

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO YUDI SAKAMOTO



ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO APÓS  
TRATAMENTOS QUÍMICOS DE DESCONTAMINAÇÃO

CURITIBA

2020

MARCELO YUDI SAKAMOTO

ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO APÓS  
TRATAMENTOS QUÍMICOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo  
Schwartz-Filho

CURITIBA

2020

Sakamoto, Marcelo Yudi

Análise físico-química da superfície de titânio após tratamentos químicos de descontaminação [recurso eletrônico] / Marcelo Yudi Sakamoto – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia.  
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho

1. Peri-implantite. 2. Implantes dentários. 3. Descontaminação. I. Schwartz-Filho, Humberto Osvaldo. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.693

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM ODONTOLOGIA**

No dia onze de dezembro de dois mil e vinte às 14 horas, na sala Plataforma Teams, Campus Botanico, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **MARCELO YUDI SAKAMOTO**, intitulada: **ANÁLISE FÍSICOQUÍMICO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO APÓS TRATAMENTOS QUÍMICO DE DESCONTAMINÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JOÃO RODRIGO SAROT (DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA), ELCIO MARCANTONIO JUNIOR (UNESP). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 11 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

14/12/2020 12:31:11.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/02/2021 09:06:55.0

JOÃO RODRIGO SAROT

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA)

Assinatura Eletrônica

07/02/2021 21:43:23.0

ELCIO MARCANTONIO JUNIOR

Avaliador Externo (UNESP)



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARCELO YUDI SAKAMOTO** intitulada: **ANÁLISE FÍSICOQUÍMICO DA SUPERFÍCIE DE TITÂNIO APÓS TRATAMENTOS QUÍMICO DE DESCONTAMINÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

14/12/2020 12:31:11.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

19/02/2021 09:06:55.0

JOÃO RODRIGO SAROT

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA)

Assinatura Eletrônica

07/02/2021 21:43:23.0

ELCIO MARCANTONIO JUNIOR

Avaliador Externo (UNESP)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Verônica Haruhe Aoki Sakamoto e Milton Noboru Sakamoto, por me apoiarem durante todo o desenvolvimento do mestrado. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

À minha irmã, Caroline Yumi Sakamoto.

E aos meus amigos de infância, Alysson Akio Sato, Henrique Takayoshi Ida Nakatani, Leonardo Low, Matheus da Costa Travassos Mendes, Samuel Kenji Amano, Vinicius Medeiros Assef, Virgilio Frota. São mais de 20 anos de amizade!

Amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por tornar tudo isso possível, não somente na vida acadêmica, mas que em todos os momentos foi o maior mestre que alguém pode conhecer.

Ao professor orientador Humberto Osvaldo Schwartz-Filho, pela orientação, cobrança, amizade e compartilhamento de ensinamentos. Obrigado pela paciência, oportunidade de trabalhar ao seu lado e por fazer parte desse momento da minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná, em especial à coordenadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Schussel e demais professores do programa.

Aos professores de Periodontia Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho, Profa. Dra. Geisla Soares, Prof. Dr. João Paulo Steffens e Profa. Dra. Reila Tainá Mendes, por compartilharem seus conhecimentos tanto na sala de aula quanto na clínica.

Aos amigos, Anny Longo, Dhaiana Cruz, Gabriel Guidio Guarengi, Juliana Marfut, Mariana Oliveira e Sara Tornier pela companhia e experiências compartilhadas desde a graduação. Vocês tornaram essa caminhada mais leve, repleta de sorrisos e harmonia.

Ao meu grande amigo Eduardo Henrique de Souza Oliveira, por toda ajuda e companheirismo durante o mestrado! Sem você, isso não seria possível.

Às alunas de iniciação científica, Giovana Carneiro e Viviane Rankel.

À minha família, por acreditarem e sempre darem o melhor para mim.

Ao Dr. Thiago Gomes da Silva que nunca mediu esforço para me ajudar com as análises deste trabalho.

Aos funcionários dos laboratórios da UFPR, em especial à Bruna Colombo e ao Centro de Microscopia Eletrônica (CEM) da UFPR, por proporcionarem acolhimento, acessibilidade e infraestrutura para a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram nessa etapa da minha vida.

## RESUMO

A peri-implantite é uma doença associada ao biofilme bucal, que afeta os tecidos de sustentação em volta dos implantes dentários em função. Assim como nos dentes, o biofilme acumulado é um fator etiológico para resposta inflamatória do hospedeiro, resultando no mucosite peri-implantar, que é reversível, porém se não tratada, pode evoluir para uma peri-implantite, resultando em perda óssea vertical e horizontal podendo levar à falha do implante. Um desafio clínico no tratamento dessa patologia é a descontaminação total da superfície do implante. Sendo assim, este estudo analisou, pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios x (EDS), os efeitos físicos e químicos do tratamento de descontaminação química da superfície de titânio com microtopografia. Foi realizado um estudo *in vitro* com 24 discos de titânios, os quais foram submetidos à cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e divididos conforme o tratamento de descontaminação (solução tampão-fosfato 1x, tetraciclina em pasta, BlueM® gel e digluconato de clorexidina gel 2%). Para análise morfológica foi utilizada a técnica de MEV, através de micrografias obtidas por elétrons retroespalhados e elétrons secundários. A constituição química das amostras foi avaliada pela técnica de EDS. Os resultados obtidos mostram que o percentual de presença de elementos como Ti, O, C, F, Si e Ca podem variar de acordo com os métodos aplicados na descontaminação. Nos discos descontaminados com digluconato de clorexidina gel a 2% foi observada significativa diminuição no percentual de Titânio e um aumento do percentual de teor de Oxigênio, sugerindo um aumento da formação de óxido de titânio. O teor de Carbono foi maior no grupo tratado com BlueM® gel quando comparado com o controle. Observam-se também, no tratamento com clorexidina, a diminuição no teor percentual de titânio e um aumento no teor de oxigênio, sugerindo a formação de óxido de titânio. O presente estudo mostra que métodos de descontaminação químicos causam alterações em superfícies de titânio, e que tais modificações podem ser importantes fatores para o sucesso do tratamento das peri-implantites.

Palavras-chaves: Peri-implantite. Implantes dentários. Descontaminação química.

## ABSTRACT

Peri-implantitis is a disease associated with oral biofilm, which affects the supporting tissues around dental implants in function. As in the teeth, the accumulated biofilm is an etiological factor for the host's inflammatory response, which is reversible, but if left untreated, it can progress to peri-implantitis, vertical and horizontal bone loss, which can lead to implant failure. A clinical challenge in the treatment of this pathology is the total decontamination of the implant surface. Thus, this study analyzed, using scanning electron microscopy (SEM) and dispersive x-ray energy (EDS) techniques, the physical and chemical effects of the chemical decontamination treatment of the titanium surface with microtopography. An in vitro study was carried out with 24 titanium discs, which were drilled into the culture of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and divided according to the decontamination treatment (1x phosphate buffer solution, mass tetracycline, BlueM® gel and chlorhexidine digluconate gel 2%) . For morphological analysis, the SEM technique was used, through appropriate micrographs by backscattered and secondary electrons. The chemical constitution of the components was evaluated by the EDS technique. The results found show that the percentage of presence of elements such as Ti, O, C, F, Si and Ca can vary according to the computer methods in the decontamination. Discs decontaminated with 2% chlorhexidine gel digluconate showed a decrease in the percentage of titanium and an increase in the percentage of oxygen content, suggesting an increase in the formation of titanium oxide. The carbon content was higher in the group treated with BlueM® gel when compared to the control. It is also observed, in the treatment with chlorhexidine, a decrease in the percentage content of titanium and an increase in the oxygen content, suggesting the formation of titanium oxide. The present study shows that chemical decontamination methods cause changes in Ti surfaces, and that such modifications may be important for the successful treatment of peri-implantitis.

Keywords: Peri-implantitis. Dental implants. Chemical decontamination.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
3.1 Obtenção dos discos de titânio .....	12
3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio .....	14
3.2.1 Cultura de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .....	14
3.2.2 Contaminação das amostras .....	14
3.3 Descontaminação das amostras.....	16
3.4 MEV e EDS .....	20
3.5 Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS .....	21
4.1 Amostras e caracterização das superfícies pré-contaminação .....	21
4.2 Aplicação dos antimicrobianos locais .....	21
4.3 MEV .....	22
4.4 EDS.....	23
5. DISCUSSÃO .....	27
6. CONCLUSÕES.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34
8. Apêndice.....	41
1. Apêndice 01.....	41
2. Apêndice 02.....	42

## 1. INTRODUÇÃO

Os tratamentos reabilitadores de pacientes parcial ou totalmente desdentados, a fim de devolver sua função mastigatória e estética de forma eficiente, foram aperfeiçoados através do desenvolvimento dos implantes osseointegrados. Desde a sua criação, há mais de 50 anos, os materiais que compõem tais implantes, assim como seu formato e propriedades de superfície vem sofrendo diversas alterações a fim de aprimorar a qualidade da osseointegração (Albrektsson and Wennerberg 2005).

