MARSH, 2003). A boca por ser um sistema de crescimento microbiano aberto, a bactéria necessita aderir a uma superfície, a fim de persistir e crescer (GIBBONS e VAN HOUTE, 1975).

O presente estudo avaliou a aderência de *S. mutans* e *S. epidermidis* sobre discos titânio comercialmente puro (12,0mm x 2,0mm) de superfície lisa e superfície rugosa, material usado na manufatura de implantes dentais, por meio de microscópio eletrônico de varredura, estimar quantitativamente as células bacterianas viáveis

recuperadas dos discos de titânio e também avaliar a molhabilidade das superfícies em estudo, através da medida do ângulo de contato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O titânio comercialmente puro e suas ligas são muito utilizados em implantes dentais devido à sua biocompatibilidade (BREME, 1989; ELAGLI et al., 1989), resistência a corrosão (BREME e WADEWITZ, 1989; ELAGLI et al., 1991) e biofuncionalidade (BREME, 1989). Estudos clínicos têm mostrado que o titânio apresenta boa aderência ao tecido duro e mole (ADELL et al., 1981; ERICSSON et al., 1986). E os efeitos biológicos deste metal sobre microrganismos passou a ser muito estudado (ELAGLI et al., 1992; WU-YUAN et al., 1995; STEINBERG et al., 1998; GROBNER-SCHREIBER et al., 2001; RIMONDINI et al., 2002; GROESSNER-SCHREIBER et al., 2004; MABBOUX et al., 2004; SCHWARZ et al., 2007).

Barth et al. (1989) estudaram *in vitro* a associação entre *Staphylococcus aureus* e implantes metálicos. Os biomateriais de grau cirúrgico e esterilizados em formato de disco (5mm x 1,5mm) eram de polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno de alto peso molecular (UHMWPE) e titânio alumínio vanádio (Ti6Al4V). Cada corpo-de-prova foi incubado em tampão PBS (5,4mL) inoculado, separadamente, com 0,6mL de suspensão de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (SE-360, cepa Yoshida, produtora de exopolissacarídeo) e (SP-2, cepa Bisno, não produtora de exopolissacarídeo). Os testes foram realizados em períodos de tempo de 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 48 horas e incubados a 37°C sob agitação constante. Após a incubação os discos foram removidos, lavados 4 vezes em tampão PBS, para remoção de bactérias não aderidas e sonicados por 30 minutos em PBS (10 mL) contendo 0,1% Tween-80 para destacamento das bactérias aderidas aos corpos-de-prova e a seguir, o sobrenadante foi diluído em tampão PBS (1:10⁴ a 1:10⁸). e semeadas em ágar sangue, incubados a 37°C por 24 horas, em estufa bacteriológica, para a contagem de unidade formadora de colônias (UFC) por placa. As UFC por discos foram computadas pelo número médio de UFC do ajuste das diluições das placas. Os resultados mostraram que após uma hora de incubação, o *Staphylococcus aureus* colonizou mais rápido e depois de 8 a 24 horas o *Staphylococcus aureus* estava presente em grande quantidade no metal e o *Staphylococcus epidermidis* apresentou-se em maior quantidade nos polímeros. Os autores concluíram que *S. epidermidis* é um problema crescente em infecções relacionadas ao biomaterial e está mais ligado ao uso freqüente de polímeros.

Elagli et al. (1990) relataram que a pesquisa de biomateriais tem se preocupado com a resposta dos tecidos, ou seja, biocompatibilidade de materiais para implantação dental ou ortopédica. Neste trabalho, os autores estudaram os efeitos do titânio em pó sobre cepas bacterianas encontradas na placa dental ou sulco gengival: *Streptococcus sanguis* (M5), *Peptostreptococcus anaerobius* (1008), *Veillonella* spp. (CD33), *Neisseria mucosa* (CD4), *Lactobacillus* spp. (CD8), *Actinomyces israelii* (JL15A) e *Fusobacterium nucleatum* (BM7C). As bactérias foram expostas ao titânio em pó incorporado ao ágar e em meio de cultura líquido. Todas as cepas bacterianas desenvolveram colônias com distribuição homogênea e, não foram encontradas diferenças entre as placas com titânio em pó e os controles. Também, não foram observadas áreas com inibição de crescimento bacteriano. No meio de cultura distribuído em placas a densidade de colônias crescidas, de todos os microrganismos submetidos ao teste, foi idêntica para o controle e meios em placas que continham o titânio em pó. O crescimento bacteriano analisado em meio de cultura líquido acrescido com pó de titânio, mostrou que o controle e as bactérias expostas ao pó de titânio apresentaram taxas de crescimento idênticas. Os autores concluíram que as partículas de titânio não tiveram influência no crescimento bacteriano das sete diferentes espécies bacterianas que comumente são encontradas na cavidade oral.

Chang, Merritt (1994) analisaram o papel da aderência bacteriana no desenvolvimento da infecção no local do implante. A pesquisa foi desenvolvida usando corpos-de-prova de formato cilíndrico de 3mm x 10mm, de materiais ortopédicos de grau cirúrgico de aço inoxidável 316L, titânio comercialmente puro, polimetilmetacrilato sem gentamicina e com gentamicina. Os corpos-de-prova de aço inoxidável, titânio, polimetilmetacrilato e polimetilmetacrilato com gentamicina foram introduzidos em tubos teste contendo caldo de soja tríptica (TSB) inoculado com suspensão de 10^7 UFC/mL de *S. epidermidis* RP 62A e incubados sob agitação constante a 37°C. A seguir os corpos-de-prova foram lavados com salina, colocadas em tubos separados contendo salina e posteriormente levados ao banho ultrassônico por 15 minutos. A suspensão resultante foi usada para contagem de colônias em ágar de soja tríptica (TSA). Os resultados obtidos mostraram que a aderência ao aço inoxidável foi significativamente maior do que para outros materiais. A aderência ao polimetilmetacrilato com gentamicina foi significativamente menor do que para os

outros materiais. A diferença na aderência entre polimetilmetacrilato e titânio não foi significativa. Os autores concluíram que a habilidade do organismo de aderir ao material *in vitro* está correlacionada com a propensão de causar infecção relacionada ao biomaterial. Os autores relataram que a aderência do *S. epidermidis in vitro* foi maior para aço inoxidável, seguido do polimetilmetacrilato e titânio comercialmente puro e foi menor para polimetilmetacrilato com gentamicina.

Cordero et al. (1994) avaliaram em experimentos com ratos, a suscetibilidade a infecção de superfícies titânio e cobalto-cromo, com superfícies lisas e superfícies porosas. Foram utilizados cilindros (30mm x 3mm) de cobalto-cromo e titânio, com superfícies lisas e porosas, para implantação em ossos de ratos. Estes metais foram previamente inoculados com suspensões em várias doses de *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que as concentrações de bactérias necessária para produzir infecções em implantes porosos de titânio foi 2,5 vezes menor do que para infectar implantes com superfícies polidas de titânio. As concentrações bacterianas necessárias nos implantes de cobalto-cromo foram 40 vezes menores do que os necessários para infectar implantes com superfícies polidas, e 15 vezes menor do que os exigidos para infectar implantes porosos de implantes de titânio. As outras vantagens e desvantagens dos vários implantes, tais como a melhoria da osseointegração, grande liberação de íon das superfícies e desgaste superficial, foi ponderado contra os mais elevados índices de infecção em implantes porosos, e particularmente em implantes de cobalto-cromo. Os autores concluíram que a relevância clínica destes resultados é que a suscetibilidade à infecção deve ser considerada entre as vantagens e desvantagens dos modelos concorrentes do implante. Implantes porosos, especialmente aqueles feitos de cobalto-cromo, podem exercer um maior risco de infecção do que superfícies lisas.

Wu-Yuan et al. (1995) relataram que apesar do largo uso de implantes dentais o entendimento, dos mecanismos de aderência bacteriana à superfície do implante e os fatores que afetam essas aderências, é limitado. A aderência de bactérias da cavidade bucal, incluindo: *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*, ao disco de titânio (Ti) com diferentes morfologias de superfície (lisa e rugosa) foi examinada por microscópio eletrônico de varredura (MEV). A maior aderência foi observada na superfície rugosa do titânio. A superfície

lisa promoveu pouca aderência para *S. sanguis* e *A. viscosus*. No entanto, *P. gingivalis* aderiu bem nas superfícies lisa e rugosa do titânio, observações baseadas na quantificação celular direta e microscopia eletrônica de varredura - MEV. As fimbrias (organelas de superfície celular e envolvidas diretamente na adesão) observadas em *A. viscosus* e *P. gingivalis* foram associadas com a superfície do titânio. As características da superfície do implante parecem influenciar a aderência *in vitro* da bactéria da cavidade bucal. Os autores concluíram que o sistema *in vitro* é útil para futuros estudos sobre aderência bacteriana em superfícies de implante.

Persson et al. (1996) examinaram a microbiota da superfície interna de 28 componentes de implantes Branemark em 10 pacientes parcialmente desdentados que tinham sido tratados com prótese parcialmente fixa. Os autores avaliaram a colonização bacteriana na superfície interna de componentes de implantes, a partir de exames microbiológicos e radiográficos de próteses fixas que estiveram em uso por um período de um a oito anos. As amostras bacterianas foram obtidas de várias superfícies internas do sistema implante. A identificação foi baseada na coloração de Gram, sensibilidade ao oxigênio e testes bioquímicos. A superfície interna dos diferentes componentes do implante Branemark, após vários períodos de uso na cavidade oral, consistiu de microbiota anaeróbia. As amostras individuais mostraram grande variação. A microbiota consistiu de estreptococos facultativos e anaeróbios, bacilos anaeróbios Gram-positivos como: *Propionibacterium* spp., *Eubacterium* spp. e *Actinomyces* spp.; bacilos Gram-negativos incluindo *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. Os autores relataram que existem razões para sugerir que a presença de bactéria é o resultado de contaminação dos componentes do implante e transmissão do microrganismo do ambiente oral durante o uso.

König et al. (1998) relataram que *Staphylococcus epidermidis* RP 62 A, cepa produtora de *slime* e a mutante M7 isogênica *slime* negativa, aderem ao disco de titânio comercialmente puro, com contagem de colônias significativamente mais altas para a cepa produtora de *slime*. A contagem de colônia variou conforme a cepa, temperatura e tempo. A incubação por tempo mais prolongado (24 horas) sob as condições de crescimento, mostrou contagem de colônias mais alta para cepa RP 62 A produtora de *slime*. A cepa mutante M7 não produtora de *slime*, aderiu, mas não

formou camadas múltiplas sobre a superfície metálica, o aumento do tempo de incubação não aumentou o número de unidades formadoras de colônia sobre a superfície metálica. Os autores concluíram que a produção de *slime* é importante para a aderência e subsequente acumulação do *S. epidermidis* sobre os discos de titânio comercialmente puro em testes *in vitro*.

Steinberg et al. (1998) estudaram a adesão de *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomicetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* ao titânio (Ti) e liga de titânio (Ti-6-Al-4V) revestido com albumina ou saliva humana. Todas as bactérias testadas mostraram aderência maior à liga de titânio do que ao titânio. *P. gingivalis* mostrou adesão menor ao titânio e liga de titânio do que outras bactérias. A adesão de *P. gingivalis* e *A. actinomicetemcomitans* foi grandemente reduzida para titânio ou liga de titânio revestida com albumina ou saliva. *P. gingivalis* demonstrou redução menor na adesão às superfícies revestidas com albumina ou saliva. Os autores concluíram que a bactéria oral tem diferentes afinidades de adesão para titânio e liga de titânio e que a albumina e saliva reduzem a adesão bacteriana.

König et al. (1999) mostraram em um estudo *in vitro* que a aderência de uma cepa produtora de *slime* (RP 62 A) foi comparada com sua mutante *slime* negativa isogênica (M7). Discos de metal de biomaterial padronizado foram incubados sob condições de crescimento em caldo trípico de soja, contendo cada cepa RP 62 A ou M7. Após 24 horas de incubação, a bactéria aderida foi removida por banho ultrassônico e as unidades formadoras de colônias foram contadas após plaqueamento das diluições seriadas. Os autores observaram um aumento significativo de aderência e acumulação das cepas produtoras de *slime* (RP 62 A). Ao contrário, da mutante *slime* negativa (M7) ($p=0,0001$). O número elevado de unidades formadoras de colônia foram observadas para as cepas produtoras de *slime* sobre polietileno e polimetilmetacrilato. A mutante *slime* negativa perdeu a habilidade de acumulação. Os resultados *in vitro* mostraram a relevância da produção do *slime* por *S. epidermidis* para colonização de biomateriais *in vitro*, com a preferência para polietileno e polimetilmetacrilato.

König et al. (2000) relataram que a resistência aos antibióticos, do *S. epidermidis* (patógeno das infecções relacionadas aos implantes) está relacionada a produção de *slime* que impede o acesso do antibiótico e a atuação do mecanismos de defesa do hospedeiro. Estudos *in vitro* de diferentes cimentos ósseos contendo antibióticos, desenvolvidos para prevenir a infecção associada ao biomaterial, nem sempre conseguem demonstrar a completa erradicação da bactéria aderente ao biomaterial. Os autores investigaram quatro diferentes cimentos ósseos com respeito a acumulação bacteriana da cepa RP 62 A produtora de *slime* e a mutante M7 isogênica, não produtora de *slime*, usando o teste de adesão bacteriana e o teste de sensibilidade pelo método de disco difusão. Os resultados demonstraram que a produção de exopolissacarídeo tem um efeito significativo na acumulação sobre cimento ósseo. O cimento ósseo com gentamicina/clindamicina foi o único biomaterial testado que produziu uma grande zona de inibição na área inoculada adjacente ao biomaterial. Os autores concluíram que a adesão bacteriana não foi reduzida significativamente e não houve correlação entre as zonas de inibição em ágar sangue em placas e o teste de adesão quantitativo. A eficácia clínica dos cimentos ósseos com gentamicina/clindamicina deve ser comprovada com testes *in vivo*.

Yoshinari et al. (2000) avaliaram a influência da modificação da superfície do titânio sobre a aderência inicial da *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 43718. As modificações de superfície foram realizadas com processos secos que incluíram implantação dos íons (Ca^+ , N^+ , F^+), oxidação (oxidação anódica e spray de titânio), revestimento com íon (TiN, alumina) e emissão de íons mistos (Ag, Sn, Pt) com Ar^+ sobre placas polidas de titânio puro. Comparando-se as duas bactérias, foram observadas grandes quantidades de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* aderidos às placas de titânio puro polido. O grau de adesão do *P. gingivalis* mostrou uma correlação positiva com a energia livre de superfície e a quantidade de adsorção do íon cálcio. A aderência de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* aumentou sobre a superfície modificada pela implantação do cálcio, quando comparada com a superfície polida do titânio, enquanto que a aderência do *P. gingivalis* diminuiu sobre a superfície revestida com alumina. Os resultados indicaram que os implantes de titânio expostos na cavidade oral requerem a modificação de superfície para inibir a

aderência da bactéria oral e, a modificação de superfície com processo seco é útil para controlar a adesão da bactéria oral, bem como assegurar a resistência contra corrosão.

Gaggl et al. (2000) notificaram que a qualidade do desenho e da superfície do implante de titânio são de vital importância para a estabilidade de longo tempo após a implantação. Quatro diferentes superfícies de implantes tratadas individualmente foram analisadas com especial enfoque ao tratamento com laser. As superfícies com rugosidade usinada, cobertura do titânio com spray, tratamento com óxido de alumina e tratamento com laser foram examinadas individualmente. As superfícies foram examinadas por meio de microscópio eletrônico de varredura. As superfícies com qualidades ótimas foram obtidas pelo plasma spray e tratamento a laser. Em resumo a superfície de titânio com estrutura ótima foi aquela tratada com laser.

Gröbner-Schreiber et al. (2001) relataram que a adesão bacteriana a superfície do implante de titânio tem uma forte influência sobre a cicatrização resultante do implante dental. Parâmetros como rugosidade da superfície e composição química da superfície do implante dental tem um impacto significativo na formação do biofilme. Os autores avaliaram a influência de dois revestimentos duros sobre a adesão bacteriana e compararam com as superfícies controle de equivalente rugosidade. Dois componentes da microbiota oral *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* foram usados para o estudo. Discos de titânio comercialmente puro foram modificados usando quatro diferentes tratamentos de superfície: deposição física do vapor (*physical vapour deposition*-PVD) com nitreto de titânio (TiN) ou nitreto de zircônio (ZrN), oxidação térmica e estruturação com radiação a laser. Superfícies polidas de titânio foram usadas como controle. A topografia da superfície foi examinada por microscópio eletrônico de varredura e a estimativa da rugosidade da superfície foi obtida por meio de perfilômetro. As medidas de ângulo de contato foram efetuados para o cálculo da energia livre de superfície. Os discos de titânio foram incubados nas respectivas suspensões das células bacterianas por uma hora e as únicas colônias formadas pela aderência da bactéria foram contadas usando microscópio de fluorescência. As medidas do ângulo de contato mostraram diferenças significantes entre as modificações da superfície. A rugosidade da superfície (Ra) de todas as superfícies examinadas foi

de 0,14 e 1,00 μ m. Uma significativa redução do número de bactéria aderente foi observada sobre a superfície do titânio modificada com materiais duros como TiN, ZrN e oxidado termicamente, quando comparado com as superfícies polidas. Em conclusão, a modificação física da superfície do implante de titânio como os revestimentos com TiN ou ZrN podem reduzir a aderência bacteriana e por isso melhorar os resultados clínicos.

