

**MINISTÉRIO DA DEFESA  
EXÉRCITO BRASILEIRO  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**ADRIANA MARCELA LOBATO ROCHA**

**TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM ÓXIDOS DE GRAFENO  
E COBRE PARA USO EM PRÓTESES IMPLANTOSSUPOORTADAS**

**RIO DE JANEIRO  
2023**

ADRIANA MARCELA LOBATO ROCHA

TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE DO TITÂNIO COM ÓXIDOS DE  
GRAFENO E COBRE PARA USO EM PRÓTESES  
IMPLANTOSSUPORTADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia,  
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre  
em Ciência dos Materiais.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias, Ph.D.

Rio de Janeiro

2023

©2023

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador(es).

Rocha, Adriana Marcela Lobato.

Tratamento da superfície do Titânio com óxidos de grafeno e cobre para uso em próteses implantossuportadas / Adriana Marcela Lobato Rocha. – Rio de Janeiro, 2023.

84 f.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias.

Dissertação (mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Ciência dos Materiais, 2023.

1. pilar. 2. titânio. 3. óxido de cobre. 4. óxido de grafeno. 5. antimicrobianos.  
i. Elias, Carlos Nelson (orient.) ii. Título

**ADRIANA MARCELA LOBATO ROCHA**

**Tratamento da superfície do Titânio com óxidos de grafeno e cobre para uso em próteses implantossuportadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Orientador(es): Carlos Nelson Elias.

Aprovada em 10 fevereiro de 2023, pela seguinte banca examinadora:



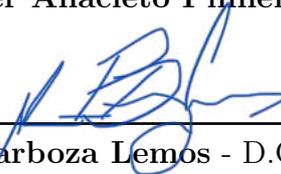
---

Prof. **Carlos Nelson Elias** - D.C. do IME - Presidente



---

Cel **Wagner Anacleto Pinheiro** - D.C. do IME



---

Prof. **Alexandre Barboza Lemos** - D.C. da são Leopoldo Mandic

Rio de Janeiro  
2023

*Meu orgulho especial em dedicar esse trabalho ao meu amor e marido, DANIEL DE SOUZA, e ao meu filho amado, VINÍCIUS LOBATO ROCHA DE SOUZA. Agradeço, com muito carinho, a credibilidade e a paciência que tiveram nesta etapa de minha vida, a qual em muitos momentos privei-os de minha companhia. Aos meus queridos pais, IVANHOÉ DE OLIVEIRA ROCHA e DINÁ MARIA LOBATO ROCHA, e ao meu irmão, IVANHOÉ LOBATO ROCHA, que sempre acreditaram em minha capacidade para chegar até aqui. Obrigada por me apoiarem e por estarem ao meu lado nas horas mais difíceis. Obrigada pela força e pela garra que me proporcionam quando desanimado. Minha família, obrigada por fazerem parte de minha vida e de minhas vitórias.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço com muito carinho ao professor CARLOS NELSON ELIAS pela dedicação, paciência e muita atenção ao orientar este trabalho. Elogios são poucos para representar a grandiosidade desse mestre. Muito obrigada pela vontade de ensinar e ajudar nas horas difíceis, sempre com muita humildade.

Aos professores do curso de pós-graduação, Cel WAGNER, Cel ALAELSON, Cel SOUSA LIMA, Cap CLARA LUZ, SERGIO NEVES, MARCELO PRADO, BEN-HUR, DI BIASI, LUIZ CARLOS e VALDIR, que com muito trabalho conseguiram me ensinar e passar suas vivências e seus conhecimentos na área de materiais.

Ao professor VIRGÍLIO DE CARVALHO DOS ANJOS, do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG), pela gentileza, dedicação e paciência para a realização de ensaios importantes para este trabalho.

À professora ELIZABETH FERREIRA MARTINEZ, da Divisão de Biologia Celular e Molecular da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas, SP), pela realização de ensaios bacteriológicos. Agradeço pela disponibilidade e atenção.

Ao professor ALEXANDRE BARBOZA LEMOS, Cel do Corpo de Bombeiros do Estado do Rio de Janeiro, obrigada pelas dicas e considerações durante a avaliação de meu trabalho.

É com eterna gratidão meu agradecimento aos pós-doutorandos FRANCIELLY MOURA DE SOUZA SOARES e GUILHERME MONTEIRO TORELLY por terem feito desses meses os mais produtivos. Fizeram-se presentes em horas muito especiais, ajudando-me no aprimoramento e aperfeiçoamento de meus estudos laboratoriais para que pudesse concluir mais essa jornada.

À Cap CAROLINE JOVINE BOUÇAS GUIMARÃES, da Seção de Tecnologia de Materiais de Carbono do Centro Tecnológico do Exército (Rio de Janeiro, RJ), pela disponibilidade e atenção ao realizar ensaios em sua unidade, tão essenciais para este trabalho.

À amiga HAZEL PALOMA REIS CORADO que me incentivou a trabalhar com grafeno e cobre, me ensinando as etapas laboratoriais para início e conclusão deste trabalho. Uma grande parceira, alegre, dinâmica e repleta de ideias.

Muito obrigada aos meus companheiros de farda, Major ANDRÉ AGUIAR MARQUES e Cap ANA KARINE ROCHA DE ANDRADE NATTRODT, pela amizade, estudos coletivos, incentivo nas horas difíceis e conversas agradáveis.

Ao prezado ALESSANDRO BRITO THOMAZ pela parceria, presteza, ajuda e

carinho na realização de ensaios em sua cidade de residência, Juiz de Fora/MG.

À querida Ten ARIANY ANTUNES FREITAS MARTINS pela ajuda mútua, amizade e companheirismo.

Ao doutorando RAPHAEL HENRIQUE MORAIS REIS pelas explicações na disciplina de Ciência dos Materiais. Sua ajuda foi fundamental para o êxito da missão.

Aos colegas TITO MAGNO LAVORATO e ROBERTO HIRSCH MONTEIRO meu sincero agradecimento pela ajuda no LATEX. Foi essencial para o término deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Biomateriais, BRUNO, DYANNI, IVI, KÉSIA, LARISSA, LUIS MIGUEL, MANUELA, MARCOS PAULO, MARVIN, NATHÁLIA e THAYS pelos momentos que passamos juntos, estudando, aprendendo e ensinando. Cada um de vocês contribuiu muito para meu sucesso.

*“Somos frutos dos seus esforços e exemplos,  
nos quais nos espelhamos e buscamos força,  
apoio e coragem para continuar crescendo sempre.”*

## RESUMO

Um dos fatores que promove problemas no implante dentário, como a peri-implantite, é a perda óssea devido a infiltração bacteriana através da lacuna entre o pilar e o tecido mole. É importante o desenvolvimento de superfícies dos componentes protéticos com característica que induza a adesão dos tecidos moles e iniba a infiltração bacteriana ou o uso de revestimento com atividade antimicrobiana. Partículas de cobre (Cu) e grafeno (G) possuem propriedades antibacterianas. A atividade do Cu é baseada nas alterações do metabolismo das bactérias mediante modificações na membrana celular e fragmentando o DNA. O G promove danos à membrana celular e perda do citoplasma. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma metodologia de eletrodeposição de submicropartículas de óxido de cobre I (Cu<sub>2</sub>OSMPs) e óxido de grafeno (GO) na superfície de pilar de titânio (Ti grau 5) usado em próteses implantossuportadas. Soluções aquosas com 0,5mg/ml de Cu<sub>2</sub>OSMPs e 1,0mg/ml de GO foram usadas como eletrólitos. As amostras foram divididas em 4 grupos com base na composição da deposição: G1 (revestimento de Cu<sub>2</sub>O); G2 (revestimento de GO); G3 (revestimento de GO+Cu<sub>2</sub>O) e G4 (sem revestimento). Para definir um parâmetro de eletrodeposição de Cu<sub>2</sub>O, o grupo 1 foi subdividido em 4 com base na voltagem e tempo: G1.5.15 (5V, 15 min); G1.7.15 (7V, 15 min); G1.9.15 (9V, 15 min) e G1.9.20 (9V, 20 min). Da mesma forma, a fim de verificar a melhor sequência de deposição, o grupo 3 foi subdividido em dois: G3.Cu.GO (deposição de Cu<sub>2</sub>O seguido de GO) e G3.GO.Cu (deposição de GO seguido de Cu<sub>2</sub>O). Foram avaliadas as morfologias das amostras por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a composição química pela espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS), a presença de grupos funcionais relacionados aos revestimentos através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), a avaliação da eletrodeposição de GO por meio da espectroscopia Raman, a rugosidade e a molhabilidade. Comparou-se também a viabilidade bacteriana nas superfícies dos pilares com revestimentos de Cu<sub>2</sub>O (G1) e de GO (G2) através do ensaio qualitativo *live/dead*. Os resultados mostraram que a eletrodeposição de Cu<sub>2</sub>OSMPs com 5V durante 15 min (G1.5.15) permitiu obter uma superfície mais homogênea e em maior percentual de SMPs. A sequência de deposição de G3.GO.Cu foi a que apresentou a maior concentração tanto de GO como de Cu<sub>2</sub>O. Obteve-se para parâmetro de rugosidade Ra um valor médio menor que 0,4  $\mu$ m em todas os quatro grupos, o que permite um melhor selamento da mucosa e minimiza a peri-implantite. As médias dos ângulos de contato indicam um comportamento mais hidrofílico para a superfície sem revestimento ( $57,7 \pm 9,72$ ), sendo esta mais adequada para a adesão de fibroblastos e organização das fibras colágenas. Em contrapartida, a amostra com deposição apenas de Cu<sub>2</sub>O ( $88,3 \pm 4,89$ ) foi a que apresentou menor hidroflicidade, sendo a mais indicada para o revestimento do pilar que objetiva o efeito bactericida. No ensaio de viabilidade bacteriana, a superfície do Ti com GO (G2) permitiu maior adesão de cepas de *S. mutans*, bem como apresentou maior número de bactérias mortas comparativamente ao grupo com Cu<sub>2</sub>O (G1).