Apesar do grande sucesso alcançado com implantes osseointegrados na prática clínica, o número de complicações neste tipo de tratamento ainda é significativo. Em uma revisão sistemática e metanálise publicada por Derks et al. (Derks, Tomasi et al. 2015), demonstrou a prevalência com média de 22% nas Américas e Europa. Em um estudo clínico, com acompanhamento de 10 anos, observou-se uma taxa de 21,17% de falhas em implantes (Mohanty, Sudan et al. 2018). Complicações podem ocorrer na fase trans-operatória, e na fase protética. As principais delas são as de condições inflamatórias, a mucosite peri-implantar e a peri-implantite (Schwarz, Derks et al. 2018). A peri-implantite ocorre pelo acúmulo de biofilme ao redor do implante e apresenta sangramento e/ou supuração após delicada sondagem, aumento da profundidade de sondagem em relação a exames prévios, presença de perda óssea, além daquelas observadas após a fase de remodelação óssea (Mombelli, van Oosten et al. 1987, Albrektsson, Johansson et al. 1994, Tonetti, Prato et al. 1996, Caton, Armitage et al. 2018). Existem tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos para essa doença, sendo elas o debridamento mecânico, antibióticos locais e sistêmicos e

terapias a laser. Porém, a completa remoção do biofilme, que seria o objetivo ideal das terapias propostas, é extremamente difícil de ocorrer. Além disso, é observado que os tratamentos aplicados podem causar também alguma modificação sobre a superfície do implante, seja ela química ou física, como por exemplo a abrasão, corrosão e alterações químicas da superfície (Valderrama and Wilson 2013, Valderrama, Blansett et al. 2014, Ryu, Kim et al. 2015).

Diversas variações na superfície de implantes têm sido avaliadas para melhorar a qualidade e a taxa de osseointegração. Foi demonstrado que a microtopografia das estruturas de superfície afetam a adesão celular, migração, proliferação, diferenciação, expressão de RNAm, além da síntese e secreção protéica, que podem ter um efeito benéfico sobre a formação da interface osso-implante (Papalexiou, Novaes et al. 2004, Jimbo, Sotres et al. 2012). Dentre as superfícies, a micro é estudada e amplamente utilizada comercialmente (Novaes, de Souza et al. 2010, Wennerberg, Albrektsson et al. 2018, Albrektsson and Wennerberg 2019).

Apesar do acelerado e constante avanço tecnológico na área de tratamentos de superfície de titânio dos implantes odontológicos, a contaminação bacteriana, presença de toxina e/ou de produtos inflamatórios reacionais já são suficientes para impedir a ocorrência da cicatrização biológica dos mesmos. (Meffert, Langer et al. 1992, Mouhyi, Dohan Ehrenfest et al. 2012) Esta colonização bacteriana pode se estruturar na forma de biofilme (Listgarten 1997, Charalampakis and Belibasakis 2015) com um padrão de colonização que parece ser inicialmente lentificado em comparação com a dentição natural, devido à ausência de microbiota nativa (Quirynen, Vogels et al. 2005, Charalampakis and Belibasakis 2015). A formação de biofilmes na superfície do

implante parece ser influenciada pelas propriedades da superfície do implante, incluindo composição química, rugosidade superficial e energia livre de superfície (Heitz-Mayfield and Lang 2010).

No biofilme, os micro-organismos apresentam fenótipo relativamente alterado em relação a taxa de crescimento, transcrição gênica e resistência bacteriana (Patel 2005, Amarasinghe, Scannapieco et al. 2009, Freire, Sedghizadeh et al. 2011). Dezenove espécies bacterianas foram encontradas em contagens mais altas na peri-implantite, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *P. gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus anaerobius*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *Treponema socranskii* (Faveri, Figueiredo et al. 2015). Foi demonstrado por Freire et al. (2011) que o A. a. tem capacidade de formação de biofilme em implantes dentários, resultando em resposta inflamatória, osteólise e destruição tecidual quando implantados em modelos animais.

As terapias propostas para o tratamento da peri-implantite se baseiam nos relatos científicos encontrados nos tratamentos para aquela, consistindo prioritariamente na redução da carga bacteriana das bolsas peri-implantares e da superfície dos implantes, utilizando, ou não, em conjunto técnicas de regeneração óssea e a reosseointegração. (Heitz-Mayfield and Lang 2004) Os principais tratamentos propostos envolvem: a remoção mecânica do biofilme (raspagem manual com curetas de aço ou teflon; uso de brocas ou escovas; jatos abrasivos; laserterapia)(Speelman, Collaert et al. 1992, Brookshire, Nagy et al. 1997, Mombelli and Lang 1998, Lang, Wilson et al. 2000, Suh, Simon et al.

2003, Heitz-Mayfield and Lang 2004, Schou, Berglundh et al. 2004, Schwarz, John et al. 2017), uso de antimicrobianos sistêmicos, descontaminação química da superfície dos implantes (tetraciclina; digluconato de clorexidina; ácido cítrico; peróxido de hidrogênio; ácido fosfórico 35%)(Meffert, Langer et al. 1992, Zablotsky, Meffert et al. 1992, Zablotsky 1993, Schenk, Flemmig et al. 1997, Lang, Wilson et al. 2000, Roos-Jansaker, Lindahl et al. 2011, Subramani and Wismeijer 2012, Mellado-Valero, Buitrago-Vera et al. 2013, Parma-Benfenati, Roncati et al. 2015, Al-Hashedi, Laurenti et al. 2017), além de técnicas cirúrgicas a retalho e regeneração óssea (Schwarz, Sculean et al. 2005, Roos-Jansaker, Lindahl et al. 2006, Roos-Jansaker, Lindahl et al. 2006, Roos-Jansaker, Renvert et al. 2006, Schwarz, Nuesry et al. 2006, Lindhe, Meyle et al. 2008, Roccuzzo, Bonino et al. 2011). A respeito do tratamento da peri-implantite, é observada melhora em um período a curto prazo, porém, com 75% dos casos não resolvidos ou recorrentes após 5 anos; evidenciando a importância da prevenção (Heitz-Mayfield and Mombelli 2014, Heitz-Mayfield, Aaboe et al. 2018).

Apesar de estudos abordarem diversas técnicas e opções de tratamento para essa complicação, ainda não existe o padrão ouro quando abordamos terapias para peri-implantite (Claffey, Clarke et al. 2008, Schwarz, Sahm et al. 2011). O objetivo do uso de agentes químicos é a total descontaminação da superfície de Ti, no entanto essa situação não é observada na literatura. Pois além de eliminar a presença bacteriana e suas toxinas, o agente químico ideal deve ser passível de sua completa remoção. Devolvendo assim à superfície suas características de biocompatibilidade fundamentais para a re-osseointegração (Park, Olivares-Navarrete et al. 2012, Sousa, Mardas et al. 2016).

Eficácia da descontaminação, possíveis alterações químicas e físicas, resíduos de agentes químicos remanescentes, são fatores que influenciam o sucesso e o prognóstico do tratamento da doença. A avaliação da influência de diferentes métodos nas alterações físico-químicas causadas nas superfícies de Ti se faz necessária para um melhor entendimento desse processo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Observar efeitos causados por agentes de descontaminação (Solução tampão fosfato-salino (PBS); tetraciclina pasta, BlueM® gel, digluconato de clorexidina gel a 2%) na superfície de titânio, do ponto de vista físico-químico.

### **2.2 Objetivos específicos**

Verificar na superfície de titânio, após o uso dos agentes descontaminantes:

1. Alterações morfológicas, por meio de MEV.
2. Resíduos dos agentes de descontaminação, por meio de EDS.
3. Alterações na composição química da superfície, por meio de EDS.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Obtenção dos discos de titânio**

As 24 amostras de titânio utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas e cedidas pela empresa NEODENT® (Curitiba, Paraná, Brasil). O tamanho (10 mm x 2 mm) e o formato dos discos utilizados na cultura estão representados na Figura 1. Estas amostras, compostas por titânio comercialmente puro (grau 4), foram usinadas no formato de discos. A microtopografia foi obtida por um

processo de jateamento com partículas de óxido de Alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido (propriedade comercial).

A caracterização da topografia das amostras foi feita no nível micrométrico usando interferômetro ótico e microscopia de força atômica para avaliação. O cálculo paramétrico foi realizado após a remoção de erros de forma e ondulações por um filtro Gaussiano (50 mm × 50 mm). Os seguintes parâmetros tridimensionais foram selecionados: Sa ( $\mu\text{m}$ ), referente à rugosidade média; Sds ( $\mu\text{m}^{-2}$ ), referente a densidade de picos; e Sdr (%), referente ao aumento da área da superfície. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a avaliação da morfologia das superfícies. E para avaliação da química de superfície foi utilizada a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (Schwartz-Filho, Morandini et al. 2012).