Zhu et al. (2001) estudaram a resistência ácido induzida pela formação do biofilme de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Os biofilmes artificiais de 24 horas foram produzidos sobre lamínulas de vidro e imersos em tampão lactato 0,1M pH 3,8 por 10 minutos. Os biofilmes foram também expostos a solução de sacarose 5% por 20 minutos para simular um choque ácido, produzido pelo metabolismo da sacarose. O pH mínimo resultante no biofilme foi medido por meio de microscópio de varredura com focal a laser e coloração de isotiocianato de fluoresceína. Os organismos vivos e mortos do biofilme foram diferenciados pelo microscópio de varredura com focal a laser e coloração SYTO9. Os mesmos processos foram usados para tratar organismos planctônicos. Os resultados mostraram que os biofilmes que, não receberam nutrientes e as células planctônicas, houve significativamente mais bactérias viáveis após o choque ácido induzido pelo ácido láctico ou durante o consumo de sacarose, do que o biofilme que recebeu nutrientes e células planctônicas. Também, os biofilmes foram mais resistentes ao choque ácido induzido pelo ácido láctico do que as células planctônicas, enquanto que resultados similares foram obtidos onde foi usada a sacarose como fonte de carbono para reduzir o pH em biofilme e células planctônicas. Desta forma, os autores sugerem que o não recebimento de nutrientes, ou o estado de inanição, protege o biofilme e células planctônicas de *S. mutans* do choque ácido induzido tanto pelo ácido láctico ou durante o consumo de sacarose, enquanto que a formação do biofilme parecia proteger a bactéria somente do choque ácido induzido pelo pH 3,8 do tampão de lactato, mas não do choque ácido de pH ligeiramente mais alto produzido durante o consumo de sacarose.

Rimondini et al. (2002) avaliaram a colonização microbiana sobre novos materiais cerâmicos desenvolvidos para manufatura de parafusos de suporte de implante dental (*abutment*). Os materiais usados nesse experimento foram discos de

material cerâmico feitos de zircônia estabilizada com ítrio (Y-TZP) e titânio comercialmente puro grau 2 e seus respectivos eluatos, os quais foram testados *in vitro* com as seguintes bactérias: *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*. A proliferação bacteriana foi avaliada, por meio de halos de inibição em volta dos orifícios, cavados em placas contendo ágar sólido e inoculados os eluatos obtidos dos materiais. A adesão bacteriana sobre os materiais foi avaliada por espectrofotometria pela quantificação da produção de *slime* pela mesma bactéria. A adesão bacteriana inicial foi avaliada em seres humanos voluntários e observada por meio de microscópio eletrônico de varredura. Os resultados obtidos mostraram que não houve inibição da proliferação bacteriana usando eluatos. No teste *in vitro* *S. mutans* aderiu muito mais ao material de zircônia, do que aos discos de Ti, enquanto *S. sanguis* aderiu facilmente aos discos de Ti. E nenhuma diferença foi notada para *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* e *Porphyromonas gingivalis*. In vivo Y-TZP acumulou menos bactéria do que Ti, em termos de número total de bactéria e presença de bacilos Gram negativos patogênicos. De forma geral, o biomaterial cerâmico Y-TZP acumulou menos bactéria do que o Titânio. Em conclusão o Y-TZP pode ser considerado como um material promissor para a manufatura de parafusos de suporte para implantes.

Petö et al. (2002) usaram laser Nd: YAG para modificar a morfologia original da superfície do titânio de implantes dentais. O processo térmico modificou a superfície totalmente sem modificar a composição química e experimentos em animais demonstraram que este tratamento de superfície parece ser bastante promissor para melhorar a osseointegração de implantes dentais.

György et al. (2003) relataram que existem vários tipos de tratamento da superfície do implante, como o plasma-spray, jateamento com vários tipos de partículas como areia, vidro e óxido de alumínio, biomateriais absorvíveis como micropartículas de durapatitas, além de modificações químicas com ácidos e anodização e físicas como a irradiação a laser de alta intensidade Nd-YAG. Os autores estudaram por meio de microscópio eletrônico de varredura a modificação das superfícies de titânio comercialmente puro irradiadas com feixe de laser de alta intensidade Nd:YAG.

Groessner-Schreiber et al. (2004) relataram que o implante dental osseointegrado desempenha um importante papel em dentística restauradora. No entanto, o acúmulo de placa pode causar reações inflamatórias em volta do implante, às vezes levando a falha do implante. Os autores compararam a influência de dois revestimentos duros sobre a adesão bacteriana com a superfície do titânio puro. Foram usadas lamínulas de vidro finas cobertas com nitreto de titânio (TiN), nitreto de zircônia (ZrN) e titânio puro, as quais foram montadas sobre talas intraorais em dois adultos. Após 60 horas de exposição intraoral, o biofilme foi analisado para determinar o número de bactérias, o tipo de bactéria e a viabilidade da bactéria. As análises foram realizadas por biologia molecular. Os resultados mostraram que a contagem das células bacterianas eram mais altas sobre a lamínula de vidro revestidas com titânio puro do que sobre as revestidas com TiN e ZrN. O número mais baixo de células bacterianas estava presente sobre a lamínula coberta com ZrN. Contudo, a atividade metabólica da bactéria sobre o revestimento de TiN e ZrN pareceu ser mais baixa do que a atividade da bactéria sobre a superfície revestida com Ti.

Mabboux et al. (2004) compararam a retenção bacteriana sobre superfícies de titânio comercialmente puro grau 2 (Ti cp) e liga de titânio (Ti-6Al-4V) banhados com saliva e com similar rugosidade de superfície. Também, avaliaram a influência das propriedades físico-químicas da superfície dos materiais de implante e da cepa bacteriana, na aderência bacteriana *in vitro*. Foram usadas duas cepas bacterianas (uma hidrofílica e uma hidrofóbica) e foram avaliados: a aderência da célula bacteriana, valores SFE e de Lifshitz-van-der Waals, os componentes ácido base do SFE, a energia livre interfacial e as interações não dispersivas de acordo com dois métodos complementares de medida de ângulo de contato (o método da gota séssil e o da bolha cativa). Os resultados obtidos mostraram que os padrões de aderência da célula bacteriana sobre as superfícies de Ti cp e Ti-6Al-4V banhados com saliva foram similares. Os achados poderiam sugerir que aquela colonização bacteriana, ou seja, a formação de placa é similar para as superfícies de Ti cp e liga de Ti banhadas com saliva e indicam que ambos materiais poderiam ser adequados para uso como parafusos de suporte para implantes ou cicatrização dos componentes do implante. As mesmas propriedades físico-químicas foram exibidas pelas superfícies de Ti cp e liga de Ti banhadas com saliva, como mostrado pelo método da gota

séssil e bolha cativa, podem explicar esta colonização bacteriana similar. O número de células aderidas do hidrofóbico *S. sanguis* foi duas vezes mais alto do que do hidrofílico *S. constellatus*. Os autores confirmam que as propriedades físico-químicas das cepas bacterianas da cavidade oral tem papel importante na retenção bacteriana nos materiais de implantes na presença de proteínas salivares adsorvidas.

Deppe et al. (2005) relataram que os sistemas de implantes modernos usados na região cervical não permitem o crescimento da mucosa em volta do implante. Os autores usaram laser para modificar o implante de titânio usados naquela região a fim de promover o crescimento da mucosa, desta forma criando uma barreira biológica contra infecção bacteriana. Sobre regiões polidas de implantes foram criadas crateras e canais sob condições atmosféricas normais. A análise da superfície foi realizada por meio de microscópio eletrônico de varredura e técnica de energia dispersiva de raios X (EDX). A irradiação com 3000 pulsos (650 mJ por pulso) resultou em superfície rugosa sob condição atmosférica normal. Os autores concluíram que a irradiação a laser modifica a superfície de titânio e além disso estudos são necessários para avaliar quando pode ser realizado o crescimento da mucosa no interior de canais criados na superfície do titânio.

Chin et al. (2006) notificaram que os micro-implantes são muito populares na clínica ortodôntica para efeito de ancoradouro esquelético. Contudo, a formação de biofilme sobre suas superfícies e subsequente infecção dos tecidos peri-implantados podem resultar tanto na esfoliação ou remoção cirúrgica desses implantes. Os autores avaliaram a formação de biofilme sobre cinco micro-implantes disponíveis no comércio. A composição dos elementos da superfície do micro-implante foi caracterizada por espectroscopia de fotoelétrons por raios X. Detectaram alta contaminação de carbono na superfície dos óxidos e traços de elementos inorgânicos (Ca, Cu, Cr, Pb, Zn e P), os quais desapareceram após pulverização catódica do íon Ar^+ . A rugosidade média de superfície (Ra) era de 182nm para o micro implante de titânio e 69nm para o micro-implante de aço inoxidável, medida tomada por microscópio de força atômica. O microscópio eletrônico de varredura revelou diferentes topografias de superfície entre os micro-implantes, variando de típicas ranhuras de usinagem para defeitos estruturais como poros e orifícios pontuais (*pits*). Os micro-implantes foram imersos em pool de saliva total humana

durante uma noite para crescimento do biofilme. Os biofilmes, sobre os micro-implantes foram tratados com enxaguatórios bucais de chlorhexidina e fluoreto, que apresentaram comparáveis números de organismos viáveis, mas, significativamente menos do que os micro-implantes não tratados. A comparação dos diferentes micro-implantes por regressão múltipla linear indicou que a formação do biofilme foi governada pela rugosidade da superfície do implante e da prevalência dos componentes ricos em carbono e oxigênio.

Pier-Francesco et al. (2006) relataram que o implante dental é uma importante opção de tratamento para recolocação de dentes perdidos. As falhas de implantes, podem ser promovidas pela perda de tecido como resultado de infecção bacteriana local (peri-implantite). A aderência bacteriana na superfície do implante, acredita-se ser influenciada pela rugosidade da superfície do material e energia livre de superfície. O objetivo desse estudo foi modificar estas propriedades do titânio e identificar qual o efeito destas modificações sobre a subsequente aderência bacteriana. Foram preparadas 16 amostras de titânio com diferentes rugosidades (R_a 34,57–449,42nm) usando procedimentos de polimento específicos. Dessas amostras, seis foram quimicamente alteradas por tratamento com plasma argônio e imersão em solução de silano para produzir diferentes hidrofobicidades de superfície. Uma teste de adesão *in vitro* usando *Porphyromonas gingivalis* foi usado para avaliar o efeito da modificação sobre a aderência bacteriana. A superfície do material com R_a 34,57±5,79nm, categorizada como muito lisa, teve uma significativa redução na adesão bacteriana. Esta redução não ocorreu com as superfícies lisa (R_a 155,00±33,36nm), rugosa (R_a 223,24±9,86nm) ou muito rugosa (R_a 449,42±32,97nm). A alteração da hidrofobicidade da superfície do material, também, não fez efeito sobre a adesão bacteriana. Conclusão: a adesão de *Porphyromonas gingivalis* ao titânio foi inibida para superfície com níveis de rugosidade abaixo daqueles geralmente encontrados para implantes/abutments (R_a 350nm). As considerações sobre estes achados pode ser benéfica na produção de implantes de titânio a fim de reduzir a colonização bacteriana.

Sisti et al. (2006) estudaram a superfície de implantes osseointegráveis utilizando discos de titânio irradiados com feixe de laser. Os discos foram irradiados

com feixes de laser de alta intensidade (Nd-YAG) e a seguir receberam camada de hidroxiapatita e tratamento térmico. As superfícies foram analisadas por meio de microscópio eletrônico de varredura e realizada a análise morfológica qualitativa com microfotografias em vários aumentos. A superfície irradiada com laser apresentou deformidade superficial e característica isomórfica; a aplicação de hidroxiapatita pelo método biomimético aumentou quantitativamente a área da superfície de titânio. Os autores concluíram que a modificação da superfície de titânio por laser e aplicação de hidroxiapatita melhoraram as características isomórficas não encontradas nos implantes comerciais.

Saginur et al.(2006) compararam a suscetibilidade do crescimento de bactérias planctônicas e de biofilme bacteriano a um único antibiótico e a combinações de antibióticos, a fim de identificar combinações antibióticos que são eficazes contra estafilococos obtidos a partir implante associados a infecções. Os antibióticos utilizados foram: Azitromicina, cefazolina, gentamicina, ciprofloxacina, ácido fusídico, linizolide, oxacilina, rifampicina e vancomicina. As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* (*S. aureus* resistente a metilina e *S. aureus* sensível a metilina) obtido a partir de infecções associadas á implantes. Os isolados cresceram como bactérias planctônicas e como biofilmes. As culturas de biofilmes foram muito mais resistente aos efeitos inibitórios e bactericida a único antibiótico ou combinações de antibióticos que as culturas planctônicas. O antibiótico rifampicina foi o constituinte mais comum da combinação de antibióticos ativos contra biofilmes de *Staphylococcus*. Outros antimicrobianos freqüentemente eficaz foram vancomicina e ácido fusidico. A partir dos ensaios de suscetibilidade com biofilme associada à bactéria sugeriram novas opções de combinação terapêutica antibiótica.

Lewandowska et al. (2007) estudaram as várias modificações sobre a superfície do titânio para melhorar a adesão celular e determinar sua influência sobre as propriedades da superfície do titânio. As superfícies modificadas e não modificadas foram observadas por microscópio eletrônico de varredura. As propriedades da superfície foram avaliadas pelas medidas de ângulo de contato e de rugosidade. Os resultados mostraram diferenças na morfologia do titânio modificado e a adesão dos osteoblastos não foi influenciada pela modificação da superfície.

Scott et al. (2007) avaliaram o efeito da superfície polida e vitrificada da cerâmica a base de zircônia no primeiro estágio de formação do biofilme dental e o efeito da escovação na remoção da bactéria aderida. Na cavidade bucal no lado direito e esquerdo foram fixados dois corpos-de-prova, um com superfície polida e outro com superfície vitrificada. Após 20 minutos, 1 hora e 6 horas os corpos-de-prova colocados no lado direito da boca foram manualmente escovados. As amostras foram analisadas usando microscópio eletrônico de varredura e observou-se a presença de um material granular sobre os corpos-de-prova, principalmente sobre as superfícies irregulares. Após uma hora, não houve significativa diferença entre as superfícies vitrificada e polida, em termos de presença bacteriana. O autores concluíram que a superfície vitrificada acumulou mais biofilme e a escovação não removeu completamente o biofilme, enquanto que a superfície polida apresentou baixa tendência de formar biofilme.

Schwartz et al. (2007) investigaram os efeitos da hidrofiliabilidade e microtopografia da superfície do implante de titânio na formação do biofilme supragengival. As amostras para teste foram manufaturadas com titânio comercialmente puro grau 2 de acordo com os procedimentos: polida (P), ácido (A), quimicamente modificado (mod), A (mod A), *sand-blasted large grit* e A (SLA) e modSLA. Talas intraorais foram usadas para coletar uma placa de biofilme supragengival em cada grupo em 12, 24 e 48 horas. O biofilme em placa (PB) foi corado e áreas em porcentagem foram avaliadas morfometricamente. Todos os grupos exibiram significantes aumentos da área media do PB em função do tempo ($p < 0,001$; respectivamente). As análises morfométricas revelaram as seguintes médias para áreas PB: 12 h: SLA=modSLA>P>A=modA ($p < 0,001$; respectivamente); 24 h: SLA>modSLA=P>A=modA ($p < 0,001$; respectivamente); 48 h: SLA=modSLA=P>A=modA ($p < 0,001$; respectivamente). Em conclusão: Dentro dos limites de um estudo piloto poderia ser concluído que a hidrofiliabilidade não teve efeito aparente, enquanto que a microtopografia teve uma influência altamente desigual e imprevisível sobre a formação do biofilme supragengival.

Wellin-Neilands e Svensäter (2007) relataram que *Streptococcus mutans* um membro da comunidade da placa dental tem sido envolvido no processo da cárie. As

células do *S. mutans* induzem a uma resposta de ácido tolerância (ATR) quando expostos a valores de pH sub-letais que aumentam sua sobrevivência em pH baixo. As células do biofilme maduro são mais resistentes ao stress ácido do que as células planctônicas. Os autores investigaram a habilidade de tolerância ao ácido e indução de ATR de células do biofilme de *S. mutans* recém aderidas. Todos os experimentos foram conduzidos em sistema de fluxo celular, com a tolerância ao ácido testada pela exposição das células do biofilme ao pH 3,0 por duas horas e contagem dos sobreviventes em placas contendo ágar sangue. Os experimentos da adaptabilidade ao ácido foram conduzidos pela exposição das células do biofilme ao pH 5,5 por 3 horas e abaixando o pH para 3,5 por 30 minutos. A viabilidade das células foi avaliada corando as células com corante de viabilidade LIVE/DEAD BacLight. Em três horas as células do biofilme de três diferentes cepas de *S. mutans* estavam entre 820 e 70.000 vezes mais ácido tolerantes do que as correspondentes células planctônicas. Estas cepas também induziram uma ATR que aumentou a viabilidade em pH3,5. A presença de fluoretos (0,5M) inibiu a indução de um ATR, com 77% a menos de células viáveis ao pH 3,5 como uma consequência. Os autores concluíram que a adesão a uma superfície é um importante passo na tolerância ao ácido por células do biofilme e que diferentes cepas de *S. mutans* possuem diferentes graus de ácido tolerância e habilidade de induzir uma ATR.

Tsang et al. (2007) investigaram o efeito do aumento da rugosidade da superfície de discos de titânio sobre a suscetibilidade de biofilmes de *Candida albicans* ATCC 90028 a anfotericina B. Foram utilizados discos (12mm x 1mm) de titânio comercialmente puro de Grau I, com rugosidade superficial de 0,90, 1,88 e 3,82 μm (grupos A, B e C), respectivamente ($P < 0,0001$). A suscetibilidade de antifúngicos aos biofilmes de *Candida albicans* cresceram em diferentes discos de titânio e foram analisados em microscópio eletrônico de varredura. A redução de 50% da atividade metabólica (50% RMA), do *C. albicans* em bactérias planctônicas foi muito menor do que os indivíduos dos grupos A, B e C, enquanto os 50% RMA dos Grupos B foi três vezes maior do que os grupos A e C. Os autores concluíram, que a diferença da rugosidade da superfície do titânio foi associada com variações na resistência antifúngica do biofilme de *Candida*. O Grupo C apresentou uma ótima rugosidade superficial para resistência do biofilme.