**Palavras-chave:** pilar. titânio. óxido de cobre. óxido de grafeno. antimicrobianos.

## ABSTRACT

One of the factors that promote dental implant problems, such as peri-implantitis, is bone loss due to bacterial infiltration through the gap between the abutment and the soft tissue. It is important to develop surfaces of prosthetic components with characteristics that induce soft tissue adhesion and inhibit bacterial infiltration or the use of a coating with antimicrobial activity. Copper (Cu) and graphene (G) particles have antibacterial properties. The activity of Cu is based on changes in the metabolism of bacteria through changes in the cell membrane and fragmenting DNA. G promotes damage to the cell membrane and loss of cytoplasm. The objective of the present work was to develop a methodology for the electrodeposition of submicroparticles of copper oxide I ( $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ ) and graphene oxide (GO) on the surface of a titanium pillar (Ti grade 5) used in implant-supported prostheses. Aqueous solutions with 0.5mg/ml of  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  and 1.0mg/ml of GO were used as electrolytes. Samples were divided into 4 groups based on deposition composition: G1 ( $\text{Cu}_2\text{O}$  coating); G2 (GO coating); G3 (GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$  coating) and G4 (no coating). To define a  $\text{Cu}_2\text{O}$  electrodeposition parameter, group 1 was subdivided into 4 based on voltage and time: G1.5.15 (5V, 15 min); G1.7.15 (7V, 15 min); G1.9.15 (9V, 15 min) and G1.9.20 (9V, 20 min). Likewise, in order to verify the best sequence of deposition, group 3 was divided into two: G3.Cu.GO (deposition of  $\text{Cu}_2\text{O}$  followed by GO) and G3.GO.Cu (deposition of GO followed by  $\text{Cu}_2\text{O}$ ). The morphologies of the samples were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), the chemical composition by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), the presence of functional groups related to the coatings by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), the evaluation of GO electrodeposition through Raman spectroscopy, roughness and wettability. Bacterial viability on the surfaces of pillars coated with  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1) and GO (G2) was also compared using the qualitative test live/dead. The results showed that the electrodeposition of  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  with 5V for 15 min (G1.5.15) allowed obtaining a more homogeneous surface and a higher percentage of SMPs. The G3.GO.Cu deposition sequence showed the highest concentration of both GO and  $\text{Cu}_2\text{O}$ . EDS and FTIR proved, respectively, the compositions and vibrations of chemical bonds of the coatings. Raman spectroscopy confirmed GO electrodeposition in the samples. An average value of less than  $0.4 \mu\text{m}$  was obtained for the roughness parameter Ra in all four groups, which allows a better sealing of the mucosa and minimizes peri-implantitis. The mean contact angles indicated a more hydrophilic behavior for the uncoated surface ( $57.76 \pm 9.72$ ), which is more suitable for fibroblast adhesion and collagen fiber organization. On the other hand, the group with only  $\text{Cu}_2\text{O}$  deposition ( $88.3 \pm 4.89$ ) was the one that presented the lowest hydrophilicity, being the most suitable for coating the abutment that aims at the bactericidal effect. In the bacterial viability assay, the Ti surface with GO (G2) allowed greater adhesion of *S. mutans*, as well as a higher number of dead bacteria compared to the group with  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1).

**Keywords:** abutment. titanium. copper oxide. graphene oxide. antimicrobials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho de um sistema de implante dentário: implante em forma de parafuso, pilar com parafuso e coroa protética. Cortesia de Conexão Sistema e Próteses. . . . .	23
Figura 2 – (I) Pilares protéticos para prótese cimentada. A: Pilar preparável angulado; B: UCLA plástico; C: UCLA plástico com cinta metálica; D: Ceraone; E: Pilar preparável; (II) Pilares protéticos para prótese parafusada. A: UCLA plástico com cinta metálica; B: UCLA plástico; C: Pilar cônico baixo; D: Pilar cônico; E: Pilar cônico baixo angulado. . .	24
Figura 3 – Pilar protético obtido em torno de alta precisão. . . . .	25
Figura 4 – Pilar protético obtido por enceramento e fundição de componente plástico. . . . .	26
Figura 5 – Representação esquemática simplificada da sucessão microbiana que pode ocorrer sobre a superfície de um implante exposto ao ambiente oral. As espécies microbianas estão coloridas de acordo com os complexos microbianos. . . . .	34
Figura 6 – Desenho esquemático ilustrando mucosa peri-implante saudável, mucosite peri-implante e peri-implantite. . . . .	35
Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a complexidade da composição da microbiota de biofilme submucoso associado à peri-implantite. . . . .	36
Figura 8 – Sinais clínicos de peri-implantite. Observar a grande quantidade de biofilme, cálculo (tártaro) e sinais visíveis de inflamação na mucosa peri-implante. . . . .	38
Figura 9 – Características clínica (A) e radiográfica (B) de três locais de implantes, no lado esquerdo da mandíbula, com peri-implantite. Notar a presença de edema e supuração na mucosa peri-implante (A) e acentuada perda óssea ao redor dos implantes na radiografia (B). . . . .	38
Figura 10 – Amostra de Ti grau 5 soldada no fio rígido de Cu e embutida em resina acrílica. . . . .	48
Figura 11 – A) Lavagem das amostras na cuba ultrassônica; B) Tratamento das superfícies através da imersão em solução de ácidos sulfúrico, clorídrico e água destilada à 80°C. . . . .	49
Figura 12 – Sonicação da solução aquosa contendo 0,5 mg/ml de Cu <sub>2</sub> OSMPs. . . . .	50
Figura 13 – A) Placa de platina (seta vermelha) e amostra de Ti (seta preta); B) Eletrodeposição de Cu <sub>2</sub> OSMPs na amostra de Ti. . . . .	50
Figura 14 – Eletrodeposição de GO na amostra de Ti. . . . .	51