**Figura 1** - Aspecto macroscópico da amostra. Tamanho de 10 mm x 2 mm, usinadas no formato de discos.

## 3.2 Contaminação Bacteriana das Superfícies dos Discos de Titânio

### 3.2.1 Cultura de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A cepa de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 29523 foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Geisla Mary Silva Soares, da disciplina de Periodontia, departamento de Estomatologia UFPR, e manipulada no Laboratório Anexo no Setor de Ciências da Saúde da UFPR.

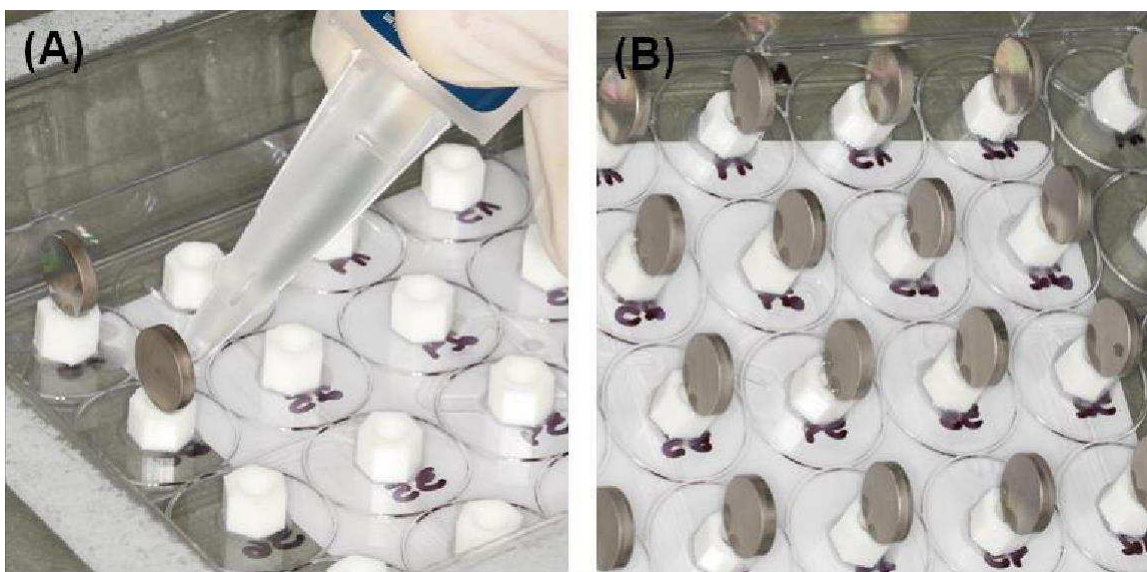
Uma colônia de bactérias foi removida da placa com auxílio de alça de platina e colocada em um tubo contendo 10 ml de meio de cultura caldo BHI Broth (Brain Heart Infusion Agar, Acumedia, Neogen Corporation, Michigan, EUA) + Hemina 1%. O tubo foi incubado em ambiente de microaerofilia com aproximadamente 5-10% de CO<sub>2</sub>, em estufa a 37<sup>0</sup> C por 24 horas.

### 3.2.2 Contaminação das amostras

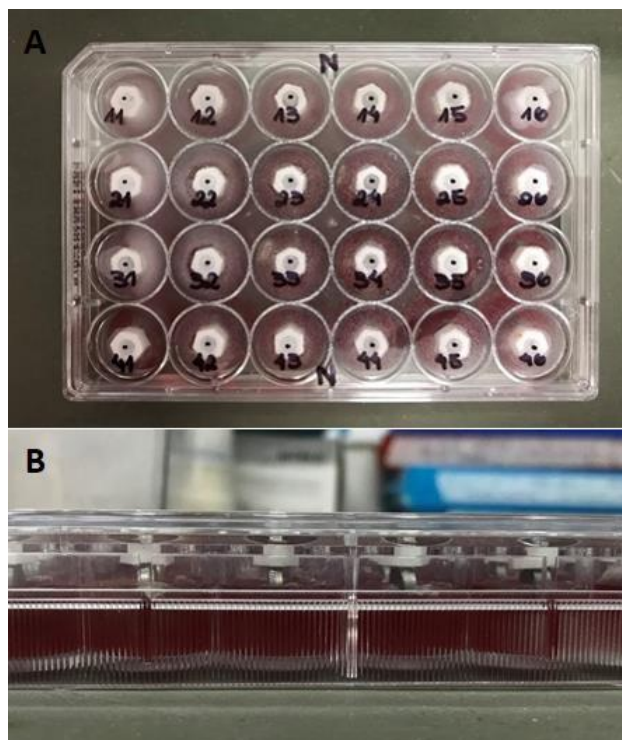
A partir do meio de cultura caldo BHI Broth contendo colônias bacterianas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (V5100, Metash, Shanghai Instruments) a 600 nm. A turbidez foi comparada com o padrão 0,5 da escala MacFarland, sendo assim o resultado da absorbância deve estar entre 0,09 e 0,11, o que equivale a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (UNITED STATES PHARMACOPEIAL, 1990; NCCLS, 2002). Como *blank* (controle negativo) foi utilizado o meio de cultura caldo BHI Broth livre de colônias bacterianas.

Após a determinação da concentração da suspensão bacteriana, a concentração foi ajustada em  $1,5 \times 10^6$  para realização do procedimento. Posteriormente, os discos foram fixados em anteparos plásticos previamente esterilizados e fixados na tampa de placas de 24 poços com auxílio de pinça

anatômica e de adesivo instantâneo, sendo separados de acordo com seu tratamento de descontaminação (Figura 2). A suspensão bacteriana foi colocada juntamente com 5% de sangue de carneiro no interior de cada poço, com volume total de 1,9 ml/poço. As placas de 24 poços contendo a suspensão bacteriana e os corpos de prova permaneceram incubadas em caixa de microaerofilia (com 5% de CO<sub>2</sub>) por 48 horas, antes da realização dos experimentos.



**Figura 2** – Fixação dos discos de titânio no anteparo plástico previamente fixado na tampa das placas de 24 poços (A). Vista superior de todos os discos fixados no anteparo plástico (B).



**Figura 3** –Discos de titânio em contato com suspensão bacteriana. Vista Superior (A) e Lateral (B).

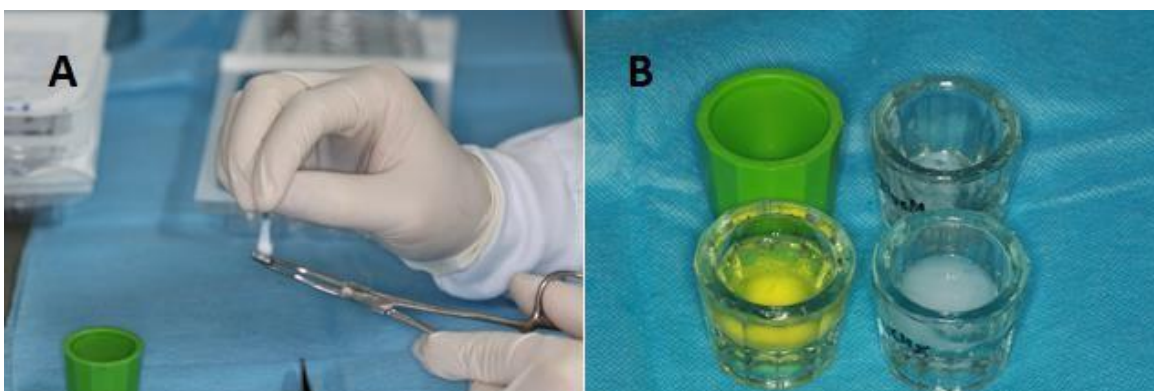
### 3.3 Descontaminação das amostras

Os discos contendo as colônias foram divididos de acordo com seu agente de descontaminação:

**Quadro 1** - Distribuição dos corpos de prova de acordo com os agentes de descontaminação.

<b>Discos</b>	• (1) Solução tampão fosfato-salino 1x (PBS)
<b>Microtopografia</b>	(n=6);
	• (2) Tetraciclina Pasta (50mg/ml) (n=6);
	• (3) BlueM <sup>®</sup> Gel (Peróxido de Hidrogênio) (n=6);
	• (4) Digluconato de Clorexidina Gel a 2% (n=6).

A execução da descontaminação foi padronizada para todos os agentes, sendo composta por movimentos ativos durante 60 segundos (30 segundos em cada face do disco) e utilizando hastes flexíveis com algodão estéril (Figura 4A). O tempo foi baseado em estudo prévio de Waal et al. (de Waal, Raghoobar et al. 2013). Anterior e posteriormente a etapa de aplicação dos agentes químicos, cada disco passou por um mergulho único com auxílio de pinça clínica em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x, 2 ml/poço.