Mack et al. (2007) em uma revisão da literatura verificaram que as infecções associadas aos implantes é mais freqüentemente causada por *Staphylococcus* coagulase-negativa, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, de grande importância na medicina moderna. A aderência e formação de várias camadas de biofilmes bacterianos é o fator mais importante na patogênese destas infecções, regularmente, que não respondem à terapêutica antimicrobiana adequada. Os processos que elucidam os fatores funcionais na elaboração de biofilmes de *S. epidermidis* e a regulamentação de sua expressão com uma ênfase especial no papel de quorum sensing. Um significativo processo foi apresentado nos recentes anos, que fornece lógica para melhor desenvolvimento preventivo, terapêuticos e de medidas diagnósticas.

Barbour et al. (2007) avaliaram, *in vitro*, um protocolo convencional de polimento da superfície de titânio (PP1) e um protocolo simplificado de polimento de superfície de titânio (PP2) sugerido para obter vantagens sobre PP1. A morfologia da superfície e a rugosidade do titânio foram caracterizados em cada fase do processo de polimento e a aderência oral bacteriana foi avaliada usando microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica. Foram utilizados corpos-de-prova de titânio (3mm x 4mm). *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* foram as bactérias utilizadas. As metodologias de PP1 e PP2 resultaram em indistinguíveis acabamentos superficiais, menos riscos que a superfície inalterada, e rugosidade com valores iguais. A formação dos primeiros biofilmes de *S. mutans* foram reduzidas em superfícies polidas utilizando PP2, mas não PP1. Os biofilmes de *Actinomyces naeslundii* foram mais extensos sobre as superfícies polidas. Os autores concluíram que o protocolo simplificado PP2 é preferível que o protocolo convencional PP1, uma vez que menos material é removido e há uma menor chance de áreas remanescentes de diamante bruto. Os polimentos não reduzem necessariamente a colonização oral bacteriana.

Harris et al. (2007) estudaram a visualização e quantificação de *Staphylococcus aureus* 8325-4 aderindo superfícies rugosas de titânio comercialmente puro (TS) e Ti-6AL-7Nb (NS), aderência em superfícies polidas de titânio comercialmente puro (TE) e Ti-6AL-7Nb (NE) e aderência em superfícies

polidas de aço inoxidável (SS). Os resultados qualitativos e quantitativos de *Staphylococcus aureus* nas diferentes superfícies correlacionadas entre si, mostraram significativamente uma maior quantidade de bactérias vivas sobre a superfície NS que nas outras superfícies avaliadas, mostrando que não houve diferença entre a quantidade de bactérias nas superfícies de TS, TE, NE e SS. Houve uma significativa diminuição da quantidade de bactérias aderidas ao NE quando comparadas com a superfície do padrão NS, sugerindo que a superfície NS a aderência de *S. aureus* poderia levar a maiores taxas de infecção in vivo. O polimento das superfícies de Ti-6AL-7Nb poderia ser vantajoso em áreas de osteosíntese, minimizando a aderência bacteriana e diminuição da taxa de infecção.

Adachi et al. (2007) estudaram o desenvolvimento de método quantitativo para avaliar a diferença de resistência do aço inoxidável versus titânio a biofilmes de *Staphylococcus* e a eficácia de antibióticos contra os biofilmes. Foram utilizados três tipos de cepas de *Staphylococcus aureus*: cepa Seattle 1945 e duas cepas clínicas cultivadas a partir de infecções pós-operatórias. Os biofilmes de *Staphylococcus* foram formados em corpos-de-prova aço inoxidável e titânio (puro), que foram corados com cristal violeta e examinados com um microscópio digital para calcular a taxa de cobertura bacteriana (BCR), por imagiologia NHI. Os resultados mostraram que o BCR de biofilmes de *Staphylococcus aureus* formado em aço inoxidável e titânio aumentaram ao longo do tempo. Aos períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas após o cultivo, a quantidade de biofilmes nas superfícies do aço inoxidável foi significativamente maior ou tendeu a ser maior que sobre o titânio. A cefazolina foi aplicada aos biofilmes das duas cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clinicamente e mostraram que o antibiótico cefazolina utilizado não erradicou o biofilme, mas reduziu significativamente o biofilme de uma cepa. Concluindo que o método quantitativo recém-desenvolvido foi útil para avaliar a quantidade de bactérias na superfície dos biofilmes dos biomateriais analisados, onde o titânio mostra ser mais resistente á infecção bacteriana que o aço inoxidável. Para o controle de implantes relacionados com infecções graves, os biomateriais devem ser avaliados do ponto de vista de sua resistibilidade para aderências e infecções bacterianas.

LIMA et al. (2007) avaliaram o padrão de saliva e proteínas do soro presentes na película formada na superfície de titânio (Ti) e Zircônia cerâmica (ZrO₂), e a capacidade das células bacterianas em aderir as películas experimentais. Além disso, o perfil protéico e as propriedades bacterianas da película no Ti e ZnO₂ foram comparadas com aquelas formadas em superfície de hidroxiapatita (HA). As películas foram formadas pela incubação *in vitro* com todos os materiais presente na saliva, soro e saliva + soro. A composição protéica de cada uma das películas foram investigadas pela SDS-PAGE e imunodeteção. A aderência de *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* para superfícies não revestidas e películas experimentais foram determinadas por meios de contagem de cintilação. Em geral, a análise eletroforética das películas formadas sobre HA, Ti e ZrO₂ revelaram poucas diferenças qualitativas da composição protéica da película formado sobre as superfícies de HA, Ti e ZrO₂. Os componentes da película identificados incluíram amilase, IgA, IgG, albumina, fibronectina e fibrinogênio. O número de células de *S. mutans* aderidas ao titânio não revestido e ao ZrO₂ foi significativamente maior do que aqueles que aderiram a superfície HA (P<0,05). Em contraste, *A. naeslundii* obteve um menor número de células aderidas ao Ti não revestido e ZrO₂ que HA (P<0,05). No entanto a presença de saliva e películas de saliva + soro reduziu muito o número de células de *S. mutans* vinculadas a cada uma das superfícies. Os dados mostraram que a exposição do Ti e ZrO₂ semelhante a película protéica e propriedades bacterianas, foram observadas diferenças significativas quando os dois materiais foram comparados com HA.

Ahn et al. (2008) notificaram que as interações entre as aglutininas salivares e a adesina P1 do *Streptococcus mutans* contribui para agregação bacteriana e media a aderência sacarose dependente à superfície dos dentes. Os autores examinaram a formação de biofilme de *S. mutans* UA159 e cepas mutantes de localização ou expressão de P1, na presença de preparações de saliva adsorvida ou aglutinina salivar. A agregação de *S. mutans* induzida pela saliva total e aglutininas salivares foi adversamente afetada pela perda de P1 e sortase (SrtA), mas não pela perda do fator iniciador (RopA). A aglutinina salivar fase-fluída e a menos extensa, aglutinina imobilizada inibiu o desenvolvimento do biofilme pelo *S. mutans* na ausência de sacarose e, a saliva total foi mais efetiva na diminuição da formação do biofilme do que a aglutinina salivar. A inibição do desenvolvimento do biofilme pela aglutinina

salivar foi diferentemente influenciada por uma mutação particular, com a cepa P1-deficiente exibindo uma grande inibição no desenvolvimento do biofilme do que as cepas deficientes SrtA ou RopA. Como esperado, a capacidade de formação de biofilme de todas as cepas na presença de preparações salivares foram aumentadas na presença de sacarose, contudo, a formação de biofilme pelas mutantes foi menos eficiente do que pela cepa parental. A aeração inibiu fortemente o desenvolvimento do biofilme e a presença de componentes salivares não restauraram a formação do biofilme nestas condições. Os resultados divulgam a potente habilidade dos constituintes salivares para a moderada formação de biofilme por *S. mutans* por vias P1-dependentes e P1-independentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans* sobre a superfície de titânio comercialmente puro (Ti cp) por meio de microscopia eletrônica de varredura e determinar quantitativamente as células viáveis recuperadas do biofilme bacteriano.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Por meio de microscopia eletrônica de varredura observar a superfície lisa e rugosa do titânio comercialmente puro.

3.2.2 Determinar por cultura a viabilidade celular das bactérias recuperadas do biofilme.

3.2.3 Avaliar a molhabilidade da superfície lisa e rugosa do Ti cp por meio de medida de ângulo de contato.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL

4.1.1 Titânio comercialmente puro (Ti cp) – discos de superfície lisa e rugosa.

Ti cp é classificado em grau 1, 2, 3 e 4, conforme a norma ASTM F67-88 de acordo com a normatização de biomateriais. A principal diferença entre eles é a quantidade de oxigênio, nitrogênio e ferro presentes na sua composição, como exemplificado na tabela 1.

Tabela 1 - Ti cp e suas composições máximas. ASTM F67-88

Elementos (% máx)	G 1	G 2	G3	G4
N	0,03	0,03	0,05	0,05
C	0,10	0,10	0,10	0,10
H	0,015	0,015	0,015	0,015
Fe	0,20	0,30	0,30	0,50
O	0,18	0,25	0,35	0,40
Ti	balanço	balanço	balanço	balanço

A concentração máxima permitida de elementos para Ti cp segundo a norma ASTM F67-68 estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração máxima permitida para Ti cp segundo a norma ASTM F67-88 (% m/m)

Elementos	C	Fe	O	H	N	Ti
Ti cp	0,10	0,30	0,25	0,015	0,03	balanço

Os Corpos-de-prova de Ti cp em forma de disco (12mm x 2mm) foram cedidos pelo grupo de materiais, do Instituto de Química, campus de Araraquara, UNESP.

4.1.2 Microrganismos

4.1.2.1 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 RP62 A - cepa produtora de polissacarídeo extracelular.

4.1.2.2 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 – membro componente da microbiota oral e um dos primeiros colonizadores da superfície dos dentes.

Estas bactérias foram provenientes da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

4.1.3 Meios de cultura e reagentes

Os meios de cultura desidratados das marcas comerciais DIFCO® (Becton Dickinson; Sparks, USA) ou MERCK® (Darmstadt, Germany) foram preparados de acordo com as especificações do fabricante: Caldo Mueller Hinton; Ágar Mueller Hinton e Ágar Nutriente.

4.1.3.1 Caldo Triptona Soja (TSB) – (DIFCO)

Triptona.....	17,0g
Soitona.....	3,0g
Dextrose.....	2,5g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato di-potássico.....	2,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

Hidratar, de acordo com as especificações do fabricante, em água destilada, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.3.2 Infusão de Cérebro-Coração (BHI) – (MERCK)

Extrato de cérebro-coração e peptona.....	27,5g
D (+) glicose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Hidrogenofosfato di-sódico.....	2,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

Hidratar, de acordo com as especificações do fabricante, em água destilada, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.3.3 Caldo Mueller Hinton

Infusão de carne bovina.....	300,0g
Ácidos de casamino, técnico.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

Hidratar, de acordo com as especificações do fabricante, em água destilada, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.3.4 Ágar Mueller Hinton

Infusão de carne bovina.....	300,0g
Ácidos de casamino, técnico.....	17,5g
Amido.....	1,5g
Agar.....	1,5g
Água destilada.....	1000,0mL

pH 7,3 ± 0,2 a 25°C

Hidratar, de acordo com as especificações do fabricante, em água destilada, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

Os sais e demais reagentes eram de procedência MERCK® (Darmstadt, Germany), SIGMA® (Sigma-Aldrich Chemical; São Paulo, Brasil), REAGEN® (Quimibrás Indústrias Químicas; Rio de Janeiro, Brasil) BIOBRÁS® (Bioquímica do Brasil; Minas Gerais, Brasil) e FLUKA® (Chemika; Switzeland).

As soluções de etanol (v/v) nas concentrações de 15, 30, 50, 70, 95 e 100%, bem como as soluções do tampão fosfato (0,2M; 0,2M (pH 7,1); 0,1M (pH 7,1) e glutaraldeído 2,5% (0,1M) utilizadas na técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparadas no setor de Microbiologia Clínica do CRD-NAC da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, câmpus de Araraquara, São Paulo.

4.1.3.5 Tampão Fosfato 0,2M (pH 7,1)

Solução A	3,00mL
Solução B	67,00mL

4.1.3.6 Solução A

Fosfato monossódico 1-hidratado (MERCK).....	2,76g
Fosfato monossódico 1-hidratado (MERCK).....	2,76g

4.1.3.6 Solução B

Fosfato dissódico 12-hidratado (MERCK).....	7,17g
Água destilada.....	qsp.....100,0mL

4.1.3.7 Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1)

Tampão fosfato 0,2M (pH 7,1).....	50,00mL
Água destilada.....	50,00mL

4.1.3.9 Solução Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1) – Glutaraldeído a 2,5%

Tampão fosfato 0,1M (pH 7,1).....	48,50mL
Glutaraldeído 50% solução aquosa (FLUKA).....	2,50mL

4.1.3.8 Solução de etanol a 15%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	15,00mL
Água destilada.....	85,00mL

4.1.3.9 Solução de etanol a 30%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	30,00mL
Água destilada.....	70,00mL

4.1.3.10 Solução de etanol a 50%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	50,00mL
Água destilada.....	50,00mL

4.1.3.11 Solução de etanol a 70%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	70,00mL
Água destilada.....	30,00mL

4.1.3.12 Solução de etanol a 95%

Álcool etílico absoluto P.A. (MERCK).....	95,00mL
Água destilada.....	5,00mL

4.1.3.13 Salina fisiológica a 0,85%

Cloreto de sódio	0,85g
Água destilada	100,00mL

4.1.4 Goniômetro

O goniômetro é o instrumento usado para medir o ângulo de contato. Consiste de um instrumento automatizado com câmara digital de alta resolução e software para captura e análise do ângulo de contato. O goniômetro utilizado foi OCA-20 Contact Angle System (DataPhysics Instruments), equipamento instalado no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química - UNESP.

4.1.4 Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV

O Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV (Scanning Electron Microscope, SEM) (Figura 1) é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas além de produzir imagens de alta ampliação e resolução. As principais características do MEV são: Obtenção de imagens de superfícies polidas e rugosas, grandes aumentos (até 900.000 vezes) e aparência tridimensional. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra onde, ocorrendo uma interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE (ou ERE) - imagem de elétrons retroespalhados - ou nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários).



Figura 1: Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL (JSM-T330A)

4.1.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando software OriginPro (version 5.0) em intervalo de confiança a nível de 95%.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Corpos-de-prova de Titânio comercialmente puro de superfície lisa

As superfícies dos discos de Ti cp foram submetidas a um polimento em máquina politriz (MAXIPLAN[®]) com refrigeração por água e lixa d'água abrasiva (3M[®]) de granulometria 180 até obtenção de superfície plana e lisa (Fig. 2).



Figura 2: Imagem dos discos de Ti cp polidos, prontos para serem estudados (12 x 12mm)

4.2.2 Corpos-de-prova de Titânio comercialmente puro de superfície rugosa

Para se obter superfície rugosa, os discos de Titânio comercialmente puro de superfície lisa receberam irradiação de laser Nd-YAG, com energia de 100W/m^2 , frequência de pulso de 35.000Hz , velocidade de varredura de 80mm/s , ritmo 1, espaço da matriz $0,01\text{cm}$ e tempo de dois minutos, em condições de ajuste pré-estabelecido. O feixe de laser foi aplicado por meio do aparelho Yb pulsado (DML-100, Violin Sistema Omnmark-Laser, Fibra Óptica-Yb pulsado, 20W) do departamento de Físico-Química do Instituto de química-UNESP (Fig.3).

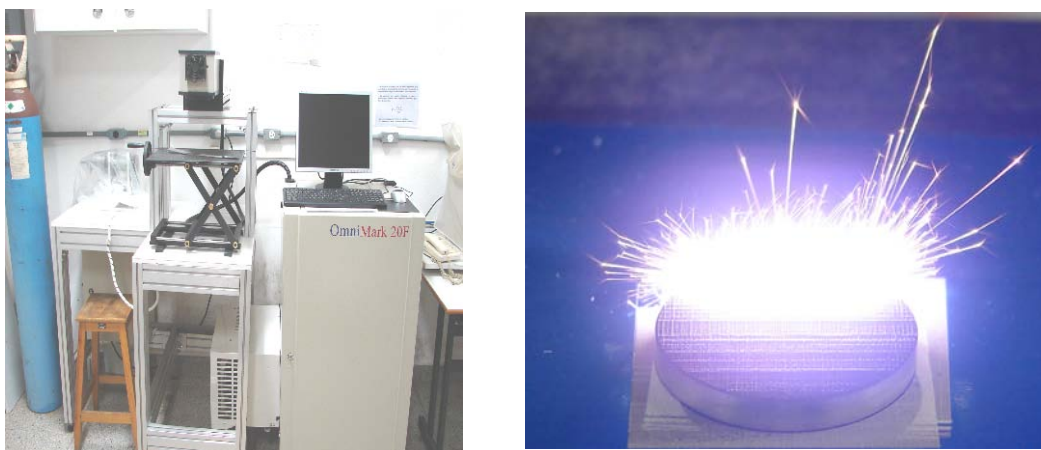


Figura 3 – Imagem do equipamento para obtenção da superfície rugosa (A): Laser, Fibra Óptica - Yb pulsado, 20W; (B) aplicação do feixe Laser.

O aspecto da superfície rugosa obtida após irradiação laser está apresentada na figura 4.