Figura 15 – Morfologia da amostra G1.5.15. A) Aumento de 1000x; B) Aumento de 10000x. . . . .	55
Figura 16 – Morfologias das amostras com aumento de 2500x. A) G1.7.15; B) G1.9.15; C) G1.9.20. . . . .	56
Figura 17 – Tamanho das partículas. A) G1.5.15; B) G1.7.15; C) G1.9.20. . . . .	56
Figura 18 – Morfologia da amostra G2 com aumento de 5000x. . . . .	57
Figura 19 – Morfologia da amostra G3.Cu.GO. A) Aumento de 500x; B) Aumento de 1000x; C) Aumento de 2500x. Seta vermelha: Cu <sub>2</sub> OSMPs. Seta preta: GO. . . . .	57
Figura 20 – Morfologia da amostra G3.GO.Cu. A) Aumento de 500x; B) Aumento de 1000x; C) Aumento de 5000x; D) Aumento de 8000x. Seta vermelha: Cu <sub>2</sub> OSMPs. Seta preta: GO. . . . .	58
Figura 21 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com GO (G2). . . . .	59
Figura 22 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com Cu <sub>2</sub> O seguido de GO (G3.Cu.GO). . . . .	59
Figura 23 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3.GO.Cu). . . . .	60
Figura 24 – Espectros de absorção FTIR-ATR das amostras com revestimento de Cu <sub>2</sub> O (G1), de GO (G2) e de GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3). . . . .	62
Figura 25 – Espectroscopias Raman das amostras com revestimento de GO (G2) e de GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3). . . . .	64
Figura 26 – Sobreposição das espectroscopias Raman das amostras com revestimento de GO (G2) e de GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3). . . . .	65
Figura 27 – Mapeamento Raman da amostra com revestimento de GO (G2). As regiões em vermelho indicam defeitos na amostra. . . . .	65
Figura 28 – Mapeamento Raman da amostra com revestimento de GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3). As regiões em vermelho indicam defeitos na amostra. . . . .	66
Figura 29 – Interferometria mostrando a morfologia das amostras de Ti grau 5. A) Revestimento de Cu <sub>2</sub> O (G1); B) Revestimento de GO (G2); C) Revestimento de GO seguido de Cu <sub>2</sub> O (G3); D) Sem revestimento. A cor azul indica a presença de vales na superfície e a cor vermelha indica a presença de picos. . . . .	70
Figura 30 – Imagens representativas das gotas d'água depositadas nas amostras. O ângulo de contato e as linhas de referência são mostradas nas figuras. A) Revestimento de Cu <sub>2</sub> OSMPs (G1); B) Revestimento de GO (G2); C) Revestimento de GO seguido de Cu <sub>2</sub> OSMPs (G3); D) Sem revestimento (G4). . . . .	72

Figura 31 – Micrografias de microscopia de fluorescência de *S. mutans*. A, B e C: Ti com revestimento de Cu<sub>2</sub>O (G1); D, E e F: Ti grau 5 com revestimento de GO (G2). A e D: Bactérias vivas coradas com SYTO 9 (verde); B e E: Bactérias mortas coradas com iodo de propídio (vermelho); C e F: Bactérias vivas e mortas (verde e vermelho). Ampliação 100X. . . . . 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais bandas apresentadas no espectro FTIR pelo GO. . . . .	60
Tabela 2 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Ra para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4) . . .	68
Tabela 3 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Ra para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	68
Tabela 4 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Rq para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	69
Tabela 5 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Rq para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	69
Tabela 6 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Pc para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	69
Tabela 7 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Pc para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	69
Tabela 8 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Vales para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	70
Tabela 9 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Vales para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	70
Tabela 10 – Análise estatística ANOVA do ângulo de contato para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	72
Tabela 11 – Análise estatística TUKEY do ângulo de contato para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . .	73
Tabela 12 – Análise estatística ANOVA da energia de superfície para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . . .	73
Tabela 13 – Análise estatística TUKEY da energia de superfície para as amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1), GO (G2), GO + Cu <sub>2</sub> O (G3) e SR - sem revestimento (G4). . . . .	73
Tabela 14 – Análise qualitativa <i>live/dead</i> das amostras de Cu <sub>2</sub> O (G1) e GO (G2). . . . .	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
AgNP	Nanopartícula de prata
Al	Alumínio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Cultura Tipo Americana)
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> (Refletância Total Atenuada)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de cérebro e coração)
C	Carbono
Ca	Cálcio
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CC	Conexão Cônica
Cu	Cobre
CuMP	Micropartícula de Cobre
CuNP	Nanopartícula de Cobre
CuO	Óxido Cúprico / Óxido de Cobre II
Cu <sub>2</sub> O	Óxido Cuproso / Óxido de Cobre I
CuONP	Nanopartícula de Óxido de Cobre II
Cu <sub>2</sub> ONP	Nanopartícula de Óxido de Cobre I
Cu <sub>2</sub> OSMP	Submicropartícula de Óxido de Cobre I
DLC	<i>Diamond Like Carbon</i> (Carbono tipo Diamante)
DRX	Difração de Raios X
EDS	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva)
FESEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo)

FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)
FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - Refletância Total Atenuada)
G	Grafeno
GO	Óxido de Grafeno
GONP	Nanopartícula de Óxido de Grafeno
HE	Hexágono Externo
HI	Hexágono Interno
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NP	Nanopartícula
O	Oxigênio
Pc	Número de picos
PMMA	Polimetilmetacrilato
Ra	Rugosidade média
Rq	Rugosidade quadrada média
rGO	Óxido de Grafeno reduzido
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
RPM	Rotações por minuto
S	Enxofre
SEBS/PP	Estireno-Butadieno-Estireno e Polipropileno
SMP	Submicropartícula
Ti	Titânio
Ticp	Titânio comercialmente pura
AU	Unidades Arbitrárias

UCLA	<i>Universal Castable Long Abutment</i> (Pilar Longo Universal Calcinável)
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UA	Unidades Arbitrárias
UV	Ultravioleta
V	Vanádio
Vales	Numero de vales
XPS	<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X)
ZnONP	Nanopartícula de Óxido de Zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

m	metro
m <sup>2</sup>	metro quadrado
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
mJ	milijoule
μg	micrograma
μl	microlitro
°C	graus Celsius

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1	JUSTIFICATIVA	21
1.2	OBJETIVOS	21
1.2.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2.2	OBJETIVO ESPECIFICO	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1	PILAR / ABUTMENT / INTERMEDIÁRIO	23
2.1.1	TIPOS DE PILARES	26
2.1.1.1	PILAR CÔNICO (RETO E ANGULADO)	26
2.1.1.2	PILAR CÔNICO BAIXO (RETO E ANGULADO)	26
2.1.1.3	PILAR DE TITÂNIO PREPARÁVEL	27
2.1.1.4	PILAR UCLA	27
2.1.1.5	PILAR PERIO ONE BASE CONCEPT	28
2.2	RELAÇÃO PILAR / TECIDOS MOLE E DURO	28
2.3	INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA SUPERFÍCIE PILAR/IMPLANTE	31
2.3.1	MUCOSITE PERI-IMPLANTAR E PERI-IMPLANTITE	34
2.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COBRE / ÓXIDOS DE COBRE	39
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO GRAFENO / ÓXIDO DE GRAFENO	45
2.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓXIDO DE GRAFENO E NANOPARTÍCULAS DE COBRE	46
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
3.1	MATERIAIS	47
3.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TITÂNIO	47
3.3	ELETRODEPOSIÇÃO DE SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I	49
3.4	ELETRODEPOSIÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO	50
3.5	ELETRODEPOSIÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO E SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I	51
3.6	CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE	51
3.6.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	51
3.6.2	ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA	52
3.6.3	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	52
3.6.4	ESPECTROSCOPIA RAMAN	52

3.6.5	RUGOSIDADE . . . . .	52
3.6.6	MOLHABILIDADE . . . . .	53
3.7	ENSAIO DE VIABILIDADE BACTERIANA . . . . .	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .</b>	<b>55</b>
4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA . . . . .	55
4.1.1	AMOSTRAS DE SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I . . . . .	55
4.1.2	AMOSTRA DE ÓXIDO DE GRAFENO . . . . .	56
4.1.3	AMOSTRAS DE ÓXIDO DE GRAFENO E SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I . . . . .	57
4.2	ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA . . . . .	58
4.3	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER . . . . .	60
4.4	ESPECTROSCOPIA RAMAN . . . . .	62
4.5	RUGOSIDADE . . . . .	66
4.6	MOLHABILIDADE . . . . .	71
4.7	ENSAIO DE VIABILIDADE BACTERIANA . . . . .	73
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES . . . . .</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS . . . . .</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>81</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O uso dos implantes dentários osseointegrados tem alcançado altos índices de sucesso. Entretanto, há três importantes possibilidades que podem levar ao seu fracasso: trauma cirúrgico, sobrecarga oclusal e infecção bacteriana. A peri-implantite é uma contaminação bacteriana da superfície do implante dentário osseointegrado em função, causando a perda progressiva do osso que o envolve e, conseqüentemente, a falha desse implante. A principal causa da peri-implantite é a infecção bacteriana, por isso é importante que seja prevenida, ou então, diagnosticada precocemente e tratada com eficiência (1).