**Figura 4** – Execução da descontaminação utilizando haste flexível com algodão (A) e Agentes de descontaminação dispensados em potes Dappen esterilizados (B).

Em continuidade ao segundo mergulho na solução PBS 1x, os discos foram dispensados individualmente em poços de novas placas contendo 2 ml/poço de meio de cultura caldo BHI Broth. Estas placas de 24 poços contendo os discos passaram por um processo de sonicagem durante 20 segundos para coletar as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) resistentes a descontaminação da superfície dos corpos de prova.

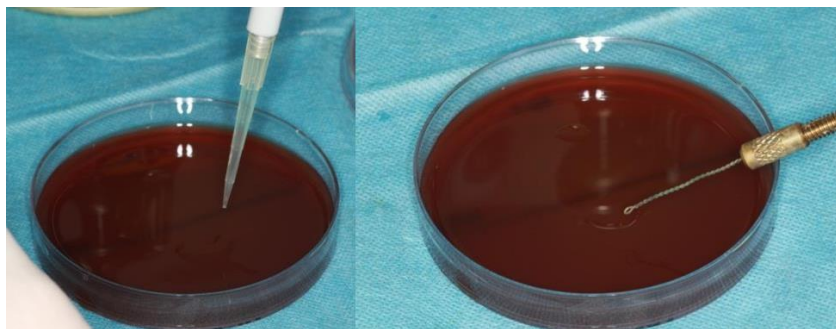


**Figura 5** – Mergulho único individual em solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x



**Figura 6** – Disposição dos discos em meio de cultura caldo BHI Broth (2ml/poço).

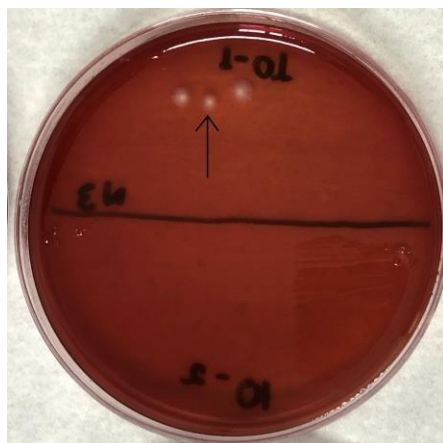
De cada poço contendo meio de cultura caldo BHI Broth foi coletado 200  $\mu$ l de suspensão e feitas duas diluições seriadas em placas de 96 poços, na concentração de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ . A partir das diluições, foram coletados 20  $\mu$ l de cada diluição e, então, semeados o conteúdo em placas de ágar BHI + sangue de carneiro 5% + hemina 1% previamente identificadas. Foram também coletados 20  $\mu$ l de inóculo dos poços em que se encontravam os discos, a fim de comprovar presença de colônias bacterianas no momento da descontaminação, e semeados em placas com ágar de mesma composição.



**Figura 7** – Coleta de 20 µl de suspensão e execução de semeadura em Placa de Ágar BHI.

As placas de ágar foram mantidas em caixas de microaerofilia (com 5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C por 5 dias, antes da contagem de UFC.

Através de análise visual das placas de ágar após o período de incubação, foi realizada uma análise quantitativa das UFC. Todas as análises foram realizadas por um mesmo examinador treinado e de forma triplicada, obtendo assim médias das Unidades encontradas em cada diluição.



**Figura 8** – Aspecto macroscópico de placa com Ágar BHI contendo Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (seta).

### 3.4 MEV e EDS

Para uma análise da morfologia foi usado um microscópio Tescan Vega3 LMU (Tescan, Brno, Czech Republic). A constituição elementar das amostras foi avaliada por energia dispersiva de raios X (EDX, Oxford Instruments, Abingdon). Essas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Das 24 amostras, foram selecionados 4 discos para os ensaios de MEV e EDS, sendo 1 representante de cada tipo de tratamento de descontaminação, de forma aleatória (Wheelis, Gindri et al. 2016). As micrografias avaliadas foram obtidas tanto por elétrons retroespalhados (BSE) quanto elétrons secundários (SE). A magnificação das imagens foi de 5 kx. Todas as imagens foram adquiridas utilizando um potencial de 10 kV. A análise das imagens se deu de forma visual, por um avaliador experiente, na procura de possíveis padrões de formação de oxidações, acidificação, e também abrasão da superfície. Os espectros de EDS foram obtidos utilizando uma energia de 0 até 5,5 keV. Foram adquiridos espectros EDS de três regiões aleatórias pontuais sobre a superfícies das amostras.

As amostras foram submetidas ao processo de descontaminação e na sequencia foram levadas para análise de MEV. Não foi realizado nenhum tipo de preparação de amostra para realização das imagens de microscopia e as obtenções de espectros de EDS.

### 3.5 Análise estatística

A análise estatística foi aplicada aos dados numéricos obtidos através da análise visual com auxílio do Programa GraphPad Prism (versão Prism 8 for Mac OS X, San Diego), adotando-se em todos os testes o nível de significância de

5% ( $\alpha=0,05$ ). Em primeiro momento foi aplicado teste para observar normalidade dos dados. Na sequência, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostras e caracterização das superfícies pré-contaminação

A caracterização dos discos utilizados no estudo foi realizada previamente e se encontra publicada na literatura (Apêndice 1) (Schwartz-Filho, Morandini et al. 2012). Resumidamente características da topografia das superfícies foram qualitativamente avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. A química de superfície foi estudada através de espectroscopia de dispersão de energia. Análises topográficas realizadas utilizando interferômetro óptico e microscopia de força atômica confirmaram a presença de microtopografia. O resultado mostrou que a sua modificação não resultou em alterações na composição química do material, que foi predominantemente titânio.

### 4.2 Aplicação dos antimicrobianos locais

Em estudo prévio (Oliveira 2019) comparou os efeitos da descontaminação de discos de titânio por 4 agentes químicos de descontaminação, determinando-se que, dentre os agentes testados, o mais efetivo foi o Digluconato de Clorexidina Gel 2%, o qual apresenta significativa capacidade de descontaminação (Apêndice 2). Dentre os limites metodológicos deste estudo, pode-se concluir que: O Digluconato de Clorexidina Gel a 2% foi superior aos outros tratamentos avaliados, em se tratando de superfícies de titânio

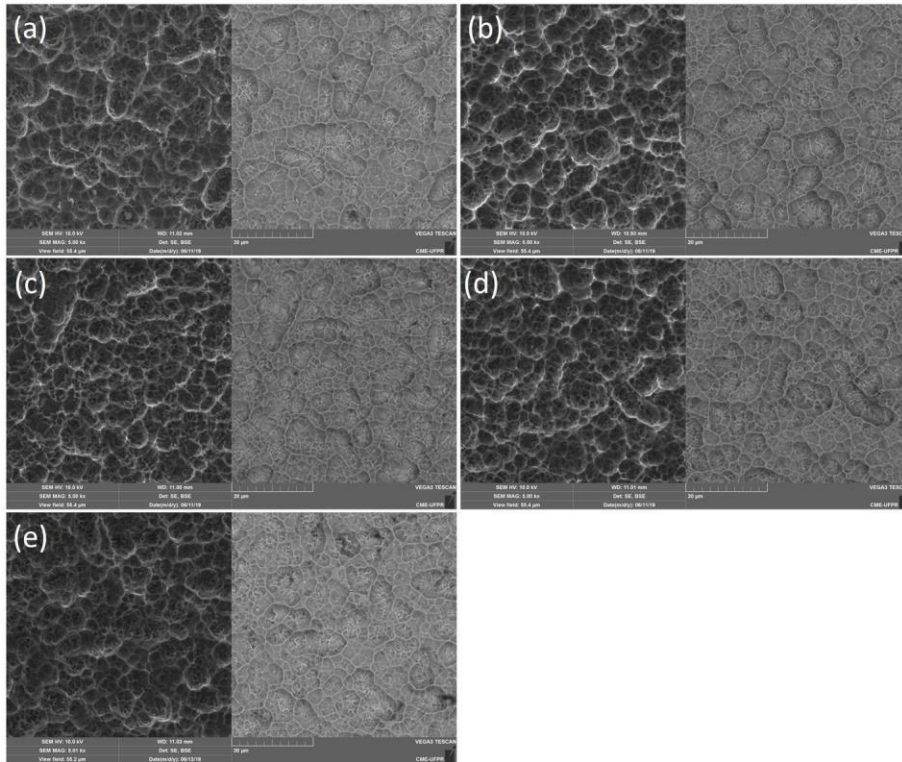
contaminadas por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, independente da rugosidade da superfície.

#### 4.3 MEV

Os resultados da MEV confirmaram a microtopografia de superfície apresentada pelos discos de titânio utilizados neste estudo, e não mostraram diferenças em relação a morfologia das superfícies após a descontaminação (formação de oxidações, acidificação, e abrasão da superfície). Conforme observado nas micrografias da figura 9, não é possível identificar diferenças significativas entre a morfologia das superfícies de titânio que passaram por tratamento de descontaminação, com relação à superfície de controle, tanto na imagem de elétrons secundários (SE) quanto na imagem de elétrons retroespalhados (BSE).