Figura 4 – Imagem dos discos de Ti cp de superfície rugosa para estudo (12x12mm)

4.2.3 Análise da molhabilidade das superfícies lisa e rugosa do Ti cp por meio de medida de ângulo de contato.

A medida de ângulo de contato foi realizada por meio de goniômetro após depósito de uma gota de água pura (MiliQ) sobre a superfície metálica (em estudo).

O método direto mais utilizado para medidas de ângulo de contato consta da medida do perfil da gota do líquido ou de uma bolha depositada sobre uma superfície sólida. Estas técnicas se referem ao método da gota séssil.

No método da gota séssil, uma gota de um líquido purificado, é depositada sobre a superfície de um sólido por meio de uma seringa. A gota é observada com uma lente de baixo aumento e o ângulo de contato é medido por meio de um goniômetro. Este tipo de medida é chamado de estático. O valor do ângulo de contato de uma gota de líquido depende de energia livre de superfície da amostra e da tensão superficial do líquido. Se a gota se esparramar por toda a superfície do material seu ângulo de contato será de aproximadamente zero, mas se o espalhamento for parcial o ângulo de contato variará de 0 a 180 graus.

O líquido selecionado determina o grau de molhabilidade e de interação com a superfície do substrato. Este líquido deve reunir as seguintes propriedades: baixa volatilidade, baixa viscosidade, ser estável e não atacar ou reagir com a superfície do substrato. Um líquido molha um substrato quando o ângulo de contato formado entre o líquido e o sólido é menor do que 65° . O ângulo menor do que 65° caracteriza uma superfície como hidrofílica e maior do que 65° hidrofóbica. (VOGLER, 1998).

O líquido mais adequado para o estudo é a água, devido à molhabilidade e não polaridade da superfície do substrato.

Quando as interfaces sólido/líquido e líquido/vapor se encontram formam um vértice e o ângulo formado entre as interfaces é referido como ângulo de contato. A tangente do ângulo entre o sólido e o líquido é conhecida como ângulo de contato.

A gota com ângulo de contato grande é hidrofóbica. Esta condição é exemplificada pela molhabilidade pobre, pouca adesividade e a energia livre de superfície do sólido é baixa.

Uma gota com pequeno ângulo de contato é hidrofílica. Esta condição reflete a melhor molhabilidade, melhor adesividade e energia de superfície alta.

O ensaio da molhabilidade das superfícies lisa e rugosa do Ti cp foi realizado em goniômetro usando um sistema óptico de captura do perfil de gota de água pura sobre um substrato sólido (liga metálica). A imagem do ângulo de contato formado entre a superfície da amostra e a tangente ao líquido foi medida pela elipse e por meio da equação Laplace – Young do *software* CAS22.

As medidas foram realizadas em três diferentes pontos de cada superfície e calculada a média aritmética.

4.2.4 Preparação das suspensões microbianas (MONTVILLE e SCHAFFNER, 2003)

As cepas liofilizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foram reidratadas de acordo com as instruções, do Laboratório de Materiais de Referência da FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

As cepas *S. epidermidis* conservadas em ágar Nutriente foram reativadas, por semeadura em caldo Mueller Hinton.

Cada uma das cepas reativadas foram transferidas para 5,0mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) para preparar-se um inóculo com turvação aproximada a 0,5 da escala de MacFarland, que corresponde a 10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL).

O inóculo preparado foi incubado a 35-37°C sob agitação constante de 150 rpm em agitador orbital (MARCONI) por 18-24 horas. A cultura foi centrifugada a 3500rpm por 10 minutos e a biomassa lavada três vezes com 5,0mL de salina tamponada com fosfato (PBS).

A biomassa foi suspensa em 3,0mL de salina tamponada com fosfato (PBS) e a turvação da suspensão foi monitorada por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (FEMTO) até atingir aproximadamente 0,5 em absorbância de 660nm, correspondendo a uma suspensão microbiana de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

4.2.5 Formação *in vitro* de biofilme sobre a superfície lisa e rugosa de Ti cp (PIZZOLITTO et al., 2000; PIZZOLITTO et al., 2001)

Após a preparação do inóculo bacteriano (*S. epidermidis* e *Streptococcus mutans*), 200µL de uma suspensão da ordem de 10^8 células/mL de cada uma das bactérias foi transferido, individualmente, para tubos cônicos de poliestireno (Falcon) de 50,0mL, esterilizados, contendo 15,0 mL de Caldo Mueller Hinton. Os discos de Ti cp de superfície lisa e rugosa, previamente autoclavados a 121° por 15 minutos, foram introduzidos separadamente nestes tubos.

Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação constante de 100rpm (revoluções por minuto) em agitador orbital (MARCONI) por 1, 6, 24, 48 e 72 horas, de acordo com a figura 5.

Após os períodos de incubação, os discos foram retirados e lavados separadamente com salina fisiológica esterilizada.

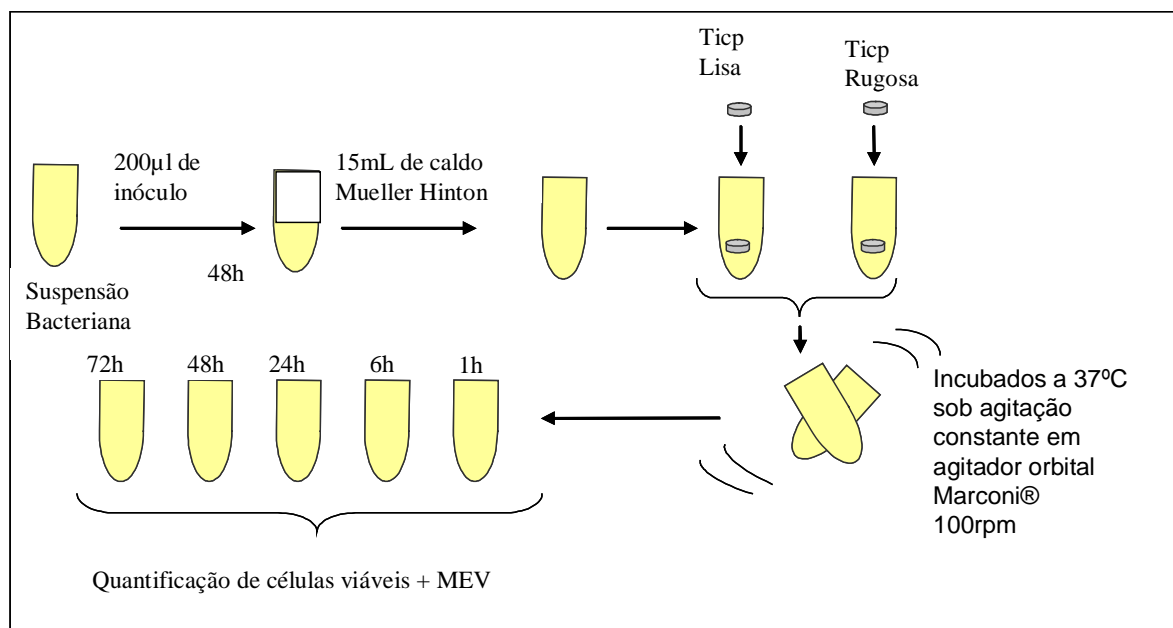


Figura 5: Esquema da formação *in vitro* de biofilme sobre a superfície lisa e rugosa de Ti cp

4.4.6 Avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme de *S. mutans* e *S. epidermidis* (MYANO et al., 2003)

Os discos de Ti cp superfície lisa e rugosa removidos do caldo de cultura inoculado com bactéria e lavados com salina fisiológica foram introduzidos, separadamente, em tubos de vidro contendo 5,0mL de salina fisiológica esterilizada e foram submetidos ao banho de ultrassom (sonicados) em banho de 40kHz por 8 minutos, para desalojar as células bacterianas aderidas sobre a superfície do corpo-de-prova. As células recuperadas em salina fisiológica foram homogeneizadas em agitador de tubos (vortex) por 10 segundos.

Após esses procedimentos foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-6}) para cada bactéria recuperada de superfície lisa e rugosa de Ti cp, para determinar o número de células viáveis na amostra, capaz de formar colônias.

4.2.7 Diluições seriadas (BLACK, 1999)

Célula viável é definida como aquela capaz de dividir-se e proliferar. A maneira usual de realizar a contagem individual é determinar o número de células, na amostra, capaz de formar colônias sobre um ágar adequado. Por esta razão, a contagem viável é freqüentemente chamada de contagem de colônias e o procedimento de contagem é que cada célula viável possa produzir uma colônia.

Um dos métodos para fazer a contagem de colônias é o método do espriamento na superfície de placa com ágar. O volume apropriado de uma cultura diluída, para ser espriado, geralmente, não é maior que 0,1mL. A placa é então incubada até que as colônias apareçam e o número de colônias é contado. É essencial que o número de colônias, não seja muito baixo, para ter valor estatístico. Na prática, o valor mais válido estatisticamente é a contagem de colônias realizada em placas com crescimento bacteriano entre 30 e 300 colônias.

Para se obter o número apropriado de número de colônias, a amostra a ser contada deve ser sempre diluída. Para fazer diluições seriadas a bactéria deve estar em meio líquido.

Enumerar oito tubos (18 x 180mm) de número 1 até 8. Encher os tubos de número 2 a 8 com 9,0mL de água. O tubo nº1 corresponde ao da amostra a ser contada, ou seja, após o procedimento do banho ultrassônico e vortex dos corpos-de-prova metálicos, 1,0mL da suspensão bacteriana foi transferido para os tubos seguintes, da seguinte forma:

A partir da amostra contida no tubo nº1, transferir 1,0mL para o tubo nº2, diluição de 1:10 ou 10^{-1} ; homogeneizar e do tubo nº2 transferir 1,0mL para o tubo nº3, diluição 1:100 ou 10^{-2} , homogeneizar e do tubo nº3 transferir 1,0mL para o tubo nº4, diluição 1:1000 ou 10^{-3} , homogeneizar e do tubo nº4 transferir 1,0mL para o tubo nº5, diluição 1:10.000 ou 10^{-4} , homogeneizar e do tubo nº5, transferir 1,0mL para o tubo nº6, diluição 1:100.000 ou 10^{-5} , homogeneizar e do tubo nº6, transferir 1,0mL para o tubo nº7, diluição 1:1.000.000 ou 10^{-6} , homogeneizar e do tubo nº7, transferir 1,0mL para o tubo nº8, diluição 1:10.000.000 ou 10^{-7} . (Figura 6)

O número de bactérias por mL da cultura original é calculado multiplicando-se o número de colônias contadas pelo fator de diluição:

Número de células por mL=número de colônias x fator de diluição

Exemplo: colônias por placa=50

Fator de diluição: 1:1 x 10⁵ (1:100.000)

Volume da diluição adicionado a placa = 0,1mL

50 x 100.000 = 5.000.000 (5 x 10⁶) células/0,1mL

5.000.000 (5 x 10⁶) x 10 = 50.000.000 (5 x 10⁷) células/mL

4.2.8 Método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície)

Após a diluição seriada da suspensão bacteriana, pipetou-se 0,1mL (100µL) em placas de Petri (90 x 15mm) contendo o meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA). O inóculo foi espalhado sobre toda a superfície da placa com alça de Drigalsky. As placas de Petri tampadas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 horas de incubação as colônias crescidas foram contadas e o resultado da diluição foi registrado e multiplicado pelo fator da diluição.

4.2.9 Análise das superfícies lisa e rugosa de Ti cp, após a aderência bacteriana inicial e formação do biofilme de *S. mutans* e *S. epidermidis*, por meio de microscópio eletrônico de varredura - MEV (PIZZOLITTO, 1997)

Os discos removidos do caldo de cultura inoculados com bactéria e lavados com salina fisiológica foram imersos em glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1M (pH 7,1), durante 15 minutos; desidratados em solução de etanol (15, 30, 50, 75, 95 e 100%) por 15 minutos, cada um; secos em estufa a 37°C e posteriormente colados em suportes metálicos próprios do equipamento; metalizados com ouro (1KV, 15mAp, 2 minutos, no aparelho Edwards S150 B) e encaixados em câmara a vácuo do microscópio e prontos para análise de varredura eletrônica por meio do microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-T330A).

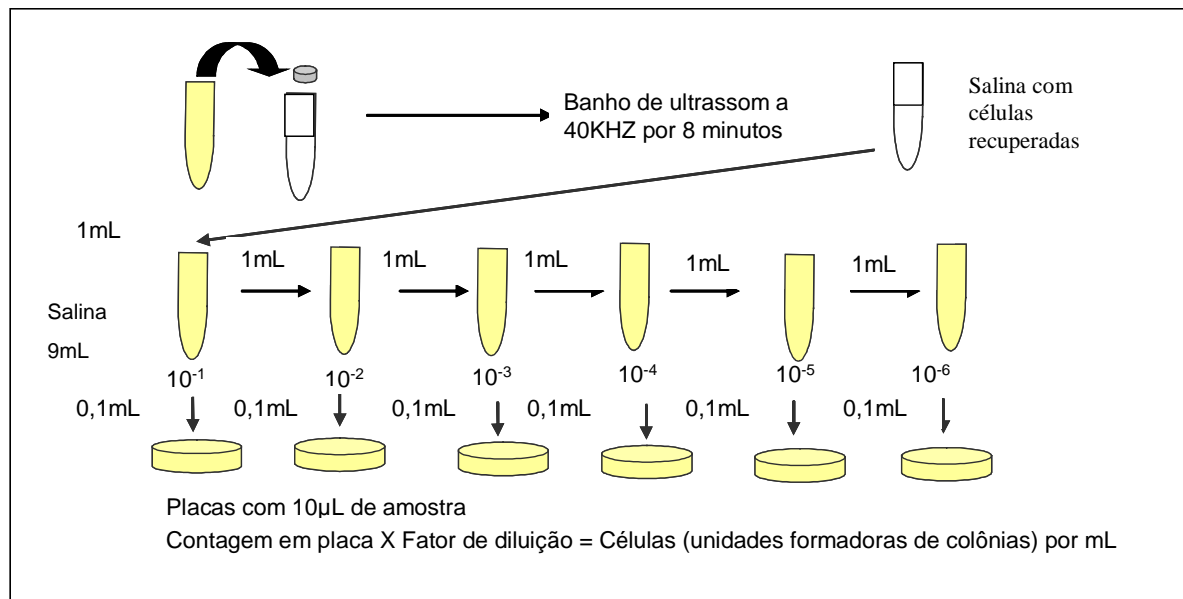


Figura 6: Esquema da diluição seriada e plaqueamento

4.2.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (sd) para $n=5$. Foi usada a técnica de um único fator de análise de variância (One way-ANOVA) para avaliar a significância estatística dos resultados entre os grupos. A análise estatística foi realizada com o software OriginPro (versão 5.0) em intervalo de confiança de 95%.

O teste-t foi para comparar os dados de dois grupos independentes.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos topográficos da superfície lisa e rugosa do Ti cp observados por MEV, antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton.

A figura 7 mostra o resultado da observação por meio do microscópio eletrônico de varredura da superfície lisa Ti cp antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton, onde observa-se a presença de fissuras e deformações na superfície.

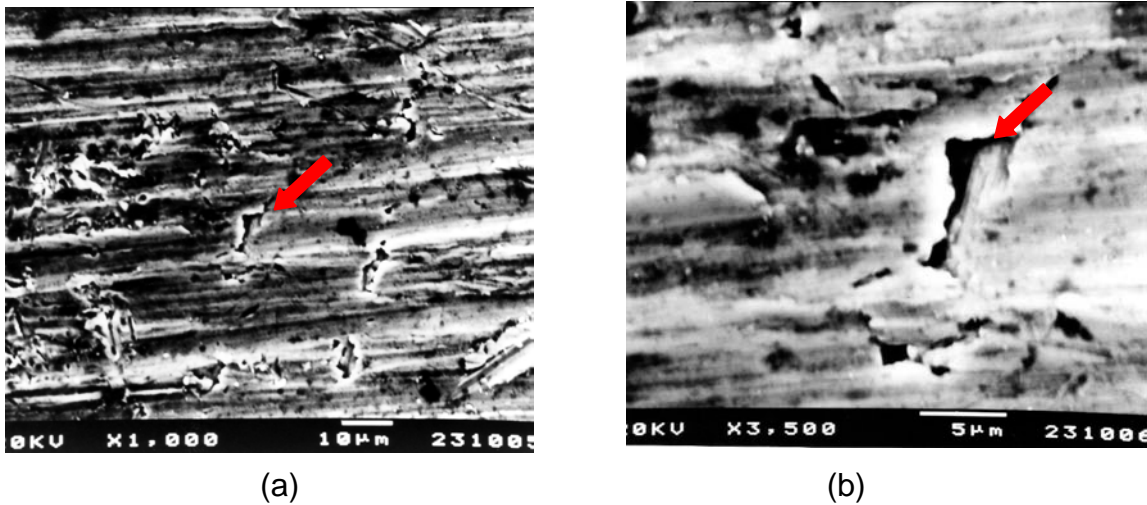
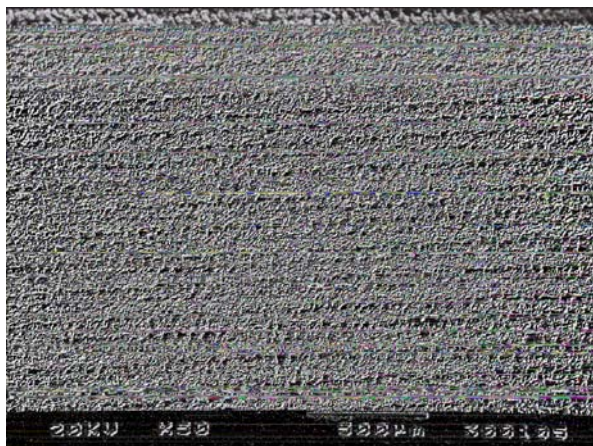
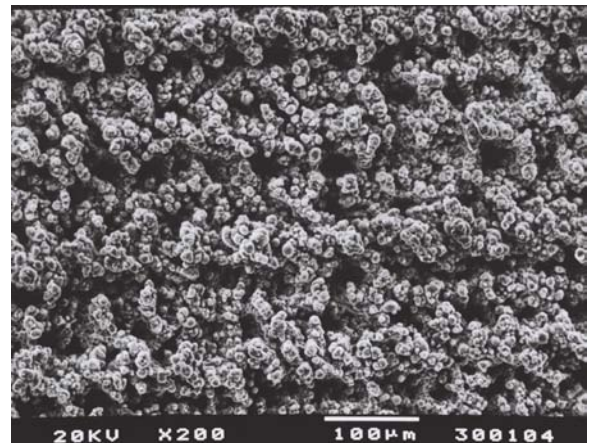


Figura 7 – Micrografia, com aumento de 1000 (esquerda - a) e 3.500X (direita - b), da superfície lisa do disco de Ti cp, antes da imersão em meio de cultura Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A-JAPAN).