A mucosite peri-implantar e a peri-implantite resultantes do desequilíbrio hospedeiro-microrganismo (2) têm sido diagnosticadas nos tecidos que margeiam e sustentam o implante após a colocação da prótese sobre os mesmos, ou seja, quando entram em função e submetidos à carga oclusal (1). O tecido peri-implantar quando colonizado com uma microflora semelhante a do tecido periodontal, apresenta comportamento similar à gengivite ou à periodontite. O acúmulo de placa bacteriana tem sido associado a peri-implantites, com maior incidência da doença entre pacientes que já apresentaram periodontites (3).

O pilar é um componente protético transmucoso que conecta os implantes dentários a próteses e permite a transmissão da carga mastigatória (4) para a interface implante-osso. A lacuna física entre o pilar-prótese e o tecido mole é um caminho para a invasão de microrganismos para a superfície do implante dentário, o que pode levar à perda óssea e à peri-implantite. Desta forma, um selamento adequado do tecido mole ao pilar atua como uma estratégia clínica para prevenir a invasão microbiana na superfície do implante dentário.

Para avaliar a infiltração das bactérias, deve-se considerar a saúde periodontal na dentição remanescente e os fatores que estimulam a periodontite, tais como o fumo e a má higiene oral (2, 5), os quais aumentam o risco de peri-implantite (2). Além disso, os fatores que influenciam a colonização microbiana incluem as características da superfície do pilar/implante, o ambiente local, a microbiota oral residente, as características físicas do implante e a acessibilidade para a higiene (5).

LOPES (2009) ressalta que o implantodontista deve tomar medidas para diminuir a colonização bacteriana, como utilizar materiais biocompatíveis, avaliar a qualidade de acabamento e adaptação das próteses, além de aplicar o torque correto de acordo com a especificação de cada fabricante. Sugere, ainda, novos estudos para produzir um implante onde o contato entre pilar/implante seja eficiente ou empregar um material eficaz na vedação para reduzir as infiltrações de fluídos para o interior do implante.

Sabe-se que alguns materiais têm propriedades antibacterianas, como a prata (Ag),

o cobre (Cu) e o grafeno (G). O mecanismo de ação da Ag pode se apresentar de várias maneiras, afetando a superfície das bactérias ao inibir o processo respiratório, atuando nos mecanismos de absorção e liberação de moléculas essenciais para bactérias, degradando o DNA da bactéria, inibindo a multiplicação e modificando a síntese proteica. Os citados efeitos induzem a morte do microorganismo. A atividade do Cu, em relação às suas propriedades biocidas, baseia-se nas alterações no metabolismo das bactérias, afetando a membrana celular e fragmentando o DNA. Já o grafeno, é um material que possui elevada atividade bactericida e não permite o crescimento de bactérias em sua superfície, uma vez que suas paredes nanométricas favorecem as ações mecânica e de estresse oxidativo (7).

## 1.1 Justificativa

O aumento da instalação de implantes em escala global foi acompanhado por um maior número de pacientes diagnosticados com infecções peri-implantares (8). Para prevenir a instalação dessas doenças, vários estudos foram baseados na deposição de Ag e Cu nas superfícies dos implantes de Ti e avaliaram a efetividade e os efeitos bactericidas, com resultados satisfatórios. No presente trabalho, componentes protéticos de titânio serão recobertos com óxidos de grafeno e de cobre para a obtenção do efeito bactericida desses materiais.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo recobrir a superfície dos componentes protéticos de titânio grau 5 ASTM F-136 (Ti-6Al-4V) com submicropartículas de óxido de cobre I ( $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ ) e óxido de grafeno (GO) e para proporcionar atividade bactericida e reduzir a possibilidade de doenças peri-implantares.

### 1.2.2 Objetivo específico

Para viabilizar a consecução do objetivo geral de estudo, os objetivos específicos foram:

- Realizar tratamento da superfície das amostras de titânio com ácidos;
- Determinar os melhores parâmetros para a eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  e GO nos pilares de titânio;
- Analisar as morfologias dos óxidos nas superfícies dos pilares por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);

- 
- Analisar a composição química dos revestimentos por meio da espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS);
  - Identificar a presença de grupos funcionais relacionados aos óxidos de cobre e de grafeno por meio da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
  - Confirmar a eletrodeposição de GO por meio da espectroscopia Raman;
  - Quantificar a rugosidade das amostras por meio da interferometria óptica antes e após as deposições;
  - Quantificar a molhabilidade das amostras antes e após as deposições;
  - Avaliar a viabilidade bacteriana nas superfícies dos pilares revestidas com  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  e GO através do ensaio qualitativo *live/dead*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PILAR / ABUTMENT / INTERMEDIÁRIO

De acordo com RODRIGUES (2011), as estruturas dos implantes osseointegáveis possuem três partes distintas (Figura 1), o implante, o pilar e a coroa protética. O implante é a parte que é inserida no osso por meio de procedimento cirúrgico apropriado. O pilar, também denominado componente protético, *abutment*, intermediário, munhão, transmucoso ou conexão protética, é a parte entre o implante e a prótese. A terceira parte é a coroa protética ou prótese que recebe as forças orais.

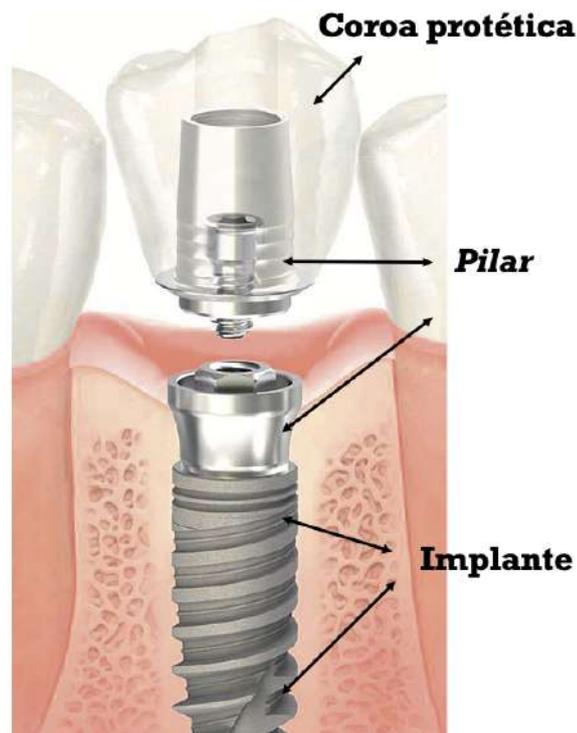


Figura 1 – Desenho de um sistema de implante dentário: implante em forma de parafuso, pilar com parafuso e coroa protética. Cortesia de Conexão Sistema e Próteses.

Fonte: Adaptada de SOARES et al (2021).

Existem no mercado inúmeros tipos de formas, diâmetros de implantes e tratamentos de superfície para inserção nas diversas áreas edêntulas com diferentes tipos de osso. As forma mais comuns dos implantes são o de hexágono externo (HE), hexágono interno (HI) e conexões cônicas (CC) ou tipo cone morse. Do mesmo modo, ao observar a Figura 2, diversas formas e materiais dos pilares foram desenvolvidos para atender as necessidades

clínicas de cada caso (6). As formas dos pilares divergem em relação ao tipo de encaixe nos implantes, com diferenças entre as empresas fabricantes. Esses pilares são fixados aos implantes por meio de um parafuso (11).