As imagens de elétrons retroespalhados (imagem da esquerda das micrografias representadas na figura 9) nota-se para todas as amostras uma grande superfície de densidade homogênea proveniente do retroespalhamento do feixe devido a superfície de titânio. Algumas regiões mais claras desta imagem refletem o fato das irregularidades da microtopografia.

Nas imagens de elétrons secundários (imagem da direita das micrografias representadas na figura 9) é possível observar uma grande similaridade da morfologia entre as amostras. Isso é esperado, pois o tratamento é exclusivamente químico sem efeitos abrasivos na superfície.



**Figura 9** - Micrografias das amostras utilizando elétrons retroespalhados (BSE), esquerda, e elétrons secundários (SE), direita. (a) Amostra controle, (b) PBS, (c) Tetraciclina, (d) BlueM®, (e) Clorexidina.

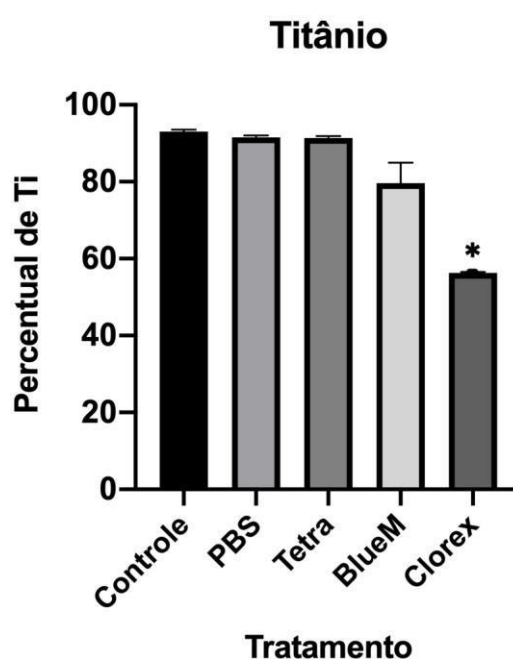
#### 4.4 EDS

A química de superfície foi estudada através de espectroscopia de dispersão de energia. A figura 10 apresenta o espectro de um ponto de cada amostra. Os valores de média e desvio-padrão de cada grupo são mostrados na tabela 01.



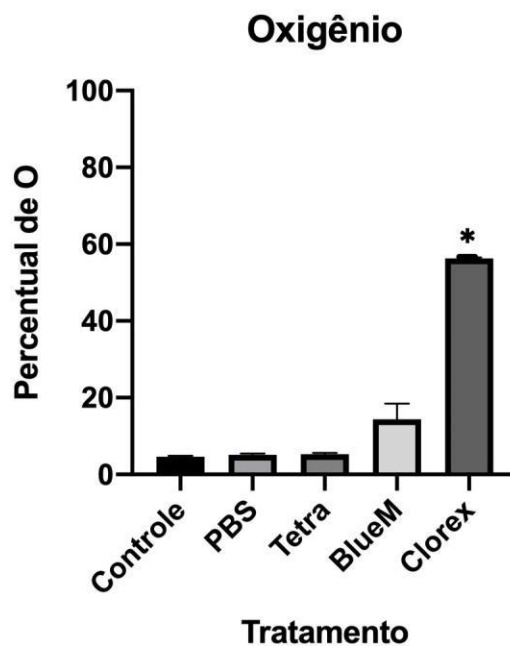
Com relação aos elementos químicos observados foi detectada a presença de Titânio, Oxigênio, Carbono, Flúor, Sílica e Cálcio.

Para o elemento Titânio foi observado que ele foi predominante em todas as amostras. Os resultados mostraram que a porcentagem de presença de Ti no grupo tratado com Clorexidina foi significativamente menor que os demais grupos.



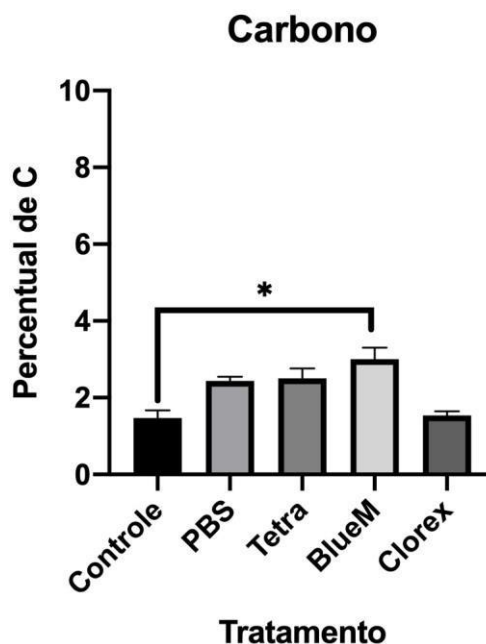
**Figura 11** – Percentual da presença do elemento Ti de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Valores com \* apresentam diferença estatisticamente significativas entre as médias, de acordo com o nível de significância de 5%.

Para o elemento Oxigênio os resultados mostraram que a porcentagem de presença de O foi significativamente maior no grupo tratado com Clorexidina que os demais grupos.



**Figura 12** – Percentual da presença do elemento O de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Valores com \* apresentam diferença estatisticamente significativas entre as médias, de acordo com o nível de significância de 5%.

Os resultados também mostraram a presença de Carbono. A porcentagem de C foi significativamente maior no grupo BlueM® quando comparado ao grupo controle.



**Figura 13** – Percentual da presença do elemento C de acordo com os agentes descontaminantes empregados. Análise estatística gerada com base nos espectros de EDS, considerando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Valores com \* apresentam diferença estatisticamente significativas entre as médias, de acordo com o nível de significância de 5%.

No grupo controle e no grupo tratado com CLX a presença de Sílica não foi observada. No entanto no grupo tratado com BlueM® foi observado uma presença maior do elemento químico.

Flúor e Cálcio apesar de presentes não tiveram variações consideráveis entre os grupos.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que métodos de descontaminação químicos causam alterações em superfícies de Ti. O percentual de presença de elementos como Ti, O, C, F, Si e Ca podem variar de acordo com os métodos aplicados na descontaminação. Tais modificações

podem ser importantes fatores para o sucesso do tratamento das peri-implantites.

Resultados prévios *in vitro* mostraram a capacidade de descontaminação da superfície com microtopografia em culturas de A.a. utilizando os mesmos agentes do presente estudo (Oliveira 2019). Nesse estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi possível observar via quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) que dentre os agentes descontaminantes, o mais efetivo foi o Digluconato de Clorexidina Gel 2% em todas as superfícies. Em cultura de bactérias, o nível de colônias formadas foi o mínimo para este tratamento.

Como forma de aprofundar o entendimento desse estudo de análise biológica, se fez necessária uma avaliação por meio de uma visão físico-química da superfície. Foi escolhida para esse fim a análise de EDS por se tratar de uma das técnicas mais referenciadas na literatura para análises de superfícies de materiais e determinação da sua composição química (Wheelis, Gindri et al. 2016). Além disso, considerando as amostras deste estudo, a técnica de EDS requer mínima preparação da amostra para a sua análise (Wilson, Valderrama et al. 2015, Tawse-Smith, Kota et al. 2016, Duddeck, Albrektsson et al. 2019, Berryman, Bridger et al. 2020, Kotsakis, Black et al. 2020, Matos, de Almeida et al. 2020). A microscopia eletrônica de varredura também é bastante consolidada para análises de superfícies. Neste trabalho a MEV torna-se interessante, pois além de observar a morfologia superficial, tal como a rugosidade de superfície, o que é importante para o processo de osseointegração, é possível avaliar danos corrosivos ou abrasivos causados pelos agentes descontaminantes ou pela

técnica de descontaminação (Tawse-Smith, Kota et al. 2016, Berryman, Bridger et al. 2020).

Os resultados obtidos pela MEV não mostraram diferenças em relação a morfologia das superfícies após a descontaminação. Esse resultado era esperado devido à natureza dos tratamentos propostos onde não existe uma ação mecânica mais efetiva que possa causar danos a superfície.

Com base nos dados de EDS, e também considerando análise estatística apresentada, foram possíveis a determinação do teor dos elementos químicos mais abundantes que estão presentes na superfície de cada uma das amostras e a significância estatística de cada média gerada associada a cada tratamento de descontaminação.

Analisando os dados para os teores percentuais de Ti em cada uma das amostras nota-se que este valor é o mais abundante da superfície para todas as amostras. Na amostra tratada com Clorexidina observa-se uma grande redução do nível percentual de Ti na superfície ao mesmo passo existe um aumento significativo dos níveis percentuais de O. Comparando este fato com análise microbiológica proposta em trabalhos prévios (Oliveira 2019, Matos, de Almeida et al. 2020), no qual o Digluconato de Clorexidina gel 2% apresenta menores unidades formadoras de colônia, esta superfície com alto grau de O pode ter configurado uma resposta química a qual facilitou a descontaminação da superfície.