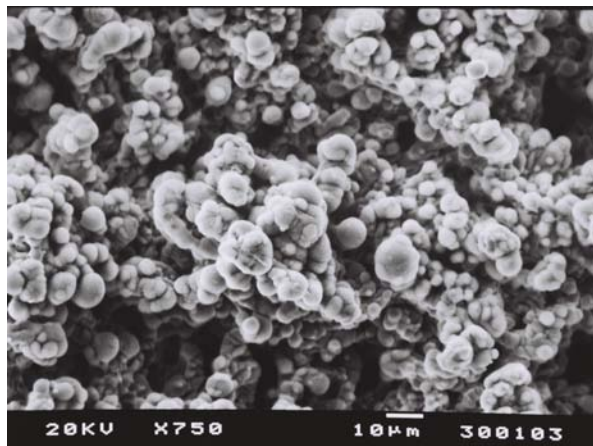
A figura 8 mostra o resultado da observação por meio do microscópio eletrônico de varredura da superfície rugosa do Ti cp obtida pela aplicação de raio laser. Observação feita antes da imersão em fase líquida, evidenciando a topografia da superfície com uma grande quantidade de canalículos criados pela aplicação do feixe de laser e deformidades.



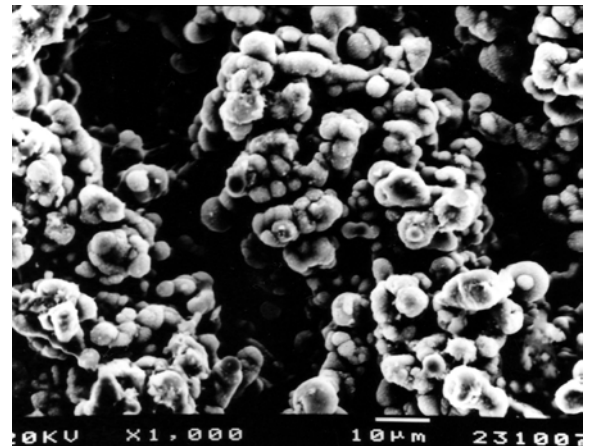
(a)



(b)



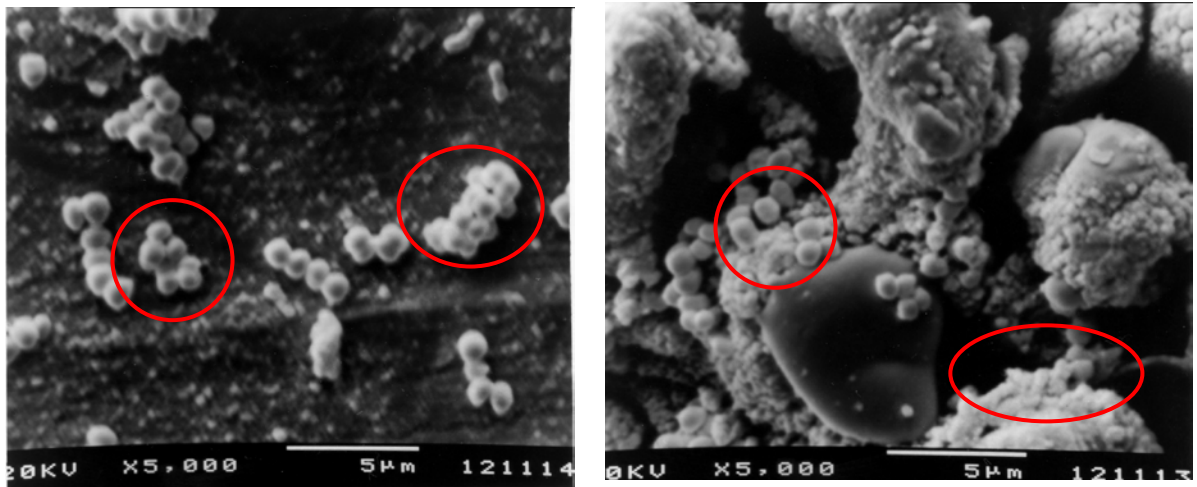
(c)



(d)

Figura 8: Micrografias, com aumentos de 50X (a), 200X (b), 750X (c) e 1000X (d), da superfície rugosa do disco de Ti cp obtida por irradiação de raio laser, antes da imersão em meio de cultura caldo Mueller Hinton (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A-JAPAN)

A figura 9 evidencia a aderência do *S. mutans* após 48 horas de incubação do disco em caldo Mueller Hinton sem passar pelo banho ultrassônico.



(a)

(b)

Figura 9 – Micrografia de superfície do Ti cp após 48h de incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. mutans* (sem passar pelo banho ultrassônico) em (a) superfície lisa e em (b) superfície rugosa - obtida por irradiação a laser. Observar em ambas superfícies cocos aderidos e formação de biofilme de *S. mutans* evidenciados em círculos vermelhos

5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da aderência inicial e formação do biofilme de *Streptococcus mutans* sobre superfície lisa do Ti cp e superfície rugosa do Ti cp (modificada por irradiação a laser) após banho ultrassônico.

5.2.1 Resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme de *S. mutans* em superfície lisa do Ti cp.

Os resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. mutans* sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados nas figura 10.

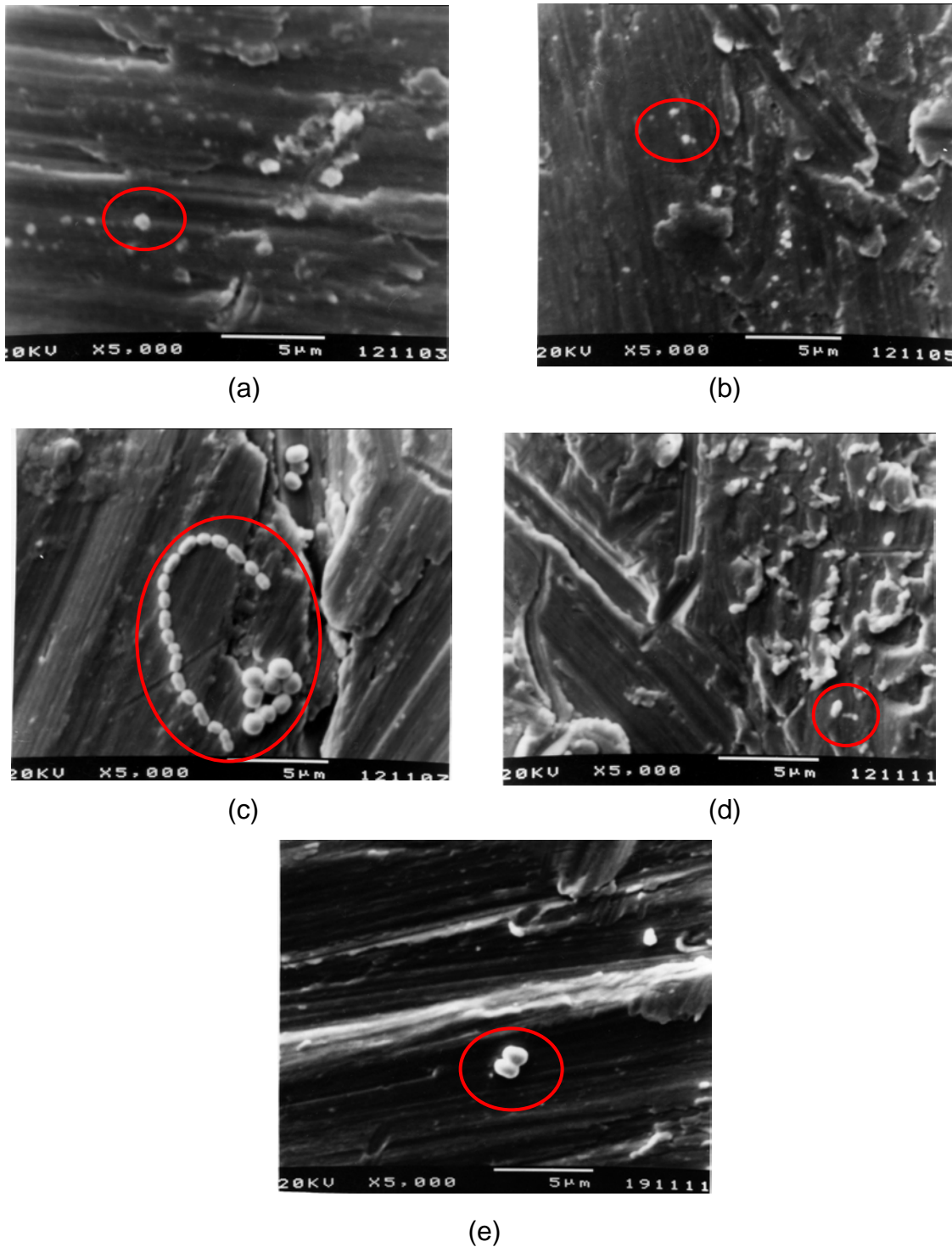


Figura 10: Micrografia de superfície lisa do Ti cp após incubação em Mueller Hinton inoculado com suspensão de *S. mutans* nos intervalos de tempo de 1 hora (a), 6 horas (b), 24 horas (c), 48 horas (d), 72 horas (e) e submetidos ao banho ultrassônico. Notar a presença de cocos aderidos (células remanescentes) evidenciadas dentro de círculos vermelhos.

5.2.2 Resultados do MEV de aderência inicial e formação de biofilme em superfície rugosa do Ti cp, obtida por irradiação a laser.

Os resultados de aderência inicial e formação de biofilme de *S. mutans* sobre superfície rugosa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas, após o banho ultrassônico estão apresentados na figura 11.

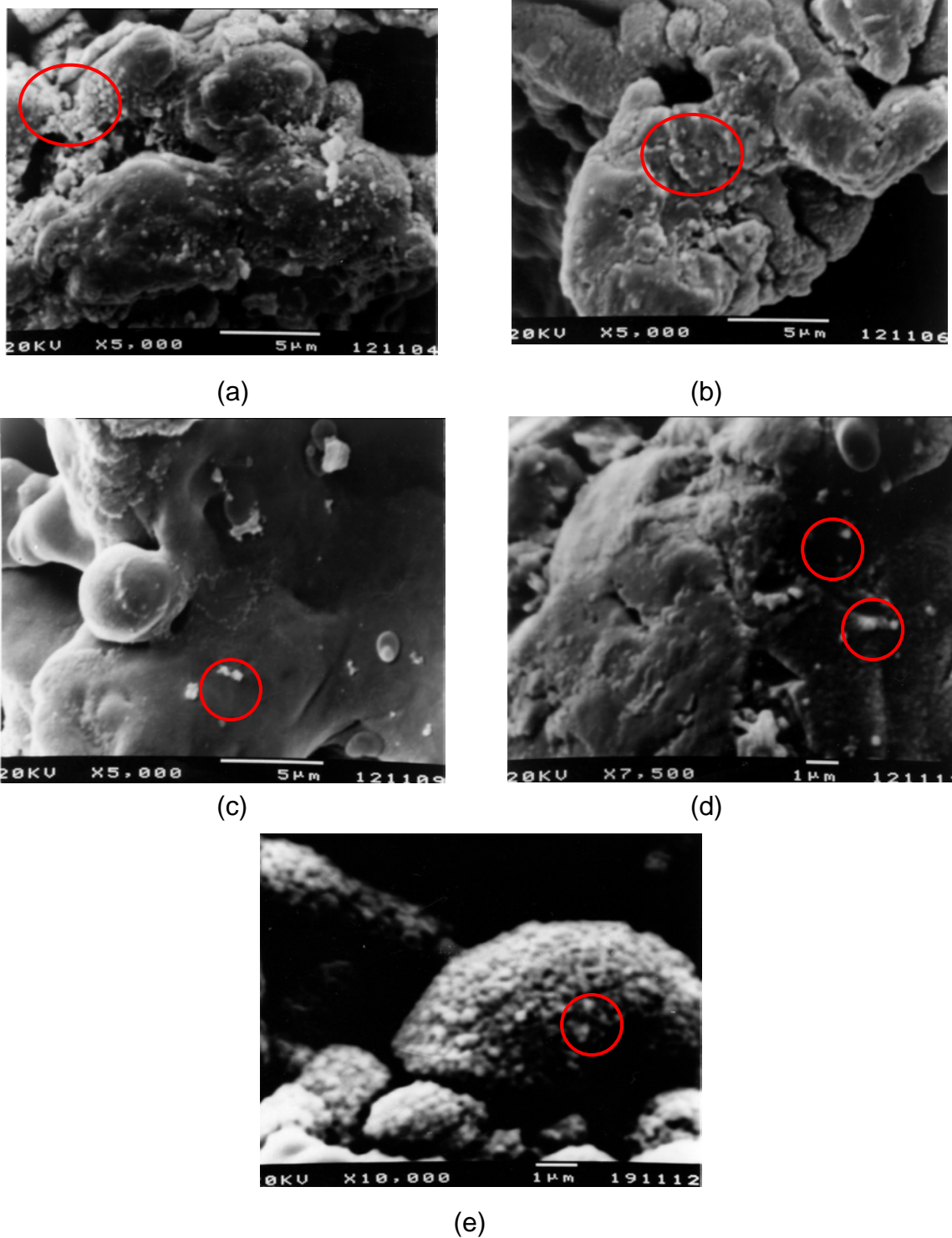


Figura 11: Micrografia de superfície rugosa do Ti cp após incubação do disco em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. mutans* (10^8 UFC/mL) por 1 hora (a), 6 horas (b), 24 horas (c), 48 horas (d), 72 horas (e) e submetidos ao banho ultrassônico. Observar células remanescentes na superfície rugosa do Ti cp, dentro dos círculos vermelhos.

A figura 12 evidencia a aderência do *S.epidermidis* após 48 horas de incubação do disco em caldo Mueller Hinton sem passar pelo banho ultrassônico.

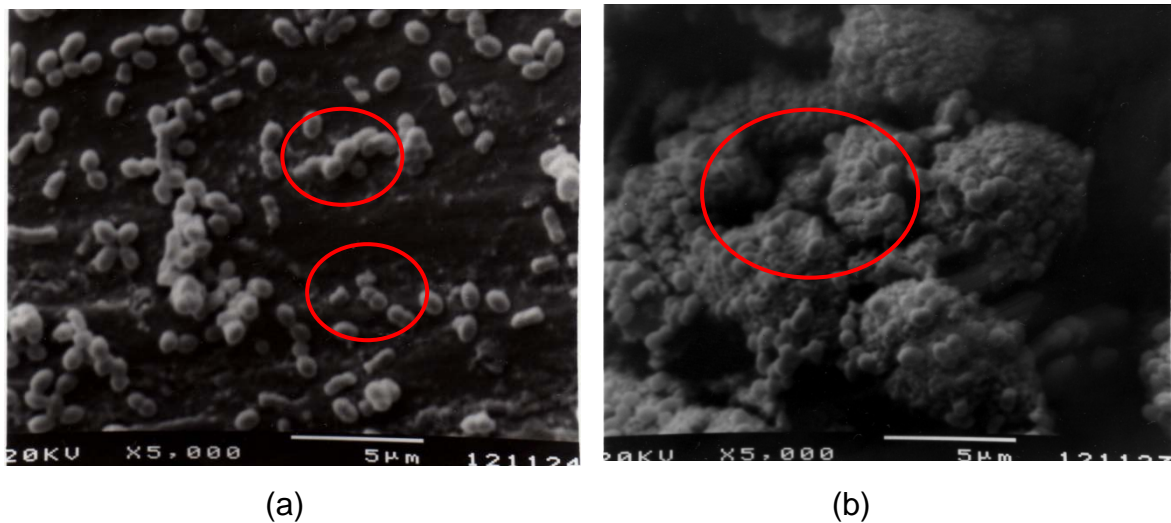


Figura 12 - Micrografia de superfície do Ti cp após 48h de incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* (sem passar pelo banho ultrassônico) em (a) superfície lisa e em (b) superfície rugosa - obtida após irradiação a laser. Observar em ambas superfícies cocos aderidos e formação de biofilme de *S. epidermidis*, circundados em vermelho.

5.3 Da aderência inicial e formação do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa do Ti cp e superfície rugosa do Ti cp (modificada por irradiação a laser).