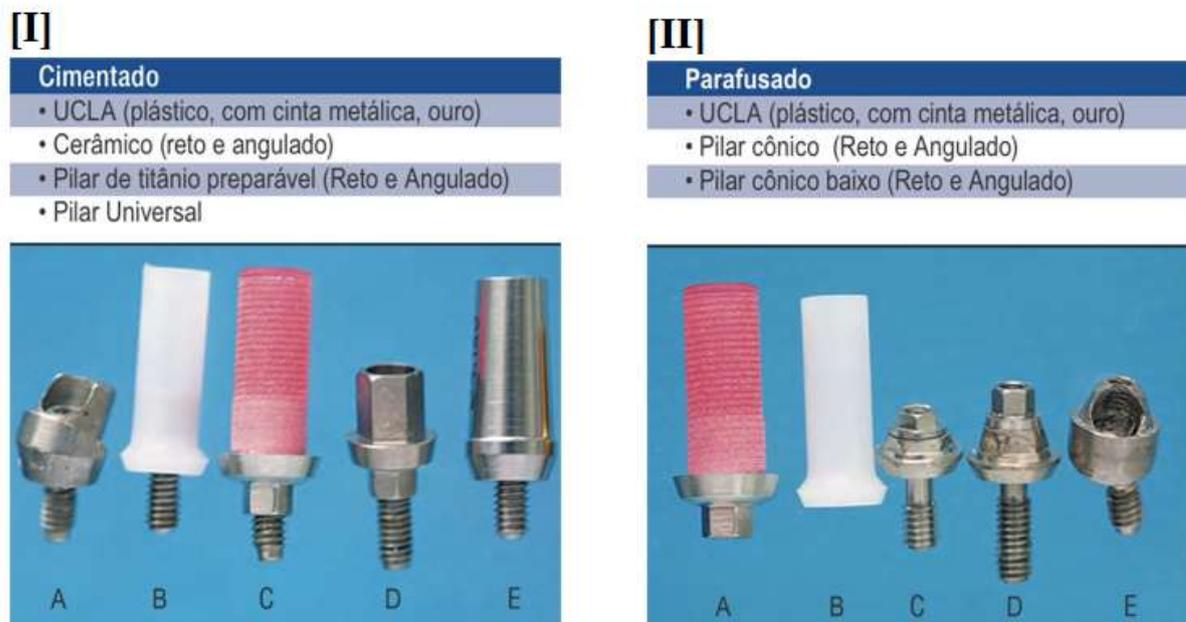


Figura 2 – (I) Pilares protéticos para prótese cimentada. A: Pilar preparável angulado; B: UCLA plástico; C: UCLA plástico com cinta metálica; D: Ceraone; E: Pilar preparável; (II) Pilares protéticos para prótese parafusada. A: UCLA plástico com cinta metálica; B: UCLA plástico; C: Pilar cônico baixo; D: Pilar cônico; E: Pilar cônico baixo angulado.

Fonte: Adaptada de RODRIGUES (2011).

Com o desenvolvimento das prótese implantossuportadas foi possível um excelente nível de adaptação entre as parte que formam a estrutura dos implantes. Houve redução considerável na folga na interface implante/pilar para valores da ordem de 10 a 15  $\mu\text{m}$ . Essa melhor precisão foi possível com o emprego do processo de fabricação dos componentes protéticos em torno de precisão que emprega sistemas CAD-CAM (Figura 3). A adaptação entre os componentes da estrutura (prótese, pilar e implante) definem um sistema único funcional para a transmissão de forças. Como no implante não há ligamento periodontal para absorver a transmissão das forças orais, torna-se obrigatória uma adaptação precisa entre as interfaces implante/pilar e pilar/prótese (9).

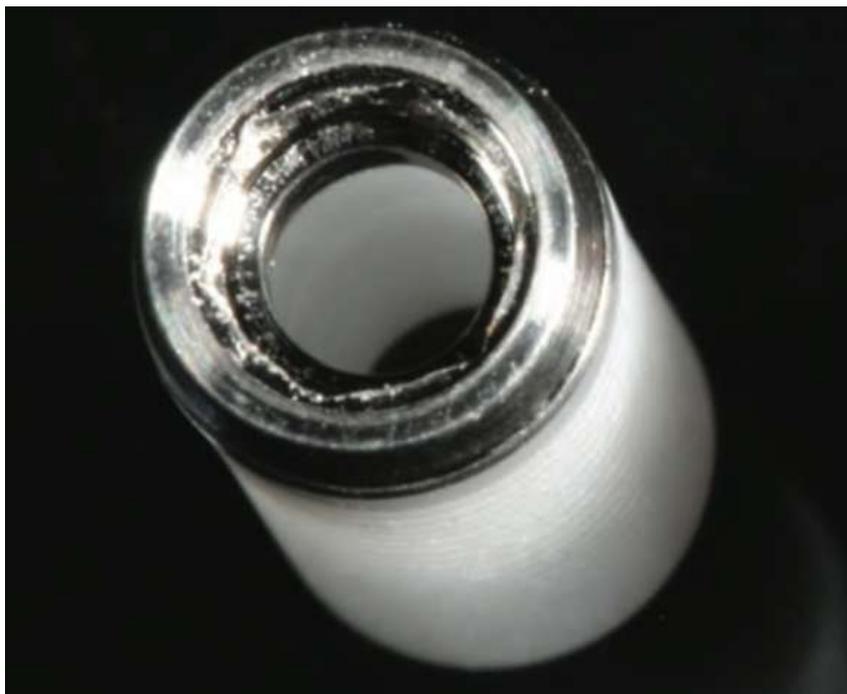


Figura 3 – Pilar protético obtido em torno de alta precisão.

Fonte: Adaptada de RODRIGUES (2011).

As falhas de adaptação entre as interfaces implante/ pilar e pilar/prótese podem gerar fraturas e afrouxamento dos parafusos. Com o aumento da folga na interface ocorre alta retenção bacteriana nas fendas de desadaptação, reação tecidual com invaginação gengival entre os componentes desadaptados e perda de osseointegração nas cristas ósseas marginais (9).

As falhas de adaptação entre as interfaces implante/ pilar e pilar/prótese podem gerar fraturas e afrouxamento dos parafusos. Com o aumento da folga na interface ocorre alta retenção bacteriana nas fendas de desadaptação, reação tecidual com invaginação gengival entre os componentes desadaptados e perda de osseointegração nas cristas ósseas marginais (9).

Existem diferenças básicas entre os procedimentos para obter as restaurações protéticas, os quais variam com os componentes protéticos utilizados. Para obter boa adaptação, são usados cilindros pré-fabricados com ligas metálicas (liga nobre, semi-nobre ou básica) com características que permitem ao cilindro passar pelos procedimentos laboratoriais, mantendo as características obtidas anteriormente pelo torneamento eletrônico. As primeiras próteses eram confeccionadas com ouro, em virtude da melhor adaptação inicial conseguida. Atualmente, são obtidos resultados satisfatórios com as ligas básicas (9).

Existem no mercado empresas que comercializam os cilindros protéticos poliacrílicos. Os componentes intermediários plásticos (calcináveis) são fundidos e a adaptação depende

da qualidade do processo de fundição (Figura 4). Os componentes plásticos com cinta metálica sofrem sobrefundição, onde o metal da cinta metálica permanece com a mesma precisão alcançada pelo torneamento mecânico, sendo uma boa opção restauradora (9).

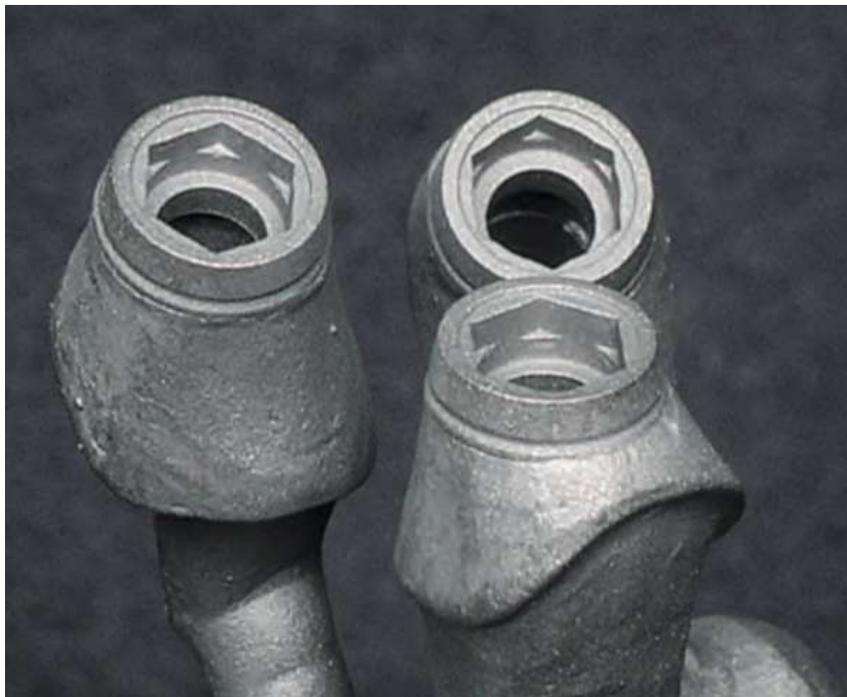


Figura 4 – Pilar protético obtido por enceramento e fundição de componente plástico.