Por base na técnica de EDS apenas não é possível afirmar que foi gerada uma fase cristalina de óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) mais densa para este agente descontaminante, devido a característica essencial da técnica, que é apenas de análise de elementos químicos, mas estudos apresentam que a quantidade de

formação de óxido de titânio, podem influenciar na desestabilização da molécula da bactéria (Kubacka, Diez et al. 2014, Koch and Manzhos 2017, Pantaroto, Ricomini-Filho et al. 2018, Souza, Lima et al. 2018, Kotsakis, Black et al. 2020). Além disso, o próprio efeito da clorexidina já é consolidado como uma técnica adjunta de descontaminação. Assim pode-se concluir que para o digluconato de clorexidina, dois mecanismos de descontaminação são gerados simultaneamente.

Observando o teor de C nas amostras, nota-se um acréscimo nos índices de C para os tratamentos por PBS, Tetraciclina e BlueM® com relação a amostra controle, sendo que no caso da amostra tratada com BlueM® os níveis de C apresentam variação estatisticamente significativa. De estudo prévio, provou-se que a utilização de PBS não foi suficiente para eliminar todas as UFCs da superfície (Oliveira 2019). Todavia, apresentou, no geral, resultados superiores se comparado ao grupo Tetraciclina Pasta e BlueM®. Isso é comprovado via rota físico-química, de acordo com os níveis apresentados de C para essas 3 amostras, considerando que a bactéria é essencialmente formada por C. Apesar disso a composição química da pasta de Tetraciclina e do gel BlueM® possuem C em sua composição, no primeiro no formato de amidoglicolato de sódio e no segundo sendo encontrado em diversos componentes da fórmula, exemplo álcool, ácido cítrico, glicerina. O que indica uma possível incompleta remoção dos produtos do agente descontaminante da superfície de titânio. Considerando o teor de C na amostra tratada por digluconato de clorexidina gel 2%, apesar de apresentar C na sua composição química, nota-se que os teores de C são semelhantes à amostra controle. Isso mostra que o digluconato de clorexidina foi eficiente não apenas para a remoção

do material orgânico como também não deixou resíduos remanescentes detectáveis ao nível de resolução do sistema de EDS, sugerindo uma remoção efetiva. Isso também é justificável devido a inobservância de Cl na composição química, pelo menos não para a escala de resolução do EDS.

Observando os níveis de Si nas amostras, percebe-se somente um valor estatisticamente significativo com relação às outras amostras para o tratamento com BlueM®. De acordo com o fabricante, o gel oral BlueM® (cód. OGI15) é composto pelos seguintes ingredientes: água, álcool, glicerina, sílica, sacarina de sódio, perborato de sódio, ácido cítrico, PEG-32, gluconato de sódio, lactoferrina, goma xantana, goma celulósica. Sua posologia indicada é de 3 aplicações diárias na região contaminada ou conforme orientação do cirurgião-dentista. A metodologia de aplicação nesse estudo pode justificar uma possível dificuldade na remoção completa do agente químico, o que justificaria a presença de Si na amostra.

Outros elementos como o Flúor e cálcio foram detectados no espectro de EDS, mas não tiveram diferença significativa entre as amostras.

Neste estudo foi definido que o desafio bacteriano utilizado para avaliar as terapias de descontaminação das superfícies de titânio por agentes químicos seria desenvolvido sob a forma de monoespécie de A.a. As bactérias foram cultivadas sobre as amostras de titânio por um período de 48 horas, tempo similar ao utilizado por trabalhos com propostas semelhantes ao presente estudo (Romeo, Ghisolfi et al. 2005, Makeeva and Tambovtseva 2014). Assim, nesse período temos contaminação bacteriana adequada para formação de biofilme monoespécie utilizado para os experimentos. (Burgers, Wittecy et al. 2012) De forma geral, resultados de estudos *in vitro* com biofilmes monoespécie podem

ser utilizados para interpretação de interações mais complexas de biofilmes *in vivo* (Burgers, Witecy et al. 2012).

Considerando-se a relação entre a superfície contaminada dos implantes e a necessidade do tratamento superficial para que ocorra a formação das estruturas de suporte e proteção dos implantes, a descontaminação se faz necessária (Meffert 1996). A descontaminação química envolve o uso localizado de substâncias antimicrobianas, tais como: clorexidina, tetraciclina ou minociclina, ácido cítrico, peróxido de hidrogênio, ácido fosfórico, entre outros (Subramani and Wismeijer 2012, Cortelli, Cortelli et al. 2013, Valderrama and Wilson 2013, Valderrama, Blansett et al. 2014). As comparações observando a eficácia de diferentes agentes químicos tem sido realizadas principalmente sob forma *in vitro* e sobre diferentes superfícies de implante (Mellado-Valero, Buitrago-Vera et al. 2013) e, embora existam diversos estudos realizando esta análise, ainda há incoerência sobre qual o melhor método de descontaminação a ser utilizado e a determinação de um padrão ouro para a desinfecção (Claffey, Clarke et al. 2008, Schwarz, Sahm et al. 2011).

Do ponto de vista clínico, considerando as limitações do método *in vitro*, os resultados ajudam a explicar possíveis causas de falhas e a dificuldade no tratamento da peri-implantite. Uma completa descontaminação passa pela diminuição do biofilme e também pela manutenção das características da superfície. O potencial de osseointegração e re-osseointegração são influenciados pela rugosidade e química da superfície (Subramani and Wismeijer 2012). Dentre os métodos de descontaminação avaliados nesse estudo, a Clorexidina se mostrou capaz de eliminar o biofilme, no entanto foi observado um aumento significativo da proporção de Ti e O. Outra consequência

importante deste resultado confere para digluconato de clorexidina uma possível vantagem para a formação da osseointegração. Pois fases de óxido de titânio e oxigênio, podem contribuir de forma positiva para a formação de uma camada de hidroxiapatita fortemente ligada ao substrato de óxido de titânio (Kokubo, Miyaji et al. 1996, Delgado-Ruiz and Romanos 2018, Pantaroto, Ricomini-Filho et al. 2018). Para os outros tratamentos, os níveis de O permaneceram muito próximos do valor de O da amostra controle.

Outros estudos associando técnicas mecânicas, químicas e estudos in vivo são de fundamental importância para a aplicação e confirmação da efetividade dos tratamentos para a peri-implantite.

## **6. CONCLUSÕES**

Os agentes de descontaminação química (PBS, Tetraciclina, BlueM®, Clorexidina) não causaram alterações qualitativas na morfologia da superfície observadas na MEV.

Dentre as amostras estudadas a tratada com BlueM® apresentou Si como elemento residual após a descontaminação.

O percentual de presença de elementos como Ti, O, C, F, Si e Ca podem variar de acordo com os métodos aplicados na descontaminação. A descontaminação com digluconato de clorexidina gel a 2% diminui o percentual de Ti e aumenta o de teor de O.

## 7. REFERÊNCIAS

- Al-Hashedi, A. A., M. Laurenti, V. Benhamou and F. Tamimi (2017). "Decontamination of titanium implants using physical methods." Clin Oral Implants Res **28**(8): 1013-1021.
- Albrektsson, T. and A. Wennerberg (2005). "The impact of oral implants - past and future, 1966-2042." J Can Dent Assoc **71**(5): 327.
- Albrektsson, T. and A. Wennerberg (2019). "On osseointegration in relation to implant surfaces." Clin Implant Dent Relat Res **21 Suppl 1**: 4-7.
- Albrektsson, T. O., C. B. Johansson and L. Sennerby (1994). "Biological aspects of implant dentistry: osseointegration." Periodontol 2000 **4**: 58-73.
- Amarasinghe, J. J., F. A. Scannapieco and E. M. Haase (2009). "Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation." Infect Immun **77**(7): 2896-2907.
- Berryman, Z., L. Bridger, H. M. Hussaini, A. M. Rich, M. Atieh and A. Tawse-Smith (2020). "Titanium particles: An emerging risk factor for peri-implant bone loss." Saudi Dent J **32**(6): 283-292.
- Brookshire, F. V., W. W. Nagy, V. B. Dhuru, G. J. Ziebert and S. Chada (1997). "The qualitative effects of various types of hygiene instrumentation on commercially pure titanium and titanium alloy implant abutments: an in vitro and scanning electron microscope study." J Prosthet Dent **78**(3): 286-294.
- Burgers, R., C. Witte, S. Hahnel and M. Gosau (2012). "The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*." Arch Oral Biol **57**(7): 940-947.
- Caton, J. G., G. Armitage, T. Berglundh, I. L. C. Chapple, S. Jepsen, K. S. Kornman, B. L. Mealey, P. N. Papapanou, M. Sanz and M. S. Tonetti (2018). "A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification." J Periodontol **89 Suppl 1**: S1-S8.
- Charalampakis, G. and G. N. Belibasakis (2015). "Microbiome of peri-implant infections: lessons from conventional, molecular and metagenomic analyses." Virulence **6**(3): 183-187.
- Claffey, N., E. Clarke, I. Polyzois and S. Renvert (2008). "Surgical treatment of peri-implantitis." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 316-332.