5.3.1 Os resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados nas figura 13.

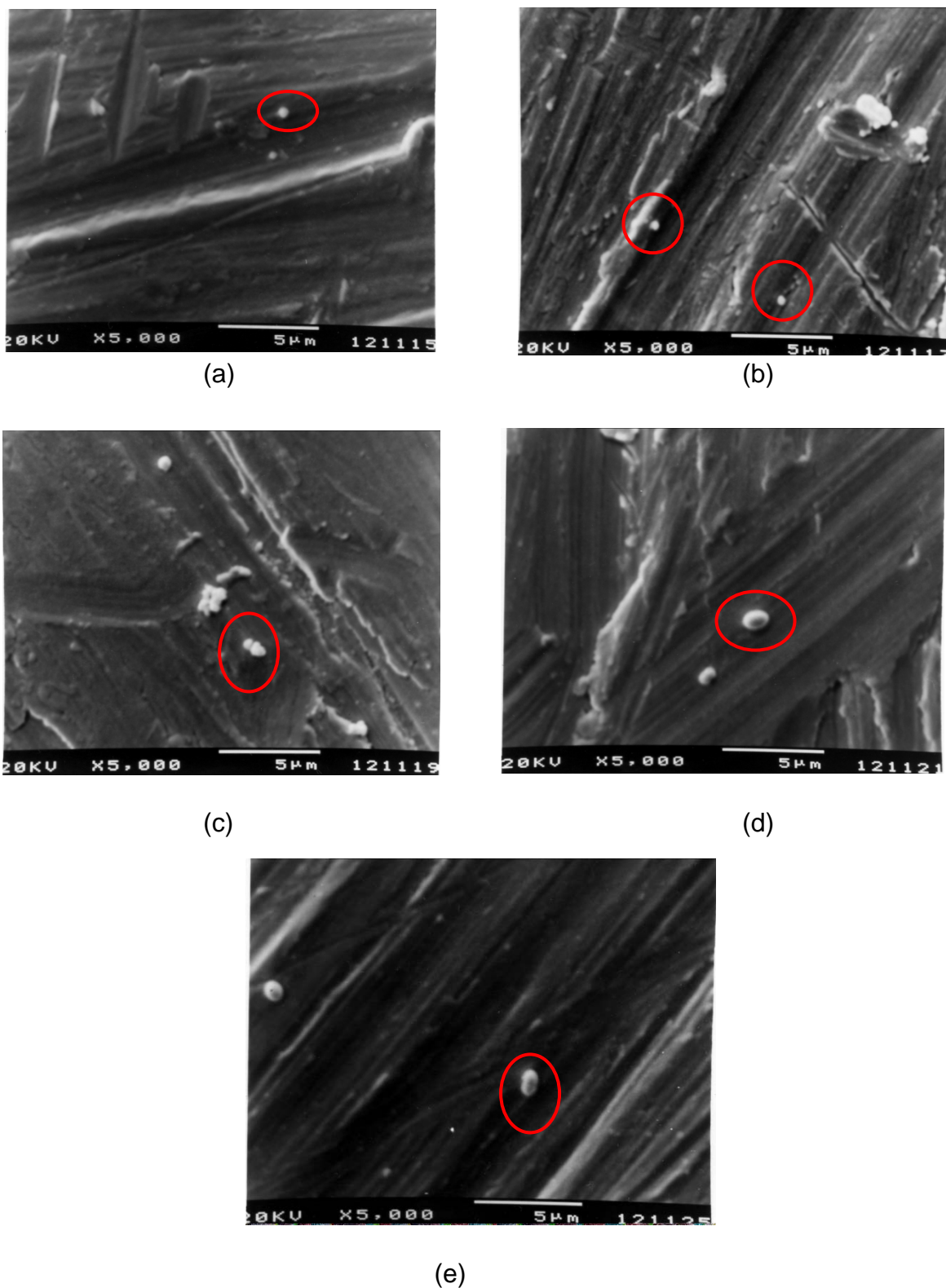
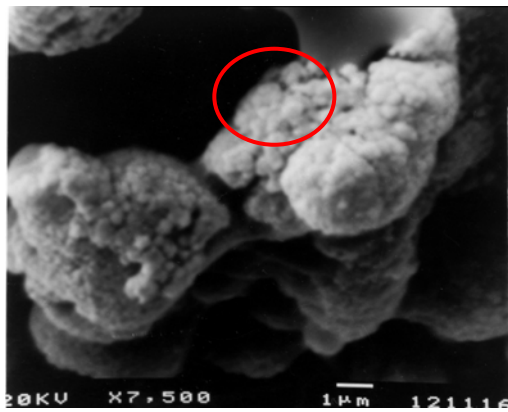
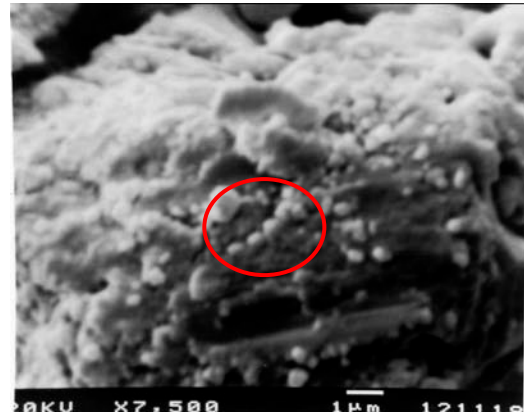


Figura 13: Micrografia de superfície lisa do Ti cp após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* (10^8 UFC/mL) por 1 hora (a), 6 horas (b), 24 horas (c), 48 horas (d), 72 horas (e) e submetidos ao banho ultrassônico. Observar células que permaneceram aderidas à superfície, circundados em vermelho.

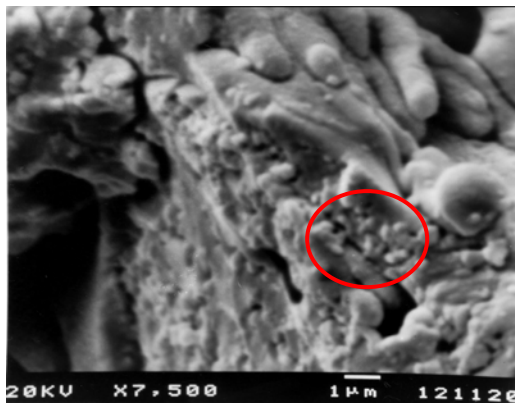
5.3.2 Os resultados de aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície rugosa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados nas figura 14.



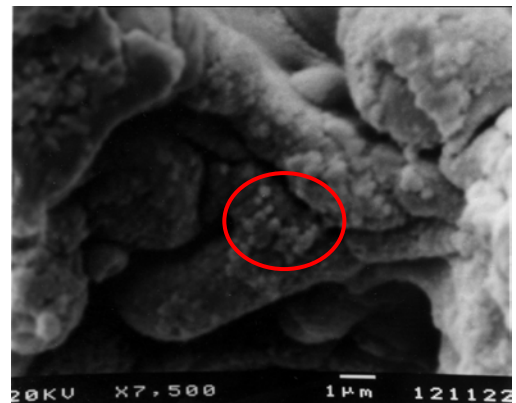
(a)



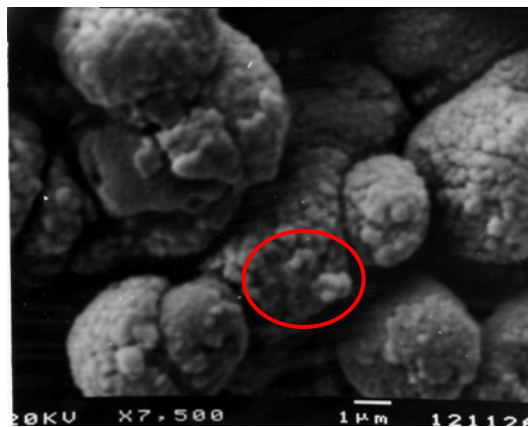
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 14 - Micrografia de superfície rugosa de Ti cp após incubação em caldo Mueller Hinton inoculado com *S. epidermidis* (10^8 UFC/mL) por 1 hora (a), 6 horas (b), 24 horas (c), 48 horas (d), 72 horas (e) e submetidos ao banho ultrassônico. Observar células remanescentes, dentro dos círculos vermelhos.

5.3.3 Os resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. mutans* sobre superfície lisa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição da aderência do *S. mutans* em diferentes intervalos de tempo

Período de incubação em horas	Superfícies de Titânio comercialmente puro	
	lisa	rugosa
1	positivo	positivo
6	positivo	positivo
24	positivo	positivo
48	positivo	positivo
72	positivo	positivo

Legenda: positivo = houve aderência.

5.3.4 Da quantificação de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas das superfícies lisa e rugosa de Ti cp.

A quantificação das células viáveis recuperadas das superfícies de Ti cp estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. mutans* recuperadas dos discos de Ti cp após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação em horas	Superfícies	
	lisa (células viáveis –UFC/mL)	rugosa (células viáveis –UFC/mL)
1	$7,00 \times 10^3$	$1,40 \times 10^4$
6	$4,90 \times 10^5$	$5,30 \times 10^5$
24	$1,02 \times 10^6$	$2,80 \times 10^6$
48	$2,80 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$
72	$4,00 \times 10^6$	$6,80 \times 10^5$

5.3.5 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa e rugosa de Ti cp incubado com *S. mutans*.

5.3.5.1 Teste t – Student – superfície lisa

Aplicado sobre uma coluna (dados de contagem de células viáveis sobre superfície lisa –tabela 4) obteve-se média e desvio padrão igual a $1,66 \pm 1,67 \times 10^6$. A nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

5.3.5.2 Teste t – Student – superfície rugosa

Aplicado sobre uma coluna (dados de contagem de células viáveis sobre superfície rugosa –tabela 4) obteve-se média e desvio padrão igual a $1,06 \pm 1,07 \times 10^6$. A nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

5.3.5.3 One Way – ANOVA

Aplicado sobre as duas colunas (superfície lisa e rugosa), a nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

5.3.6 Os resultados da distribuição da aderência inicial e conseqüente formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre superfície rugosa de Ti cp, em intervalos de tempo de 1, 6, 24, 48 e 72 horas estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição da aderência do *S. epidermidis* em diferentes intervalos de tempo

Período de incubação em horas	Superfícies de Titânio comercialmente puro	
	lisa	rugosa
1	positivo	positivo
6	positivo	positivo
24	positivo	positivo
48	positivo	positivo
72	positivo	positivo

Legenda: positivo: houve aderência

5.3.7 Da quantificação de células viáveis de *Staphylococcus epidermidis*

A quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas das superfícies de Ti cp estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Distribuição da quantificação das células viáveis de *S. epidermidis* recuperadas dos discos de Ti cp após banho ultrassônico (valores expressos em UFC/mL)

Período de incubação em horas	Superfícies	
	lisa (células viáveis –UFC/mL)	rugosa (células viáveis –UFC/mL)
1	$2,80 \times 10^3$	$2,00 \times 10^4$
6	$2,48 \times 10^6$	$9,20 \times 10^6$
24	$1,42 \times 10^7$	$6,50 \times 10^6$
48	$5,90 \times 10^6$	$6,80 \times 10^6$
72	$1,08 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$

5.3.8 Da análise estatística da contagem de células viáveis recuperadas de superfície lisa e rugosa de Ti cp incubado com *S. epidermidis*.

5.3.8.1 Teste t – Student – superfície lisa

Aplicado sobre uma coluna (dados de contagem de células viáveis sobre superfície lisa –tabela 6) obteve-se média e desvio padrão igual a $6,68 \pm 5,83 \times 10^6$. A nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

5.3.8.2 Teste t – Student – superfície rugosa

Aplicado sobre uma coluna (dados de contagem de células viáveis sobre superfície rugosa –tabela 6) obteve-se média e desvio padrão igual a $7,16 \pm 2,34 \times 10^6$. A nível 0,05 as médias são significativamente diferentes.

5.3.8.3 One Way – ANOVA

Aplicado sobre as duas colunas (superfície lisa e rugosa), a nível 0,05 as médias não são significativamente diferentes.

5.3.9 Da molhabilidade das superfícies de Ti cp: lisa e rugosa

A molhabilidade de uma superfície de um biomaterial é um dos inúmeros parâmetros que interferem na osseointegração de um implante. Ela permite um maior ou menor espalhamento de líquido sobre as superfícies metálicas. Como o sangue tem na sua composição 90% de água, esta capacidade de absorção de água pela superfície conhecida como molhabilidade é fundamental para o sucesso na adesão celular e conseqüentemente osseointegração. A molhabilidade pode ser avaliada por meio da medição do ângulo de contato.

No presente estudo, ao realizar o ensaio da molhabilidade em superfície lisa de Ti cp notou-se que o ângulo de contato formado pela gota de água sobre a

superfície lisa do Ti cp era menor do que 65°, em média 75°. Notou-se que esta superfície não permite a molhabilidade.

O ângulo de contato na interface líquido/água, na superfície rugosa, foi menor do que 65°, em média menor do que 7°. Notou-se que a gota de água esparramou-se sobre a superfície toda, então por isso a superfície pode ser chamada de hidrofílica. A molhabilidade da superfície foi total. Os resultados de molhabilidade das superfícies estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Distribuição da molhabilidade das superfícies de Ti cp

Característica da superfície do Ti cp	Molhabilidade das amostras do Ti cp
Lisa	Hidrofóbica
Rugosa	Hidrofílica

Os resultados da medida do ângulo de contato estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Distribuição das medidas de ângulo de contato das superfícies de Ti cp

Característica da superfície do Ti cp	Medida do ângulo de contato das amostras do Ti cp
Lisa	75,26 ± 0,70
Rugosa	<7

Legenda_ < (menor)

Os dados mostraram que a superfície lisa é hidrofóbica enquanto a superfície rugosa, modificada por irradiação a laser é hidrofílica.

Os dados de molhabilidade das superfícies de Ti cp e os de adesão bacteriana sobre os discos de Ti cp mostraram que ambas as superfícies permitiram a aderência de *S. mutans* e *S. epidermidis*. O presente estudo avaliou o efeito da modificação da superfície do titânio comercialmente puro em termos de molhabilidade e a habilidade de *S. mutans*, bactéria da cavidade oral e, *S. epidermidis* patógeno de infecção relacionada a implantes, de colonizar a superfície modificada, usando como controle a superfície lisa do Ti cp com rugosidade de superfície menor do 1µm e ângulo de contato em torno de 75° mostrando que a superfície é hidrofóbica.

A superfície lisa de Ti cp modificada por irradiação de laser forneceu uma superfície rugosa e ângulo de contato $<7^\circ$ mostrando que a superfície é hidrofílica. As duas superfícies foram colonizadas por *S. mutans* e *S. epidermidis*, mas não em níveis significativamente diferentes. A contagem de células viáveis de *S. epidermidis* nos diferentes intervalos de tempo foi significativamente diferente a nível 0,05.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a aderência de *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus epidermidis* sobre a superfície lisa e superfície rugosa de titânio comercialmente puro, por meio de microscopia eletrônica de varredura, estimado quantitativamente as células bacterianas viáveis recuperadas dos discos (12,0mm x 2,0mm) de titânio comercialmente puro de superfície lisa e superfície rugosa e analisado a molhabilidade de ambas as superfícies, através da medida do ângulo de contato.

Os discos de titânio comercialmente puro foram colocados em meio de cultura Mueller Hinton contendo, separadamente, suspensão *S. mutans* e *S. epidermidis* por períodos de tempos (1, 6, 24, 48 e 72 horas), após cada período de tempo foi analisado a aderência bacteriana (*S. mutans* e *S. epidermidis*) em ambas as superfícies (lisa e rugosa), observando-se a presença de células aderidas por meio de microscópio eletrônico de varredura. Lee et al. (1999) observaram que a colonização microbiana sobre implantes de titânio sem evidência de inflamação ocorre da mesma forma como ocorre sobre dentes naturais.

No presente estudo, tanto a superfície lisa como a superfície rugosa dos discos de titânio comercialmente puro, mesmo após o banho ultrassônico, para a remoção de células viáveis, observou-se a presença de células de *S. epidermidis* aderidas sobre os discos de Ticp, por microscópio eletrônico de varredura (MEV), como mostrado nas figuras (15 a 16). König et al (1998) observaram em superfícies de titânio um significativo aumento na adesão de *S. epidermidis* nos tempos de 1, 6 e 24 horas a uma temperatura de incubação de 37° C.

Em outro estudo, Adachi et al. (2007) observaram um aumento na aderência e formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, a cada período de tempo analisado (24, 48 e 72 horas), em superfície lisa de titânio, utilizando microscópio óptico digital, para calcular a taxa de cobertura bacteriana.

Na quantificação de células viáveis, os discos de titânio (superfície lisa e rugosa) passaram pelo banho ultrassônico em solução salina por oito minutos a 40kHz, diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-6}) posteriormente semeadas em placas para contagem de colônias, obtendo resultados em UFC/mL. O *S. mutans* em superfície lisa apresentou em 1 h: 7×10^3 UFC/mL, 6h: $4,9 \times 10^5$ UFC/mL, 24h: $1,02 \times 10^6$ UFC/mL, 48h: $2,8 \times 10^6$ UFC/mL e 72 h: 4×10^6 UFC/mL enquanto em superfície rugosa 1 h: $1,4 \times 10^4$ UFC/mL, 6h: $5,3 \times 10^5$ UFC/mL, 24h: $2,8 \times 10^6$ UFC/mL, 48h: $1,28 \times 10^6$ UFC/mL e 72 h: $6,8 \times 10^5$ UFC/mL.

A quantificação de células viáveis de *S. epidermidis* em superfície lisa apresentou 1 h: $2,8 \times 10^3$ UFC/mL, 6h: $2,48 \times 10^6$ UFC/mL, 24h: $1,42 \times 10^7$ UFC/mL, 48h: $5,9 \times 10^6$ UFC/mL e 72 h: $1,08 \times 10^7$ UFC/mL, enquanto em superfície rugosa 1 h: 2×10^4 UFC/mL, 6h: $9,2 \times 10^6$ UFC/mL, 24h: $16,5 \times 10^6$ UFC/mL, 48h: $6,8 \times 10^6$ UFC/mL e 72 h: $6,8 \times 10^6$ UFC/mL. Os dados obtidos no presente estudo mostram que não houve diferença significativa ($p < 0,005$) na quantificação de células viáveis de *S. epidermidis* e *S. mutans* em relação às superfícies lisa e rugosa de Ti cp. Harris et al (2007) demonstraram que a quantificação de *Staphylococcus aureus* em relação as superfícies lisa e rugosa de titânio comercialmente puro não apresentaram diferenças significativas.