Fonte: Adaptada de RODRIGUES (2011).

## 2.1.1 Tipos de Pilares

### 2.1.1.1 Pilar Cônico (Reto e Angulado)

Este pilar é apropriado para próteses parafusadas sendo composto de um corpo sextavado com forma cônica e uma cinta metálica de altura variável. Pode ser usado para confecção de próteses unitárias e múltiplas. Alguns fabricantes deixaram de produzir este tipo de pilar, substituindo-o por um pilar com as mesmas indicações, porém de menor tamanho, o cônico baixo. Está indicado também para casos que os implantes são levemente divergentes ou convergentes, em espaços entre arcos igual ou superior a 7 mm, regiões com tecidos moles com espessura igual ou superior a 2 mm e quando existe necessidade estética (9).

### 2.1.1.2 Pilar Cônico Baixo (Reto e Angulado)

Atualmente, o pilar cônico baixo é o mais utilizado para prótese parafusada porque tem as mesmas indicações do cônico, porém é menor em altura. Foi idealizado justamente com o objetivo de reabilitar espaços menores, sendo o espaço mínimo interoclusal de 4,5

mm. Outro importante fator é a presença da cinta metálica de 1 mm. Em regiões estéticas, só é usado na presença de uma espessura de tecidos moles de mais de 2 mm, sendo indicado para espaços entre arcos igual ou superior a 5 mm (9).

O componente angulado geralmente é comercializado em duas inclinações, entre 15° e 30°, com a finalidade de corrigir a angulação dos implantes para permitir a confecção da prótese em um único eixo. A mudança de eixo gera um pescoço que o torna anti-estético em áreas visíveis. Não é aconselhado em restaurações unitárias pela fragilidade de retenção da prótese (9).

### 2.1.1.3 Pilar de Titânio Preparável

É uma das opções para prótese cimentada, unitária ou múltipla, geralmente disponível reto e angulado. Este componente tem a forma circular, sendo totalmente em titânio, ou já apresenta uma forma de preparo para coroa. Ambos permitem o seu desgaste que pode ser realizado em laboratório ou clinicamente (9).

Após o seu preparo, são seguidas todas as etapas da prótese convencional sobre dente natural para obtenção de restaurações metalocerâmicas. Tem como vantagem não ser necessário realizar uma fundição do componente intermediário. Porém, como é realizada a sua modificação por desgaste, não existe um coping (metálico ou plástico) para ele. É geralmente parafusado a um análogo e realizada uma moldagem para a confecção de um troquel onde são seguidas todas as fases tradicionais para obtenção da restauração metalocerâmica (enceramento, fundição e aplicação de porcelana). Outra opção é realizar o enceramento diretamente sobre o pilar. Por ser um componente obtido em torno eletrônico, tem a vantagem da precisão. A moldagem também pode ser realizada na boca, porém é mais complexa devido à localização subgingival (9).

### 2.1.1.4 Pilar UCLA

O pilar longo universal calcinável - UCLA (Universal Castable Long Abutment), desenvolvido na Universidade da Califórnia, em Los Angeles, EUA, é o mais versátil dos pilares protéticos, pois permite a confecção tanto de próteses parafusadas como cimentadas, unitárias ou múltiplas. Pode ser usado em todas as situações, inclusive para locais com mínima espessura de tecido mole e implantes angulados. Está disponível em plástico, liga de ouro e em plástico com cinta metálica (ouro, prata-paládio, cobalto-cromo). A fundição pode ser realizada em vários tipos de liga metálica como níquel-cromo, ouro, prata-paládio e cobalto-cromo. O processo de fundição é uma desvantagem, pois pode comprometer a precisão da adaptação. Por este motivo, quando escolhido este pilar, deve-se optar pelos com cinta metálica, garantindo a boa adaptação obtida por torneamento mecânico, já que ocorre uma sobrefundição e a parte do hexágono é inalterada. Quando ele é totalmente

plástico, é realizada uma fundição para obtenção do componente, incluindo a parte do hexágono (9).

#### 2.1.1.5 Pilar Perio One Base Concept

A função biológica do pilar Perio One Base Concept é preservar a união dos tecidos moles ao componente protético. Após a inserção, ele fica na mesma posição sem necessidade de remoção nas várias fases após a cirurgia para a preparação da prótese. Sobre a plataforma do Perio One Base, é possível fixar o parafuso de cicatrização, pilares provisórios da prótese e todos os componentes protéticos necessários para a fixação da prótese provisória e definitiva. Consiste de uma única peça sólida, reta, com dois tamanhos de plataforma de assentamento: pequeno (small)  $\varnothing$  3,8 e grande (large)  $\varnothing$  4,8. É fabricado com a liga ASTM-G5 (ASTM-F136 e ISO 5832-3) e esterilizado com radiação gama, podendo ter alturas do transmucoso de 0,9 mm a 4 mm. O pilar pode ser adaptado nos implantes HI e cone morse, sendo essencial para prótese unitária ou múltipla quando a estética é considerada um fator crítico. O pilar Perio One Base atua como base primária de acessórios de diferentes formatos, podendo ser usado em técnicas de próteses cimentadas ou parafusadas (12).

## 2.2 RELAÇÃO PILAR / TECIDOS MOLE E DURO

A fixação de tecidos moles em torno dos pilares tem algumas semelhanças com a fixação em torno dos dentes naturais, incluindo a mucosa, o epitélio juncional e o tecido conjuntivo, que são similares em largura biológica. No entanto, há também algumas diferenças importantes. O tecido conjuntivo apresenta uma estrutura gengival livre semelhante ao epitélio queratinizado em torno de implantes e dentes naturais, mas as fibras de colágeno do tecido conjuntivo ao redor dos implantes são orientadas paralelamente à superfície do pilar. Além disso, o tecido conjuntivo peri-implantar mostra vascularidade pobre e parece mais com um tecido cicatricial (13).

Foi observado que os diferentes tipos de topografia de superfície de implantes dentários (usinado, com tratamento ácido ou jateamento) não influenciaram na cicatrização dos tecidos. O sulco ao redor do implante parece ser feito de epitélio não queratinizado e uma zona de fibras circulares constitui o tecido conjuntivo. A composição desse tecido em torno dos dentes naturais e dos implantes também é diferente. Nos primeiros, é formado por 60% de fibras colágenas e até 15% de fibroblastos. Em contraste, o tecido ao redor dos implantes dentários compreende 85% das fibras e apenas 3% de fibroblastos (13).

A presença de folga entre pilar/implante pode influenciar no nível da crista óssea, uma vez que há infiltração de células inflamatórias, de microrganismos da cavidade oral e de endotoxinas. Observou-se que citocinas mediadas por lipopolissacarídeos podem

penetrar até mesmo em pequenas lacunas em uma conexão cônica, contribuindo para a destruição da crista óssea. Além disso, microorganismos gram-negativos também podem causar reabsorção da crista por ativação de osteoclastos. A vedação do tecido conjuntivo e do osso ao redor dos implantes também são influenciados por biofilmes orais (comunidade de células microbianas em uma matriz extracelular produzida pelos próprios microrganismos e anexada a um substrato). A placa dentária é constituída por comunidades complexas de biofilmes, sendo um fator importante no desenvolvimento da mucosite e peri-implantite (13).

REZK et al (2018) realizaram uma revisão sistemática avaliando se a utilização de pilares com composição química e topografia de superfície semelhantes àquelas dos dentes naturais iriam produzir ligações transmucosas similares às naturais, melhorando assim os resultados funcionais e estéticos. Dentro das limitações da revisão, concluíram que a integração do tecido mole em torno dos pilares do implante é possível e que a inserção de fibroblastos na superfície do pilar elimina a lacuna física entre o tecido mole e os componentes transmucosos. No entanto, a longevidade deste tipo de integração e as formas de alcançar uma superfície topográfica ideal do pilar precisam de mais pesquisas. O grau de rugosidade de uma superfície do pilar, os métodos utilizados para obter a composição química e a topografia de superfície dos pilares dentários são alguns dos fatores que podem afetar a resposta do tecido mole do complexo pilar-coroa. Por outro lado, uma rugosidade de superfície acima de  $0,4 \mu\text{m}$  aumenta a afinidade dos microrganismos e o risco de doenças peri-implantares. Um fator adicional que influencia na adesão de fibroblastos é a hidrofiliabilidade das superfícies dos componentes protéticos de implantes dentários. A organização perpendicular das fibras de colágenos em relação à interface transmucosa pode ser alcançada em superfícies hidrofílicas. Um método que pode melhorar o selamento do tecido mole, a vascularização e a proliferação celular, bem como a redução da resposta inflamatória, é o tratamento com radiação ultravioleta (UV), que aumenta a molhabilidade da superfície dos pilares dos implantes.