Cortelli, S. C., J. R. Cortelli, H. Shang, J. A. McGuire and C. A. Charles (2013). "Long-term management of plaque and gingivitis using an alcohol-free essential oil containing mouthrinse: a 6-month randomized clinical trial." Am J Dent **26**(3): 149-155.

de Waal, Y. C., G. M. Raghoobar, J. J. Huddleston Slater, H. J. Meijer, E. G. Winkel and A. J. van Winkelhoff (2013). "Implant decontamination during surgical peri-implantitis treatment: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." J Clin Periodontol **40**(2): 186-195.

Delgado-Ruiz, R. and G. Romanos (2018). "Potential Causes of Titanium Particle and Ion Release in Implant Dentistry: A Systematic Review." Int J Mol Sci **19**(11).

Derks, J., C. Tomasi, J. L. Wennstrom and T. Berglundh (2015). "Response to Letter to the Editor, "Effectiveness of Implant Therapy Analyzed in a Swedish Population: Early and Late Implant Loss"." J Dent Res **94**(9 Suppl): 234S.

Duddeck, D. U., T. Albrektsson, A. Wennerberg, C. Larsson and F. Beuer (2019). "On the Cleanliness of Different Oral Implant Systems: A Pilot Study." J Clin Med **8**(9).

Faveri, M., L. C. Figueiredo, J. A. Shibli, P. J. Perez-Chaparro and M. Feres (2015). "Microbiological diversity of peri-implantitis biofilms." Adv Exp Med Biol **830**: 85-96.

Freire, M. O., P. P. Sedghizadeh, C. Schaudinn, A. Gorur, J. S. Downey, J. H. Choi, W. Chen, J. K. Kook, C. Chen, S. D. Goodman and H. H. Zadeh (2011). "Development of an animal model for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm-mediated oral osteolytic infection: a preliminary study." J Periodontol **82**(5): 778-789.

Heitz-Mayfield, L. J., M. Aaboe, M. Araujo, J. B. Carrion, R. Cavalcanti, N. Cionca, D. Cochran, I. Darby, E. Funakoshi, P. C. Gierthmuehlen, D. Hashim, L. Jahangiri, Y. Kwon, F. Lambert, D. M. Layton, E. R. Lorenzana, G. McKenna, A. Mombelli, F. Muller, M. Rocuzzo, G. E. Salvi, M. Schimmel, M. Srinivasan, C. Tomasi and A. Yeo (2018). "Group 4 ITI Consensus Report: Risks and biologic complications associated with implant dentistry." Clin Oral Implants Res **29** **Suppl 16**: 351-358.

Heitz-Mayfield, L. J. and N. P. Lang (2004). "Antimicrobial treatment of peri-implant diseases." Int J Oral Maxillofac Implants **19** **Suppl**: 128-139.

Heitz-Mayfield, L. J. and N. P. Lang (2010). "Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis." Periodontol 2000 **53**: 167-181.

Heitz-Mayfield, L. J. and A. Mombelli (2014). "The therapy of peri-implantitis: a systematic review." Int J Oral Maxillofac Implants **29** **Suppl**: 325-345.

Jimbo, R., J. Sotres, C. Johansson, K. Breiding, F. Currie and A. Wennerberg (2012). "The biological response to three different nanostructures applied on smooth implant surfaces." Clin Oral Implants Res **23**(6): 706-712.

Koch, D. and S. Manzhos (2017). "On the Charge State of Titanium in Titanium Dioxide." J Phys Chem Lett **8**(7): 1593-1598.

Kokubo, T., F. Miyaji, H.-M. Kim and T. Nakamura (1996). "Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals." Journal of the American Ceramic Society **79**(4): 1127-1129.

Kotsakis, G. A., R. Black, J. Kum, L. Berbel, A. Sadr, I. Karoussis, M. Simopoulou and D. Daubert (2020). "Effect of implant cleaning on titanium particle dissolution and cytocompatibility." J Periodontol.

Kubacka, A., M. S. Diez, D. Rojo, R. Bargiela, S. Ciordia, I. Zapico, J. P. Albar, C. Barbas, V. A. Martins dos Santos, M. Fernandez-Garcia and M. Ferrer (2014). "Understanding the antimicrobial mechanism of TiO<sub>2</sub>-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium." Sci Rep **4**: 4134.

Lang, N. P., T. G. Wilson and E. F. Corbet (2000). "Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment." Clin Oral Implants Res **11 Suppl 1**: 146-155.

Lindhe, J., J. Meyle and D. o. E. W. o. P. Group (2008). "Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology." J Clin Periodontol **35**(8 Suppl): 282-285.

Listgarten, M. A. (1997). "Clinical trials of endosseous implants: issues in analysis and interpretation." Ann Periodontol **2**(1): 299-313.

Makeeva, I. M. and N. V. Tambovtseva (2014). "[Applying toothpaste and mouthwash BLUEM in complex oral care in patients with coronary heart disease]." Stomatologiya (Mosk) **93**(3): 18-20.

Matos, A. O., A. B. de Almeida, T. Beline, C. C. Tonon, R. C. V. Casarin, L. J. Windsor, S. Duarte, F. H. Nociti, Jr., E. C. Rangel, R. L. Gregory and V. A. R. Barao (2020). "Synthesis of multifunctional chlorhexidine-doped thin films for titanium-based implant materials." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **117**: 111289.

Meffert, R. M. (1996). "Guided tissue regeneration/guided bone regeneration: a review of the barrier membranes." Pract Periodontics Aesthet Dent **8**(2): 142-144.

Meffert, R. M., B. Langer and M. E. Fritz (1992). "Dental implants: a review." J Periodontol **63**(11): 859-870.

Mellado-Valero, A., P. Buitrago-Vera, M. F. Sola-Ruiz and J. C. Ferrer-Garcia (2013). "Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **18**(6): e869-876.

Mohanty, R., P. S. Sudan, A. M. Dharamsi, R. Mokashi, A. L. Misurya and P. Kaushal (2018). "Risk Assessment in Long-term Survival Rates of Dental Implants: A Prospective Clinical Study." J Contemp Dent Pract **19**(5): 587-590.

Mombelli, A. and N. P. Lang (1998). "The diagnosis and treatment of peri-implantitis." Periodontol 2000 **17**: 63-76.

Mombelli, A., M. A. van Oosten, E. Schurch, Jr. and N. P. Land (1987). "The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants." Oral Microbiol Immunol **2**(4): 145-151.

Mouhyi, J., D. M. Dohan Ehrenfest and T. Albrektsson (2012). "The peri-implantitis: implant surfaces, microstructure, and physicochemical aspects." Clin Implant Dent Relat Res **14**(2): 170-183.

Novaes, A. B., Jr., S. L. de Souza, R. R. de Barros, K. K. Pereira, G. Iezzi and A. Piattelli (2010). "Influence of implant surfaces on osseointegration." Braz Dent J **21**(6): 471-481.

Oliveira, E. H. d. S. (2019). Avaliação de Agentes Químicos na descontaminação de superfícies de titânio. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

Pantaroto, H. N., A. P. Ricomini-Filho, M. M. Bertolini, J. H. Dias da Silva, N. F. Azevedo Neto, C. Sukotjo, E. C. Rangel and V. A. R. Barao (2018). "Antibacterial photocatalytic activity of different crystalline TiO<sub>2</sub> phases in oral multispecies biofilm." Dent Mater **34**(7): e182-e195.

Papalexidou, V., A. B. Novaes, Jr., M. F. Grisi, S. S. Souza, M. Taba, Jr. and J. K. Kajiwarra (2004). "Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study." Clin Oral Implants Res **15**(1): 44-53.

Park, J. H., R. Olivares-Navarrete, R. E. Baier, A. E. Meyer, R. Tannenbaum, B. D. Boyan and Z. Schwartz (2012). "Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response." Acta Biomater **8**(5): 1966-1975.

Parma-Benfenati, S., M. Roncati, P. Galletti and C. Tinti (2015). "Peri-implantitis Treatment with a Regenerative Approach: Clinical Outcomes on Reentry." Int J Periodontics Restorative Dent **35**(5): 625-636.

Patel, R. (2005). "Biofilms and antimicrobial resistance." Clin Orthop Relat Res(437): 41-47.

Quiryneen, M., R. Vogels, M. Pauwels, A. D. Haffajee, S. S. Socransky, N. G. Uzel and D. van Steenberghe (2005). "Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets." J Dent Res **84**(4): 340-344.