No presente estudo as tabelas 4 e 6, mostram que em relação a quantificação de células viáveis de *S. mutans* e *S. epidermidis* em superfície lisa e superfície rugosa, evidenciou-se que não houve diferença significativa de aderência do *S. mutans* tanto da superfície lisa como da superfície rugosa em relação ao tempo. Em relação ao *S. epidermidis* e superfície lisa, também não houve diferença significativa em relação aos tempos, porém, em relação à superfície rugosa a diferença foi significativa em relação ao tempos ($p < 0,005$). Aplicando One-Way Anova na comparação da adesão bacteriana sobre ambas as superfícies, estatisticamente, não apresentaram diferença significativa. Pier-Francesco et al. (2006), observaram uma redução significativa da aderência de *P. gingivalis* em uma superfície de titânio muito lisa, medida de rugosidade ($34,57 \pm 5,79$ nm), porém, não observada em uma superfície lisa de rugosidade ($155 \pm 33,36$ nm), superfície rugosa ($223,24 \pm 9,86$ nm) ou muito rugosa ($449,42 \pm 32,97$ nm).

Wu-Yuan et al. (1995) avaliaram a aderência de várias bactérias (*Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*) sobre as superfícies de titânio lisa e rugosa, utilizando quantificação de células viáveis e microscópio eletrônico de varredura observaram que a superfície lisa teve uma menor aderência em relação a superfície rugosa.

No presente estudo, a medida do ângulo de contato da superfície dos discos de Ti cp, mostrou que as superfícies são hidrofílicas e hidrofóbicas. Quando a superfície apresenta um ângulo inferior a 65° , a superfície é hidrofílica, e quando o ângulo é superior a 65° a superfície é hidrofóbica. Neste presente estudo a superfície rugosa com irradiação a laser apresentou um ângulo $< 7^\circ$, hidrofílica,

enquanto a superfície lisa apresentou um ângulo de aproximadamente 75°, hidrofóbica, como mostrado nas tabelas 7 e 8. O fato da superfície rugosa ser hidrofílica, com alta molhabilidade, poderia explicar o aumento na aderência bacteriana tanto de *S. mutans* e *S. epidermidis* sobre estas superfícies.

A superfície rugosa (hidrofílica) apresentou uma maior aderência bacteriana tanto de *S. mutans* como *S. epidermidis* em relação a superfície lisa (hidrofóbica), porém, ambas as superfícies não apresentaram diferença significativa de aderência, estes dados são compatíveis com Yoshinary et al. (2000), que também não evidenciaram diferença significativa na aderência de *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em superfícies de titânio de superfícies lisa e superfícies de titânio rugosa, porém concluiu em seu estudo que a adesão de *Porphyromonas gingivalis* diminuiu em superfícies hidrofóbicas.

No entanto, Bos et al. (1999), contestam a influência da rugosidade de superfície para a adesão microbiana. Em uma revisão de literatura relacionada às interações físico-químicas sobre a adesão microbiana inicial, apresentaram uma consideração relacionada à rugosidade de superfície, descrevendo que este fator é importante e influencia a formação do biofilme a uma superfície. Porém, em relação à adesão inicial dos microrganismos, a rugosidade de superfície parece ter uma importância secundária. O autor ainda relata que a influência da adesão do biofilme à superfície irregular ou rugosa está mais relacionada às dificuldades para se manter limpa essa superfície.

No presente estudo, as superfícies rugosas (hidrofílicas) apresentaram um maior acúmulo de biofilme que as superfícies lisas (hidrofóbicas) (Tabelas 4 a 5), dados compatíveis com Zitzmann et al. (2002) e Quirynen et al. (1990) relataram que as superfícies hidrofóbicas apresentarem uma quantidade 10 vezes menor de biofilme do que as superfícies hidrofílicas

Segundo Píer-Francesco et al., 2006 relataram que a adesão de *P. gingivalis* a superfície do titânio foi inibido em níveis de rugosidade superficial inferiores aos geralmente encontrados para implante (Ra: 350nm).

Em outro estudo Chang e Marrit (1994) também observaram a aderência bacteriana de *S. epidermidis* em superfícies de titânio comercialmente puro, utilizado em implantes odontológicos, observando uma menor aderência bacteriana quando comparado com outros biomateriais como aço inoxidável e polimetilmetacriato.

Embora os materiais artificiais utilizados para a fabricação de implantes, são caracterizados para se unirem aos tecidos de seus receptores, o controle do biofilme dental é de grande importância (NAKAZATO et al., 1989), uma vez que a exposição do implante à cavidade bucal representa uma superfície que pode interagir com a microbiota local e conduzir à formação do biofilme dental (GROBNER-SCHREIBER et al., 2001).

A presença de microrganismos de um biofilme, sobre uma superfície metálica, muitas vezes induz a grandes mudanças na concentração dos constituintes eletrolíticos, pH e níveis de oxigênio. (ISMAIL et al., 1999). O resultado da deterioração de metais pela ação microbiana é conhecido como biocorrosão, ou corrosão influenciada microbiologicamente (CIM), não é um fenômeno novo e, na maioria dos casos confirmados, a biocorrosão acontece sob os biofilmes. Ocorre geralmente em áreas localizadas, nas áreas anódicas e os elétrons liberados, são recebidos, em outras áreas [reações catódicas] (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990; PIZZOLITTO, 1997; BEECH, GAYLARDE, 1999; PIZZOLITO et al., 2000).

A biocorrosão pode estar relacionada com a produção do polissacarídeo extracelular pelos microrganismos do biofilme. Os casos mais significantes de biocorrosão estão associados com a atividade bacteriana, como por exemplo, das bactérias redutoras de sulfato (WENER et al., 1998), dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (PIZZOLITTO, 1997), os quais produzem metabólitos corrosivos.

A rugosidade da superfície é outro fator a ser considerado. A presença de imperfeições da superfície promove a colonização microbiana, abriga as bactérias contra a força do fluxo salivar, mastigação, procedimentos de higiene e permite a elas estabelecer ligações menos reversíveis (RIMONDINI et al., 1997).

As superfícies dos implantes bucais podem variar muito. Os de textura rugosa parecem aumentar a adesão e crescimento celular, contudo, a influência da topografia na adesão microbiana, para a superfície do titânio, ainda não é completamente descrita. A aderência microbiana aos diferentes materiais de implantes indica que a rugosidade da superfície é mais importante que a própria energia livre da superfície. Por exemplo, os *Streptococcus sanguis* aderem e colonizam melhor as superfícies ásperas e hidrofóbicas do titânio (WU-YUAN, et al., 1995).

Uma superfície do titânio com rugosidade adequada é a meta para a osseointegração de implantes dentais devendo ser evitado o envolvimento de bactérias, desde que, foi mostrado que a colonização microbiana é um dos fatores do fracasso em implantes (RIMONDINI et al., 1997).

A osseointegração foi definida por Albrektsson (1981) como “uma interface onde há contato direto entre tecido ósseo e metal sem interposição de tecido mole em microscopia óptica”, possibilitando resultados clínicos previsíveis. Biomecanicamente, a osseointegração pode ser considerada como uma interface onde a união é tão forte quanto o tecido ósseo que está próximo ao implante e, que a tentativa de remoção levaria à fratura do osso ou do implante. No entanto, Steinemann et al. (1986) definiram como uma resistência às forças de tração, que pode ser explicada pelas uniões químicas entre o tecido ósseo e o material (ALMEIDA et al., 1998).

O pré-requisito para a osseointegração são, o “adequado crescimento ósseo quantitativa e qualitativamente”, bem como o não comprometimento da saúde após o procedimento de implante. O fracasso do implante pode ser devido às infecções microbianas, trauma cirúrgico, sobrecarga prematura do implante, formato incorreto da prótese e procedimento cirúrgico impróprio (GRISTINA, 1987; PIATTELLI et al., 1996; GROBNER-SCHEREIBER et al., 2001).

O aumento na formação do osso ao redor dos implantes pode ser a considerável contribuição para uma fixação estável por prazo prolongado (TERAOKA et al., 2000).

Todo material de implante destinado a osseointegração apresenta alguma forma de rugosidade. A rugosidade pode direcionar o crescimento ósseo ao redor do implante dental cilíndrico ou aleatoriamente sem nenhum arranjo particular da rugosidade na superfície do mesmo implante. A superfície dos implantes metálicos pode ser modificada para aumentar a área de osseointegração destes implantes (GROSS e BABOVIE, 2002).

Tratamentos variados de superfícies foram desenvolvidos e realizados na superfície dos implantes de titânio no intuito de se verificar o tipo de tratamento promove melhor resposta tecidual na formação óssea adjacente, como por exemplo os revestimentos de superfície a base de dióxido de titânio e hidroxiapatita (MEFFERT e FRITZ, 1992; ALMEIDA et al., 1998; TERAOKA et al., 2000; IVANOFF et al., 2001; MUSTAFA et al., 2001; LI et al., 2002).

Estudos indicam que um implante com uma superfície rugosa é o melhor candidato à osseointegração do implante do que um de superfície lisa (LEE et al., 2002). Nos últimos trinta anos, inúmeros implantes com diferentes superfícies foram usados, com o objetivo de aumentar qualitativa e quantitativamente o contato com o osso (DARIMONT, et al., 2002).

7 CONCLUSÃO

A colonização bacteriana ocorreu após uma hora de incubação dos discos de Ti cp de superfície lisa e rugosa em meio de cultura líquido Mueller Hinton.

A aderência inicial e a formação de biofilme foi demonstrada por microscópio eletrônico de varredura sobre superfície lisa e rugosa de Ti cp nas condições do estudo.

Em média as células viáveis do biofilme de *Streptococcus mutans* sobre superfície lisa foram de $1,66 \pm 1,67 \times 10^6$ e sobre superfície rugosa $1,06 \pm 1,07 \times 10^6$, para $p < 0,05$ as médias não são significativamente diferentes.

Em média as células viáveis do biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sobre superfície lisa foram de $6,68 \pm 5,83 \times 10^6$, para $p < 0,05$ as médias não são significativamente diferentes.

Em média as células viáveis do biofilme de *S. epidermidis*, recuperadas de vários intervalos de tempo 1, 6, 24, 48 e 72h da superfície rugosa, foram $7,16 \pm 2,34 \times 10^6$ a nível 0,05, são significativamente diferentes.

A molhabilidade das superfícies lisa e rugosa avaliadas por medida de ângulo de contato mostraram que a superfície lisa é hidrofóbica e a superfície rugosa hidrofílica. A superfície lisa do Ti cp apresentou um ângulo de aproximadamente 75° , enquanto a superfície rugosa apresentou um ângulo $< 7^\circ$, porque permitiu o esparramamento total da gota de água pelos canalículos criados pela aplicação do feixe de laser.

A irradiação a laser de alta intensidade Nd:YAG para modificar a superfície do titânio comercialmente puro usado especialmente em implantes dentais para melhorar a osseointegração, não reduz a aderência bacteriana e a presença de bactérias na superfície do implante pode levar a reações inflamatórias e este evento pode ser um fator de risco para falha do implante, devido à infecção.

REFERÊNCIAS
(De acordo com a ABNT.NBR 6023)

ADACHI, K.; TSURUMOTO, T.; YONEKURA, A; NISHIMURA, S.; KAJIYAMA, S.; HIRAKATA, Y.; SHINDO, H. New quantitative image analysis of Staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. **J Orthop Sci.**, v. 12, p. 178-184, 2007.

ADELL, R.; LEKHOM, U.; ROCKLER, B.; BRANEMARK, P.I. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Int. J. Oral Surg.**, v. 10, p. 387-416, 1981.

AN, Y.H.; BRADLEY, J.; POWERS, D.L.; FRIEDMAN, R.J. The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v. 79, p. 816-819, 1997.

AHN, S.J.; AHN, S.J.; WEN, Z.T.; BRADY, L.J.; BRUNE, R.A. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. **Infect Immun.**, v. 76, nº 9, p. 4259-4268, 2008.

ALBREKTSSON, T. Osseointegrated titanium implants. **Acta Orthop. Scand.**, v. 52, p. 155, 1981.

ALBREKTSSON, T. O.; JOHANSSON, C. B.; SENNERBY, L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. **Periodontology**, v. 4, p. 58-73, 1994.

ALMEIDA, M. M.; GREGHI, S. L. A.; PASSANEZI, E.; NAHÁS, D.; CAMPOS J. Análise do volume do tecido ósseo neoformado na superfície de implantes de titânio cp em coelhos utilizando calceína e alizarina como marcadores em microscopia confocal de varredura a laser – um estudo experimental. **J. Bras. End. Periodontol.**, v. 1, p. 35-41, 1998.

BARBOUR, M. E.; O'SULLIVAN, D. J.; JENKINSON, H. F.; JAGGER, D. C. The effects of polishing methods on surface morphology, roughness and bacterial colonization of titanium abutments. **J Mater Sci: mater Med.**, v. 18, p. 1439-1447, 2007.

BARTH, E.; MYRVLK, Q.M.; WAGNER, W.; GRISTINA, A.G. In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. **Biomaterials**, v. 10, p. 325-328, 1989.

BECKER, W.; BECKER, B.E., NEWMAN, M.G. and NYMAN, S. Clinic and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 5, p. 31-38, 1990.

BEECH, I. B.; GAYLARDE, C. C. Recent advances in the study of biocorrosion—An overview. **Rev. Microbiol.** v. 30, p. 177–190, 1999.

BLACK, J.G. **Microbiology Principles and Explorations**. 4ed. Wiley, New York, p. 786, 1999.

BOLLEN, C.M.; PAPAIOANNO, W., VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEM, M.; STEENBERGHE, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 7, p. 201-211, 1996.

BOS, R.; MEI, H. C.; BUSCHR, H. J. Irrigation performance indicators based on remotely sensed data: a review of literature. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 179-230, 1999.

BRANEMARK, P.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; ÖHMAN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Stockholm: Almqvist and Wiksell**, p. 132, 1977.

BRANEMARK, P.I. Introduction to osseointegration . In: BRANEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. Tissues-integrated prostheses:osseointegration in clinical dentistry. Chicago, Ill.:Quintessence Publ.; p.11-76, 1985.

BREX, M.; THEILADE, J.; ATTSTROM, R. An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. **J. Periodontal Res.** v. 18, p. 177-186, 1983.

BREME, J. Titanium and titanium alloys, biomaterials of preference, Memoires et Etudes Scientifiques. **Revue de Metallurgic**, p. 625-638, 1989.

BREME, J.; WADEWITZ, V. Comparison of titanium tantalum and titanium-niobium alloys for application as dental implants. **Int. J Oral Maxillofac. Implants**, v. 4, p. 113-118, 1989.

CAI, K.; RECHTENBACH, A.; HAO, J.; BOSSERT, J.; JANDT, K.D. Polysaccharide protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behavior aspects. **Biomaterials**, v. 26, p. 5960-5971, 2005.

CARLEN, A.; BRATT, P.; STENUDD, C.; OLSSON, J.; STROMBERG, N. Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. **J. Dent. Res.**, v.77, p. 81-90, 1998.

CHANG, C.C.; MERRITT, K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 12. p. 526-531, 1994.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York: Ed. Wiley-Interscience, p. 796, 1990.

CHIN, M.Y.; SANDHAM, A.; VRIES, J.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Biofilm formation on surface characterized micro-implants for skeletal anchorage in orthodontics. **Biomaterials**, v. 28, n^o 11, p. 2032- 2040, 2006.

CORDERO, J.; MUNUERA, L.; FOLGUEIRA, M. D. Influence of metal implants on infection. An experimental study in rabbits. **J Bone Surg.**, v. 76, p. 717-720, 1994.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **Intern. J. Antimicrob Agents**, v. 11, p. 217-221, 1999.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W.; MONTANARO, L; ARCIOLA, C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **Int J Artif Organs**, v. 28, p. 1062-1068, 2005.

DARIMONT, G. L.; CLOOTS, R.; HEINEN, E.; SEIDEL, L.; LEGRAMD, R., In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. **Biomaterials**, v. 23, p. 2569-2575, 2002.

DEPPE, H.; WARMUTH, S.; HEINRICH, A.; KÖRNER, T. Laser assisted three-dimensional surface modification of titanium implants: preliminary data. **Lasers Med. Sci.**, v. 19, p. 229-33, 2005.

DRAKE, D.R.; PAUL, J.; KELLER, J.C. Primary bacterial colonization of implants surfaces. **Inter. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 14, p. 226-232, 1999.

DURAN, A.; CONDE, A.; COEDO, A.G. Sol-gel coatings for protection and bioactivation of metals used in orthopaedic devices. **J. Mater. Chem.**, v. 14, p. 2282-2290, 2004.

ELAGLI, K.; HILDEBRAND, H.F.; HAMME, G. Biocompatibilite du titane et de ses alliages. **Chir. Dent. France**, v. 457, p. 35-39, 1989.

ELAGLI, K.; NEUT, C. ROMOND, C. HD, H. F. In vitro effects of titanium powder on oral bacteria. **Biomaterials**, v. 13, n° 1, 1990.

ELAGLI, K.; TRAISNEL, M.; HILDEBRAND, H. F. Evaluation de la tenue a la corrosion du titane en milieu salive artificielle. **Innov. Tech. Biol. Med.**, v. 12, p.191-199, 1991.

ELAGLI, K.; NEUT, C.; ROMOND, C.; HILDEBRAND, H.F. In vitro effects of titanium powder on oral bacteria. **Biomaterials**, v. 13, p. 25-27, 1992.

ELLEN, R.P.; LEPINE, G.; NGHIEM, P. M. In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. **Adv. Dent. Res.**, v. 11, p. 33-42, 1997.