SARTORI (2018) explicou que, no âmbito da pesquisa dos implantes odontológicos, houve avanços no que diz respeito à porção rosqueada da prótese, que fica em contato com o tecido ósseo, enquanto a possibilidade de obter adesão de partes moles sem aumentar a adesão bacteriana ainda é uma necessidade não atendida. A geometria, a forma e a topografia de um implante dentário afetam sua interação com os tecidos biológicos, em particular para as regiões do colar e pilar, devendo ser concebidos com o objetivo principal de promover a adesão dos fibroblastos gengivais e das células dos tecidos moles da cavidade oral, minimizando a adesão bacteriana.

O objetivo do seu trabalho foi estudar o efeito da modificação de superfície do titânio comercialmente puro (Ticp) grau 2, na região do colarinho, no contexto da interação de tecidos moles e redução da contaminação bacteriana. No que diz respeito à topografia,

nanoranhuras orientadas foram produzidas para guiar o alinhamento dos fibroblastos sem aumentar a adesão bacteriana. As amostras de Ticp foram submetidas a dois tipos de tratamento: o primeiro consistiu em fazer ranhuras paralelas usando a soldagem por feixe de elétrons (um processo no qual um feixe de elétrons de alta velocidade é bombardeado no material); o segundo tipo foi submeter a uma modificação mecânica superficial, na qual as amostras foram polidas em um espelho e em uma parte delas foram realizados tratamentos de superfície, como a ativação de plasma com oxigênio, a fim de tornar a superfície mais reativa ao revestimento de nanofibra posteriormente depositado, enquanto uma segunda parte não. Ambas superfícies foram revestidas com nanofibras de queratina, depositadas pela técnica *electrospinning*.

A escolha da queratina ocorreu devido à sua capacidade de aumentar a adesão, proliferação e diferenciação celular. Algumas amostras, revestidas apenas com nanofibras, foram submetidas a um pós-tratamento com radiação UV para "ativar" a superfície e tornar o revestimento de queratina mais aderente ao substrato de titânio. Posteriormente, as amostras revestidas foram enriquecidas com Ag, conhecida por suas propriedades antibacterianas. Todas as amostras assim processadas foram submetidas a caracterizações de superfície, como rugosidade, microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM), espectroscopia de fotoelétrons de Raios-X (XPS), FTIR e potencial zeta. A resposta biológica às superfícies modificadas foi avaliada por meio de testes bacterianos e ensaios celulares usando a cepa *S. aureus* e fibroblastos gengivais humanos.

A partir da análise dos dados experimentais obtidos, pode-se concluir que as nanoranhuras obtidas por feixe de elétrons, com sulcos de três tamanhos diferentes, 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  e 30  $\mu\text{m}$ , reduziram a adesão bacteriana na superfície e essa capacidade aumentou com o aumento do tamanho das ranhuras. Os estudos de molhabilidade mostraram uma hidrofobicidade reduzida em comparação com a superfície menos rugosa do titânio, independentemente do tamanho do sulco. Quanto aos testes celulares, as ranhuras incentivaram a adesão e a disseminação celular, favorecendo a orientação das células aderentes ao substrato e a deposição de colágeno por fibroblastos. Além disso, os revestimentos de nanofibras de queratina enriquecidos com Ag exibiram comportamento antibacteriano e resultaram em um substrato adequado para adesão e proliferação celular (sem efeitos de citotoxicidade).

De acordo com ELIAS, ROESTEL e GIORDANI (2019), o termo selamento refere-se à capacidade dos tecidos moles ao redor de um componente protético formar uma barreira para impedir o contato do meio oral com o implante osseointegrado. Quanto melhor o selamento, mais difícil é a entrada de bactérias e toxinas na interface implante/osso. Para atingir este objetivo, a existência de tecido mole saudável aderido ao componente protético é essencial. No entanto, os tecidos formados ao redor do implante não são estáveis. Vários parâmetros induzem mudanças na região ao redor dos implantes, incluindo a intensidade das cargas mastigatórias, a capacidade da superfície do implante de transferir as forças

orais para o osso, o tipo de prótese, a biomecânica e a capacidade de selamento dos tecidos aderidos no componente protético.

CANULLO et al (2020), através de revisão sistemática e meta-análise, correlacionaram a geometria dos pilares côncavos versus convexos com a recessão do tecido mole, por sua supercompressão. Ensaios clínicos randomizados com um tamanho mínimo de amostra de 20 implantes (10 por grupo) e um acompanhamento de pelo menos 3 meses após o carregamento do implante foram considerados elegíveis para este estudo. Os resultados demonstraram que a forma do pilar pode ter uma influência na perda óssea marginal, mas nenhum impacto nos tecidos moles.

## 2.3 INFILTRAÇÃO BACTERIANA NA SUPERFÍCIE PILAR/IMPLANTE

A longevidade dos implantes osseointegrados pode ser comprometida por sobrecarga oclusal, desenvolvimento da doença peri-implantar (6, 2), falta de estabilidade implante-pilar e microtopografia da superfície do implante. O titânio polido ou a zircônia são convencionalmente usados na parte transgengival do pilar do implante dentário como elementos conectivos para próteses. No entanto, esses materiais biocompatíveis nem sempre oferecem suporte para um selamento adequado de tecido mole peri-implantar, eventualmente levando à invasão bacteriana (13). De forma adicional, os implantes dentários não são totalmente cobertos pelos tecidos periodontais e parte deles fica exposta ao ambiente bucal, facilitando a colonização pelo biofilme formado pela microbiota bucal (6). Devido à colonização bacteriana e consequente possibilidade de redução da base óssea, a forma dos implantes e a conexão entre seus componentes foram modificados na tentativa de minimizar essa problemática (11). Entretanto, mesmo com o desenvolvimento de novos implantes e pilares e a tentativa de alguns estudiosos proporcionarem o melhor selamento de forma a evitar a microinfiltração, a colonização de bactérias entre implante/pilar não foi, até o momento, evitada (6).

Nos sistemas de implantes chamados de dois estágios, o pilar prótico é retido no implante através de um método mecânico de fixação, o que resulta em uma microfenda entre o pilar e o implante. Essa lacuna acaba gerando um reservatório bacteriano que pode levar a infecções dos tecidos moles. A colonização bacteriana é imediata após a instalação do implante. O tamanho dos microrganismos é variado, porém geralmente menor do que 2  $\mu\text{m}$ . Assim, pelas dimensões dos microrganismos, a ocorrência de infiltração se torna possível. Além disso, a carga oclusal aplicada sobre os implantes pode acarretar em um aumento no tamanho da microfenda e, com isso, aumentar o potencial de infiltração bacteriana e percolação de fluídos (11).

LIMA (2014), em seu estudo, avaliou a microinfiltração bacteriana *in vitro* na interface entre o pilar e o implante, comparando-se HE, HI e CC, sendo esta última de 3

tipos diferentes de forma dos componentes protéticos (tipos sólida, indexada e linha zero). Para tal, 150 conjuntos (pilar/implante) foram utilizados, divididos em cinco grupos (n = 30). G1 – pilares HE; G2 – pilares HI; G3 – pilares CC do tipo sólido; G4 – pilares CC do tipo indexado; G5 – pilares CC do tipo linha zero. Para a avaliação, suspensões das bactérias *Escherichia coli* e *Streptococcus sanguinis* foram inoculadas na porção apical do parafuso do pilar, sob condições estéreis. Os pilares foram fixados aos implantes e torqueados, segundo recomendações do fabricante, e imersos em caldo Brain Heart Infusion (BHI) estéril durante 14 dias para avaliação de possível contaminação externa imediata. Ao final do período, os conjuntos foram separados, o conteúdo interno foi sonicado, diluído, semeado e levado a estufa bacteriológica (37°C por 48 horas) para verificação da viabilidade e contagem das bactérias. As amostras que não continham *E. coli* e *S. sanguinis* viáveis foram descartadas do estudo. A morfologia bacteriana foi ainda observada no MEV. Não houve diferença estatística entre G2 (9,09%), G3 (21,74%), G4 (22,73%) e G5 (11,11%). Analisando-se separadamente os grupos não-turvados com *E. Coli* (p = 0,126) e *S. Sanguinis* (p = 0,962) e os grupos turvados com *E. coli* e *S. sanguinis* (p = 0,655.) com Anova 1- fator (p < 0,05), não houve diferenças significativas na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os tipos de conexões. Constatou-se que a infiltração bacteriana ocorreu em todos os grupos, porém em baixo índice, e não houve diferença estatística entre eles.