Rocuzzo, M., F. Bonino, L. Bonino and P. Dalmaso (2011). "Surgical therapy of peri-implantitis lesions by means of a bovine-derived xenograft: comparative results of a prospective study on two different implant surfaces." J Clin Periodontol **38**(8): 738-745.

Romeo, E., M. Ghisolfi, N. Murgolo, M. Chiapasco, D. Lops and G. Vogel (2005). "Therapy of peri-implantitis with resective surgery. A 3-year clinical trial on rough screw-shaped oral implants. Part I: clinical outcome." Clin Oral Implants Res **16**(1): 9-18.

Roos-Jansaker, A. M., C. Lindahl, G. R. Persson and S. Renvert (2011). "Long-term stability of surgical bone regenerative procedures of peri-implantitis lesions in a prospective case-control study over 3 years." J Clin Periodontol **38**(6): 590-597.

Roos-Jansaker, A. M., C. Lindahl, H. Renvert and S. Renvert (2006). "Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part I: implant loss and associations to various factors." J Clin Periodontol **33**(4): 283-289.

Roos-Jansaker, A. M., C. Lindahl, H. Renvert and S. Renvert (2006). "Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions." J Clin Periodontol **33**(4): 290-295.

Roos-Jansaker, A. M., H. Renvert, C. Lindahl and S. Renvert (2006). "Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions." J Clin Periodontol **33**(4): 296-301.

Ryu, H. S., Y. I. Kim, B. S. Lim, Y. J. Lim and S. J. Ahn (2015). "Chlorhexidine Uptake and Release From Modified Titanium Surfaces and Its Antimicrobial Activity." J Periodontol **86**(11): 1268-1275.

Schenk, G., T. F. Flemmig, T. Betz, J. Reuther and B. Klaiber (1997). "Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series." Clin Oral Implants Res **8**(5): 427-433.

Schou, S., T. Berglundh and N. P. Lang (2004). "Surgical treatment of peri-implantitis." Int J Oral Maxillofac Implants **19** **Suppl**: 140-149.

Schwartz-Filho, H. O., A. C. Morandini, E. S. Ramos-Junior, R. Jimbo, C. F. Santos, E. Marcantonio, Jr., A. Wennerberg and R. A. Marcantonio (2012). "Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts." J Biomed Mater Res A **100**(10): 2629-2636.

- Schwarz, F., J. Derks, A. Monje and H. L. Wang (2018). "Peri-implantitis." J Periodontol **89 Suppl 1**: S267-S290.
- Schwarz, F., G. John, A. Schmucker, N. Sahm and J. Becker (2017). "Combined surgical therapy of advanced peri-implantitis evaluating two methods of surface decontamination: a 7-year follow-up observation." J Clin Periodontol **44**(3): 337-342.
- Schwarz, F., E. Nuesry, K. Bieling, M. Herten and J. Becker (2006). "Influence of an erbium, chromium-doped yttrium, scandium, gallium, and garnet (Er,Cr:YSGG) laser on the reestablishment of the biocompatibility of contaminated titanium implant surfaces." J Periodontol **77**(11): 1820-1827.
- Schwarz, F., N. Sahm, I. Mihatovic, V. Golubovic and J. Becker (2011). "Surgical therapy of advanced ligature-induced peri-implantitis defects: cone-beam computed tomographic and histological analysis." J Clin Periodontol **38**(10): 939-949.
- Schwarz, F., A. Sculean, G. Romanos, M. Herten, N. Horn, W. Scherbaum and J. Becker (2005). "Influence of different treatment approaches on the removal of early plaque biofilms and the viability of SAOS2 osteoblasts grown on titanium implants." Clin Oral Investig **9**(2): 111-117.
- Sousa, V., N. Mardas, D. Spratt, D. Boniface, M. Dard and N. Donos (2016). "Experimental models for contamination of titanium surfaces and disinfection protocols." Clin Oral Implants Res **27**(10): 1233-1242.
- Souza, J. G. S., C. V. Lima, B. E. Costa Oliveira, A. P. Ricomini-Filho, M. Faveri, C. Sukotjo, M. Feres, A. A. Del Bel Cury and V. A. R. Barao (2018). "Dose-response effect of chlorhexidine on a multispecies oral biofilm formed on pure titanium and on a titanium-zirconium alloy." Biofouling **34**(10): 1175-1184.
- Speelman, J. A., B. Collaert and B. Klinge (1992). "Evaluation of different methods to clean titanium abutments. A scanning electron microscopic study." Clin Oral Implants Res **3**(3): 120-127.
- Subramani, K. and D. Wismeijer (2012). "Decontamination of titanium implant surface and re-osseointegration to treat peri-implantitis: a literature review." Int J Oral Maxillofac Implants **27**(5): 1043-1054.
- Suh, J. J., Z. Simon, Y. S. Jeon, B. G. Choi and C. K. Kim (2003). "The use of implantoplasty and guided bone regeneration in the treatment of peri-implantitis: two case reports." Implant Dent **12**(4): 277-282.
- Tawse-Smith, A., A. Kota, Y. Jayaweera, W. J. Vuuren and S. Ma (2016). "The effect of standardised implantoplasty protocol on titanium surface roughness: an in-vitro study." Braz Oral Res **30**(1): e137.

Tonetti, M. S., G. P. Prato and P. Cortellini (1996). "Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery." J Clin Periodontol **23**(6): 548-556.

Valderrama, P., J. A. Blansett, M. G. Gonzalez, M. G. Cantu and T. G. Wilson (2014). "Detoxification of Implant Surfaces Affected by Peri-Implant Disease: An Overview of Non-surgical Methods." Open Dent J **8**: 77-84.

Valderrama, P. and T. G. Wilson, Jr. (2013). "Detoxification of implant surfaces affected by peri-implant disease: an overview of surgical methods." Int J Dent **2013**: 740680.

Wennerberg, A., T. Albrektsson and B. Chrcanovic (2018). "Long-term clinical outcome of implants with different surface modifications." Eur J Oral Implantol **11 Suppl 1**: S123-S136.

Wheelis, S. E., I. M. Gindri, P. Valderrama, T. G. Wilson, Jr., J. Huang and D. C. Rodrigues (2016). "Effects of decontamination solutions on the surface of titanium: investigation of surface morphology, composition, and roughness." Clin Oral Implants Res **27**(3): 329-340.

Wilson, T. G., Jr., P. Valderrama, M. Burbano, J. Blansett, R. Levine, H. Kessler and D. C. Rodrigues (2015). "Foreign bodies associated with peri-implantitis human biopsies." J Periodontol **86**(1): 9-15.

Zablotsky, M. (1993). "HA coatings in implant dentistry: hype, hysteria, or clinical reality?" J Dent Symp **1**: 70-72.

Zablotsky, M., R. Meffert, O. Mills, A. Burgess and D. Lancaster (1992). "The macroscopic, microscopic and spectrometric effects of various chemotherapeutic agents on the plasma-sprayed hydroxyapatite-coated implant surface." Clin Oral Implants Res **3**(4): 189-198.

## 8. Apêndice

### 1. Apêndice 01:

Caracterização das amostras.

Descrição numérica da topografia superficial obtida por interferômetro ótico ao nível micrométrico (n = 3).

	$S_a \mu\text{m}$	$S_{ds} / \text{mm}^2$	$S_{dr} \%$
Micro	$0.28 \pm 0.5 (3)$	$195,900 \pm 9,838 (3)$	$10.87 \pm 1.06 (3)$

Publicado em:

Schwartz-Filho, H. O., A. C. Morandini, E. S. Ramos-Junior, R. Jimbo, C. F. Santos, E. Marcantonio, Jr., A. Wennerberg and R. A. Marcantonio (2012). "Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblasts." J Biomed Mater Res A 100(10): 2629-2636.

## 2. Apêndice 02:

Média e Desvio-padrão do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) [x10<sup>-1</sup>] encontradas em cada superfície após descontaminação.

DISCOS	USINADOS (U)	MICROTOPOGRAFIA (M)	MICRO + NANOTOPOGRAFIA (N)
AGENTE DE DESCONTAMINAÇÃO			
PBS 1x	0,2 ± 0,45 <sup>B</sup>	1,87±2,63	0,40±0,55
Tetraciclina Pasta (50 mg/ml)	2,4 ± 2,88	1,40 ± 1,14	1,40 ± 1,14
BlueM <sup>®</sup> Gel	10,27 ± 11,76 <sup>AB</sup>	8,73±7,88 <sup>A</sup>	3,13±2,22 <sup>A</sup>
Digluconato de Clorexidina Gel 2%	0±0 <sup>A</sup>	0±0 <sup>A</sup>	0±0 <sup>A</sup>

Significante se  $p < 0.05$ . Letras diferentes nas colunas representam diferenças significantes entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis, Dunn ( $P < 0,05$ )).

Publicado em:

Oliveira, E. H. d. S. (2019). Avaliação de Agentes Químicos na descontaminação de superfícies de titânio. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.