ERICSSON, I.; LEKHOLM, U.; BRANEMARK, P.I.; LINDHE, P.; GLANTZ, P.O.; NYMAN, S.A. Clinical evaluation of fixed bridge restorations supported by the combination of teeth and osseointegrated titanium implants. **J. Clin. Periodont.**, v. 13, p. 307-312, 1986.

ESPOSITO, M.; HIRSCH, J.M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). Etiopathogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, p. 721-764, 1998.

FRANSEN, E.V.; PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, p. 129-133, 1991.

GAGGL, A.; SCHULTES, G.; MÜLLER, W.D.; KÄRCHER, H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces – a comparative study. **Biomaterials**, v. 21, p. 1067-1073, 2000.

GERBER, J.; WENAWESER, D. MAYFIELD, L.H.; LANG, N. P. PERSON, R. Comparison of bacterial plaque sample from titanium implant and tooth surface by different methods. **Clinical Oral implants Research**, 2006.

GIBBONS, R.J.; HOUTE, J.V. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 19-44, 1975.

GRISTINA, A. G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. **Science**, v. 237, p. 1588-1595, 1987.

GROBNER-SCHREIBER, B.; GRIEPENTROG, M.; HAUSTEIN, I.; MULLER, W. D.; LANGE, K. P.; BRIEDIGKEIT, H.; GOBEL, U. B. Plaque formation on surface

modified dental implants—An *in-vitro* study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 543-551, 2001.

GRÖBNER-SCHREIBER, B.; GRIEPENTROG, M.; HAUSTEIN, I.; MÜLLER, W.D.; LANGE, K.P.; BRIEDIGKEIT, H.; GÖBEL, U.B. Plaque formation on surface modified dental implants. An *in vitro* study. **Clin. Oral. Implants Res.**, v. 12, p. 543-551, 2001.

GROESSNER-SCHREIBER, G.B.; HANNING, M.; DÜCK, A.; GRIEPENTROG, M.; WENDEROTH, D.F. Do different implant surface exposed in the oral cavity of humans show different biofilm compositions and activities. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 112, p. 516-522, 2004.

GROBNER-SCHREIBER, B.; GRIEPENTROG, M.; HAUSTEIN, I.; MULLER, W. D.; HARRIS, L. G.; MEREDITH, D. O.; ESCHBACH, L.; RICHARDS, R. G. *Staphylococcus aureus* adhesion to standard micro-rough and eletropolished implant materials. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 18, p. 1151-1156, 2007.

GROSS, K. A.; BABOVIE, M. Influence of abrasion on the surface characteristics of thermally sprayed hydroxyapatite costing. **Biomaterials**, v. 23, p. 4731-4737, 2002.

GYÖRGY, E.; PÉREZ DEL PINO, A.; SERRA, P.; MORENZA, J.L. Chemical composition of dome-shaped structures grown on titanium by multi-pulse Nd:YAG laser irradiation. **Appl Surface Sci.**, v. 189, p. 1-8, 2003.

HALL STOOLLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases nature. **Reviews Microbiology**, p. 95-108, 2004.

HARRIS, L. G.; MEREDITH, D. O.; ESCHBACH, L.; RICHARDS, R. G. *Staphylococcus aureus* adhesion to standard micro-rough and eletropolished implant materials. **J Mater Sci: Mater Med.**, v. 18, p. 1151-1156, 2007.

HEIMDAHL, A.; KONDELL, P.A.; NORD, C.E.; NORDENRAM, A. Effect of insertion of osseointegrated prosthesis on the oral microflora. **Swed. Dent. J.**, v. 7, p. 199-204, 1983.

ISMAIL, K. H. M.; JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K.; EARTHMAN, J. C. The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel. **Electrochim. Acta.**, v. 44, p. 4685-4695, 1999.

IVANOFF, C. J.; HALLGREN, C.; WIDMARK, G.; WENNERBERG, A. Histologic evaluation of bone integration of TiO₂ blasted and turnes titanium microimplants in humans. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.12, p. 128-134, 2001.

KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. **Intern. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 3, p. 247-259, 1988.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 42, p. 627-656, 1988.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 3247-3252, 1993.

KÖNIG, D.P.; PERDREAU-REMINGTON, F.; RÜTT, J.; STOSSBERGER, P.; HILGERS, R.D.; PLUM, G. Slime production of *Staphylococcus epidermidis*: increased bacterial adherence and accumulation onto pure titanium. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 69, n° 5, p. 523-526, 1998.

KÖNIG, D.P.; PERDREAU-REMINGTON, P.F.; RÜT, J.; HILGERS, R.D.; SCHIERHOLZ, J.M. Adherence to and accumulation of *S. epidermidis* on different biomaterials due to extracellular slime production. In vitro comparison of a slime-producing strain (RP 62A) and its isogenic slime negative mutant (M7). **Zentralbl Bakteriol.**, v. 289, n° 3, p. 355-364, 1999.

KONIG, D. P.; SCHIERHOLZ, J. M.; BERTRAM, C. Decreased accumulation of *S.epidermidis* onto stainless steel in comparison to other biomaterials. **J. Hosp. Inf.**, v. 44, p. 75-77, 2000.

KÖNIG, D.P.; SCHIERHOLZ, J.M.; HILGERS, R.D.; BERTRAM, C.; PERDREAU-REMINGTON, P.F.; RÜT, J. In vitro adherence and accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP 62A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on four different bone cements. **J. Langenbecks Arch. Surg.**, v. 386, n° 5, p. 328-332, 2001.

LAMONT, R. J. e JENKINSON, H. F. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol Immunol.**,v. 15, p. 341-349, 1998.

LANGE, K. P.; BRIEDIGKEIT, H.; GOBEL, U. B. Plaque formation on surface modified dental implants—An *in-vitro* study. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 543-551, 2001.

LEE, K.H.; MAIDEN M.F.; TANNER, A.C., WEBER, H.P. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 131-138, 1999.

LEE, I.S.; KIM, D. H.; KIM, H. E.; JUNG, Y. C.; HAN, C. H. Biological performance of calcium phosphate films formed on commercially pure Ti by electron-beam evaporation. **Biomaterials**, v. 23, p. 609-615, 2002.

LEONHARDT, A.; OLSSON, J.; DAHLEN, G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite and amalgam surfaces in vivo. **J. Dent. Res.**, v. 74, p. 1607-1612, 1995.

LEONHARDT, A.; RENVERT, S.; DAHLEN, G. Microbial findings at failing implants. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 10, p. 339-345, 1999.

LENDENMAN, U. GROGAN, J. OPPENHEIM, F. G. Saliva and dental pellicle - a review. **Adv Dental Res.**, n° 14, p. 22-28, 2000.

LEWANDOWSKA, M.; WLODKOWSKA, M; OLKOWSKI, R.; ROGUSKA, A.; POLAK, B.; PISARECK, M.; LEWANDOWSKA-SZUMIEL, M.; KURZYDLOWSKI, K.J. Chemical surface modifications of titanium implants. **Macromol. Symp.**, v. 253, p. 115-121, 2007.

LI, Y.K.; HANNA, M.N.; SVENSÄTER, G.; ELLEN, R.P.; CVITKOVITCH, D.G. Cell density modulates acid adaption in *Streptococcus mutans*: Implications for survival in biofilms. **Bacteriol.**, v. 183, n° 23, p. 6875-6884, 2001.

LI, Y.H.; LAU, P.C.; TANG, N.; SVENSÄNTER, G.; ELLEN, R.P.; CVITKOVITCH, D.G. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. **Bacteriol.**, v. 184, n° 22, p. 6333-6342, 2002.

LI, H.; KHOR, K. A.; CHEANG, P. Titanium dioxide reinforced hydroxyapatite coating deposited by high velocity oxy-fuel (HVOF) spray. **Biomaterials**, v. 23, p. 85-91, 2002.

LIMA, E. M. C. X.; KOO, H.; SMITH, A. M. V.; ROSALEN, P. L.; CURY, A. A. D. B. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. **Clin Oral Impl. Res**, v. 19, p. 780-785, 2007.

LIU, X.; CHU, P.K.; DING, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v. 47, p. 49-121, 2004.

MABBOUX, F.; PONSONNET, L.; MORRIER, J.J.; JAFFREZIC, N.; BARSOTTI, O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant materials- an in vitro study. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v. 39, n° 4, p. 199-205, 2004.

MACK, D.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G.; ROHDE, H.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K. M. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Anal Bioanal Chem.** v. 387, p. 399-408, 2007.

MARSH, P.D. BRADSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology**, p. 169 – 175, 1995.

MARSH, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, p. 279-294, 2003.

MARTÍN-MARTÍNEZ, J.M. Adhesión y uniones adhesivas. Ed. Universidad de Alicante. Alicante, Espanha, p. 31, 1998.

MEFFERT, B. L.; FRITZ, M. E. Dental Implants: a review. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 859–870, 1992.

MIYANO, N.; OIE, S.; KAMIYA, A. Efficacy of disinfectants and hot water against biofilm cells of *Burkholderia cepacia*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p.671-674, 2003.

MOMBELLI, A.; VAN OOSLEN, M.A.; SCHURCH, E.Jr.; LAND, N.P. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 2, p. 145-151, 1987.

MONTVILLE, R.; SCHAFFNER, D.W. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 7188-7193, 2003.

MUSTAFA, K.; WENNERBERG, A.; WROBLEWSKI, J.; HULTENBY, K.; LOPEZ, B. S.; ARVIDSON, K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 12, p. 515-525, 2001.

NAKAZATO, G.; TSUCHIYA, H.; SATO, M.; YAMAUCHI, M. In vivo plaque formation on implant materials. **Int. J. Oral Maxillofac Implants**, v. 4, p. 321-326, 1989.

O'MAHONY, A.; MACNEILL, S.; COBB, C. Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. **Quintessence Int.**, v. 31, p. 249-256, 2000.

PETTI, S.; PEZZIT, R.; CATTARUZZA, M. S.; OSBORN, J. F.; D'Arca, A. S. Restoration-related salivary *Streptococcus mutans*: a dental caries risk factor. **J. Dent.**, v. 25, p. 275-262, 1997.

PERSSON, L.G., LEKHOLM, U.; LEONHARDT, A.; DAHLÉN, G.; LINDHE, J. Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 7, p. 90-95, 1996.

PETO, G.; KARACS, A.; PÁSZTI, Z.; GUCZI, T.; DIVINYI, T.; JOÓB, A. Surface treatment of screw shaped titanium dental implants by high intensity laser pulses. **Appl. Surface Science**, v. 186, p. 7-13, 2002.

PIATTELLI, A.; COSCI, F.; SCARANO, A.; TRISI, P. Localized chronic suppurative bone infection as a sequel of peri-implantitis in a hydroxyapatite-coated dental implant. **Biomaterials**, v. 16, p. 917-920, 1996.

PIER-FRANCESCO, A.P.; ADAMS, R.J.; WATERS, M.G.J., WILLIAMS, D.W. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. **Clin. Oral. Impl. Res.**, v. 17, p. 633-637, 2006.

PIZZOLITTO, E. L. **Contribuição ao Estudo In Vitro da Corrosão Induzida por Microrganismos Sobre Liga Metálica a Base de Cobre de uso na Odontologia—Modelo Experimental com as Cepas Cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997, 117f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1997.

PIZZOLITTO, E. L.; ITO, I. Y.; GUASTALDI, A. C. Corrosion Induced by *Streptococcus mutans* (in vitro) Observed on Restorative Dental Materials. In: INTERNATIONAL EFC WORKSHOP, 4th, 1999, Portugal. **Microbial Corrosion: proceedings**. Grã-Bretanha: The European Federation of corrosion/IOM Communications, 2000. p.179-181. (European Federation of Corrosion Publ., n. 29).

PIZZOLITTO, 2001 PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 340-344, 2001.

QUIRYNEN M.; MARECHAL, M.; BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; DARIUS, P. L.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 17, p. 138-144, 1990.

QUIRYNEM, M.; VANDER MEI, H. C.; BOLLEN C. M. L.; SCHOTTE, A.; MARECHAL, M.; DOORNBUSCH G. I. Physico –chemical interactions in initial microbial. **J. Dent. Res.**,v. 68, p. 796-799, 1993.

QUIRYNEM, M.; BOLLEN, C.M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, p. 1-14, 1995.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C.M.; PAPAIOANNOU, W.; VAN ELDERE, J.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of titanium abutment surface roughness on

plaque accumulation and gingivitis: short-term observations. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 11, p. 169-178, 1996.

RABOCAI, T. Físico-Química de Superfícies. OEA. Washington, DC, p. 128, 1979.

RAZATOS, A.; ONG, Y.L.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 9, p. 1361-1373, 1998.

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 11; p. 94-100, 2003.

RIMONDINI, L. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. **J. Periodontol.**, v. 68, n 6, p. 556-562, 1997.

RIMONDINI, L.; CERRONI, L.; CARRASSI, A.; TORRICELLI, P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. **Int. J. Oral. Maxillofac Implants**, v. 17, nº 6, p. 793-798, 2002.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1599-1607, 2000.

SAGNUR, R.; DENIS, M. S.; FERRIS, W.; AARON, S. D.; CHAN, F.; LEE, C.; RAMOTAR, K. Multiple combinations bactericidal of Staphylococcal biofilms from implant-associated Infections. **American Society for Microbiology**, p. 55-61, 2006.

SANS, A.; OYARZUN, A.; FARIAS, D.; DIAZ, I. Estudo experimental da resposta óssea a um novo tipo de tratamento de superfície de implantes de titânio. **Int. J. Implantol.**, v. 10, p. 20-21, 2001.

SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; WIELAND, M.; HORN, N.; NUESRY, E.; BUBE, C.; BECKER, J. Effects of hidrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation. A pilot study. **Mund Kiefer Gesichts Chir.**, v. 11, p. 333-338, 2007.

SCOTT, R.; KANTORSKI, K.Z.; MONACO, C.; VALANDRO, L.F.; CIOCCA, L.; BOTTINO, M.A. SEM evaluation of in situ early bacterial colonization on a Y-TZP ceramic: a pilot study. **Int. J. Prosthodont.**, v. 20, nº 4, p. 419-422, 2007.

SISTI, K.E.; GARCIA Jr; I.R.; GUASTALDI, A.C.; ANTONIOLLI, A.C.M.B; ROSSI, R.; NETO, A.L.B. Analyse titanium surface irradiated with laser with and without deposited of durapatite. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, p. 3-10, 2006.

SKILLMAN, L. C.; SUTHERLAND, I. W.; JONES, M. V. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. **Journal of applied microbiology**, v. 85, p. 13-18, 1999.

SOCRANSKY E HAFFAJEE, Dental biofilms: Difficult Therapeutic targets V. 28, P. 12-55, 2002.

STEINBERG, D.; SELA, M.N.; KLINGER, A.; KOHAVI, D. Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. **Clin Oral Implants Res.**, v. 9, nº 2, p. 67-72, 1998.

STEINEMANN, S. G.; EULENBERGER, J.; MAUSLI, P. A.; SCHROEDER, A. Adhesion of bone titanium. In: CHRISTEL, P.; MEUNIER, A.; LEE, A. J. C. **Biological and biomechanical performance of biomaterials**. Amsterdam: Ed. Elsevier Science, p. 409-414, 1986.

STEINEMANN, S.G. Titanium – the material of choice? **Peridontol.**, v. 17, p. 7-21, 1998.

TERAOKA, K.; NONAMI, T.; DOI, Y.; TAODA, H.; NAGANUMA. K.; YOKOGAWA. Y.; KAMEYAMA, T. Hydroxyapatite implantation on surfaces of pure titanium for orthopedic implants. **Mater. Sci. Eng.**, v. 13, p. 105-107, 2000.

TSANG, C. S. P.; MC MILLAN, A S. Antifungal suscetibilityof *Cândida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. **Clin Oral Invest.**, v. 11, p. 361-368, 2007.

VAN HOUTE J., GIBBONS R.J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Anual Review of Microbiology**, v. 29, p. 19-42, 1975.

VAN WINKELHOFF, A.J.; GOENE, R.J.; BENSCHOP, C.; FOLMER, T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 11, p. 511-520, 2000.

VERSICK L.C.O.; ALENCAR, A.C.; RAMIRES, I.; GUASTALDI, A.C. Dental implants: surface modification of cp-Ti using plasma spraying and the deposition of hydroxyapatite. **Mater Sci Forum**, v. 4, p. 669-674, 2004.

VOGLER, E. A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 69-117, 1998.

WEBER, H.P. e LANG, N.P. The use of dental implants in comprehensive therapy. **Curr. Opin. Dent.**, v. 1, p. 104-110, 1991.

WERNER, S. E.; JOHNSON, C. A.; LAYCOCK, N. J.; WILSON, P. T.; WEBSTER, B. J. Pitting of type 304 stainless steel in the presence of a biofilm containing sulphate reducing bacteria. **Corros. Sci.**, v. 40, p. 465-480, 1998.

WELLIN-NEILANDS, W.J.; SVENSÄTER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 73, n° 17, p. 5633-5638, 2007.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. ANDERSSON, B.; KROL, J. J. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. **Clin Oral Implants Res.**, v. 6, p. 24-30, 1995.

WHITAKER, C.J.; KLIER, C.M.; KOLEMBRANDER, P.E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 513-552, 1996.

WU-YAN, C.D.; EGANHOUSE, K.J.; KELLER, J.C.; WALTERS, K.S. Oral bacterial attachment to titanium surfaces: A scanning electron microscopy study. **J. Oral Implantol.**, v. 21, p. 207-213, 1995.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K.; HIRAYAMA, A. Influence of surface modifications to titanium on oral bacterial adhesion *in vitro*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, p. 388-394, 2000.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity *in-vivo*. **Biomaterials**. v. 22, p. 2043-2048, 2000.

ZHU, M.; TAKENAKA, S.; SATO, M.; HOSHINO, E. Influence of starvation and biofilm formation and acid resistance of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 16, n° 1, p. 24-27, 2001.