HEITZ-MAYFIELD, TELES e LANG (2018) explicaram que quando um implante dental é colocado, a parte endo-óssea deve idealmente ser circundada por osso e, portanto, não costuma ser exposta à formação de biofilme. Em contrapartida, a parte transepitelial do implante/pilar uma vez exposta à cavidade oral, torna-se rapidamente colonizada pelos microrganismos, os quais se unem às proteínas salivares e peptídios que constituem a película. Esta, por sua vez, fornece receptores para as adesinas existentes na superfície da célula de todas as espécies bacterianas da boca. Desta forma, um biofilme peri-implante é formado minutos após exposição à cavidade oral e uma comunidade complexa de multiespécies supra e submucosas se desenvolve em um período de semanas a meses de exposição. Observaram, também, que as películas do esmalte e do titânio não são idênticas. Na película salivar formada *in vitro* sobre a superfície do titânio, foram encontradas moléculas como mucinas de alto peso molecular, amilase, IgG secretora e proteínas ricas em prolina. Entretanto, as moléculas frequentemente encontradas sobre o esmalte dentário, como cistatinas e mucinas de baixo peso molecular, não foram detectadas. Embora a película salivar que se forma sobre a superfície de titânio possa diferir daquela formada sobre a superfície do esmalte, as diferenças não parecem influenciar na composição bacteriana do biofilme.

Em virtude do ambiente ecológico comum, os princípios e a sequência da formação do biofilme nos dentes e no implante são semelhantes. A formação do biofilme é iniciada pela adesão dos colonizadores iniciais, como os da espécie *Streptococcus* (15), incluindo *S. sanguinis* (5, 16), *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis* (16) e *Actinomyces naeslundii*, por

meio das interações com a película salivar (5). Em seguida, colonizadores precoces, como *S. mutans*, *Actinomyces viscosus* e *Fusobacterium nucleatum*, aderem e coagregam com os colonizadores iniciais e amadurecem (16). Os colonizadores precoces crescem, modificam o ambiente e promovem a adesão dos colonizadores tardios por coagregação (Figura 5). O biofilme, com sua comunidade diversificada de microrganismos interligados, matriz de glicocálix e estrutura complexa, torna-se estável com o passar do tempo, oferecendo um ambiente de proteção às defesas do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos (5).

Embora a dentição remanescente pareça ser a principal fonte para a colonização de bactérias das superfícies do implante nos pacientes parcialmente dentados, o potencial desempenho das superfícies de tecido mole, como as papilas linguais e amígdalas, e a saliva como reservatório para a colonização do implante, também devem ser considerados. Esse fato corrobora os estudos nos quais patógenos periodontais, dentre eles *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, tenham sido detectados em pacientes edêntulos em uma população idosa que nunca tinha usado dentadura, mas tinha histórico de periodontite (5).

A partir de técnicas moleculares, como a reação da cadeia de polimerase (PCR) e hibridização DNA–DNA pela técnica checkerboard, patógenos periodontais, incluindo *P. Gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra* e *Streptococcus intermedius*, em níveis e proporções baixos, foram encontrados em sulcos peri-implante saudáveis em indivíduos totalmente edêntulos e parcialmente dentados. Deve ser enfatizado que, nos pacientes com boa higiene oral e condição periodontal estável, os implantes podem manter resultado de tratamento com sucesso, sem infecção peri-implante, apesar dos patógenos periodontais (5).

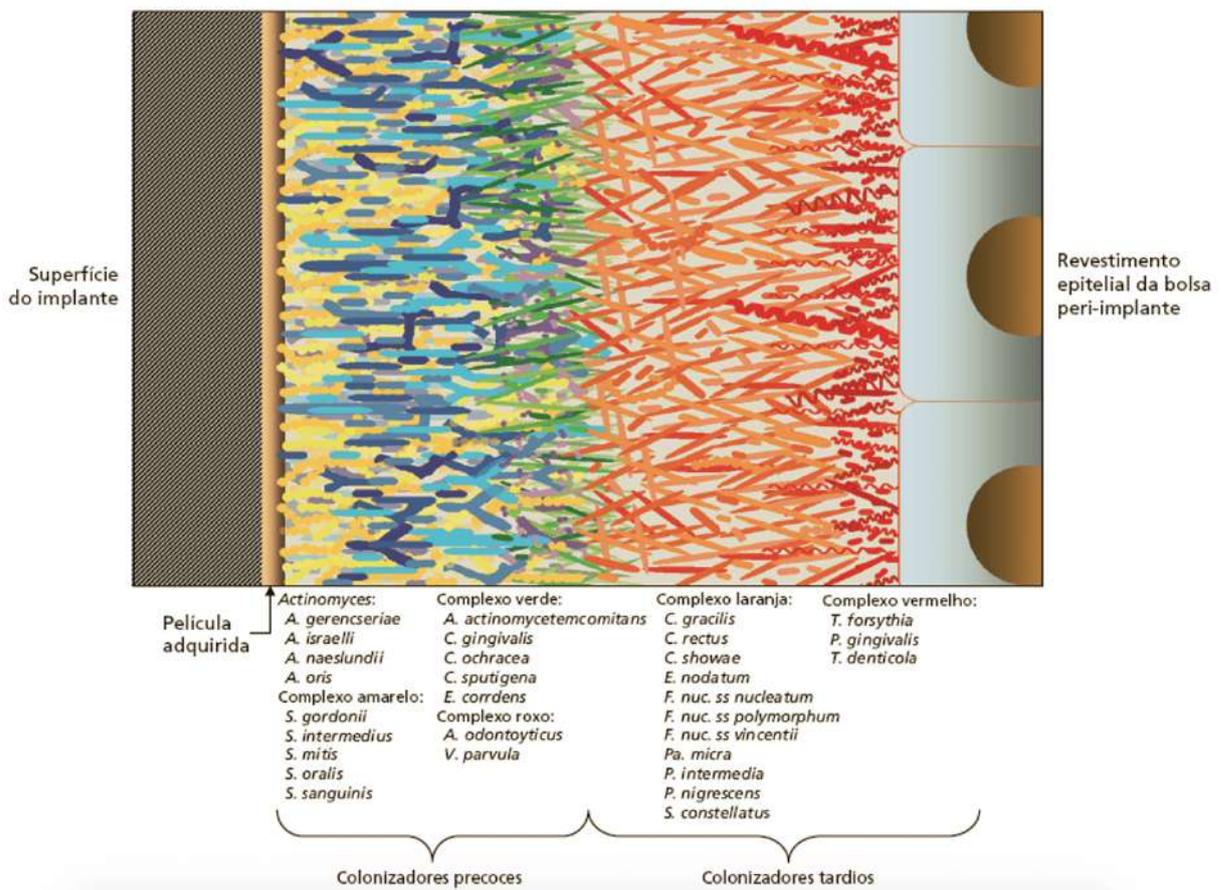


Figura 5 – Representação esquemática simplificada da sucessão microbiana que pode ocorrer sobre a superfície de um implante exposto ao ambiente oral. As espécies microbianas estão coloridas de acordo com os complexos microbianos.

Fonte: Retirada de Heitz-Mayfield, Teles e Lang (2018).

### 2.3.1 Mucosite Peri-implantar e Peri-implantite

De acordo com CERBASI (2010), peri-implantite é um processo inflamatório que afeta os tecidos ao redor dos implantes osseointegrados sob função, resultando em perda do osso de suporte. De forma semelhante à periodontite, a peri-implantite é resultante do desequilíbrio hospedeiro-microrganismo que pode se manifestar por meio de uma série de mudanças inflamatórias levando a dois quadros distintos (Figura 6):

- mucosite peri-implantar: lesão confinada, restrita aos tecidos moles peri-implantares, sendo, portanto, reversível;
- peri-implantite propriamente dita: lesão que envolve, além dos tecidos moles, o tecido ósseo adjacente ao implante osseointegrado.

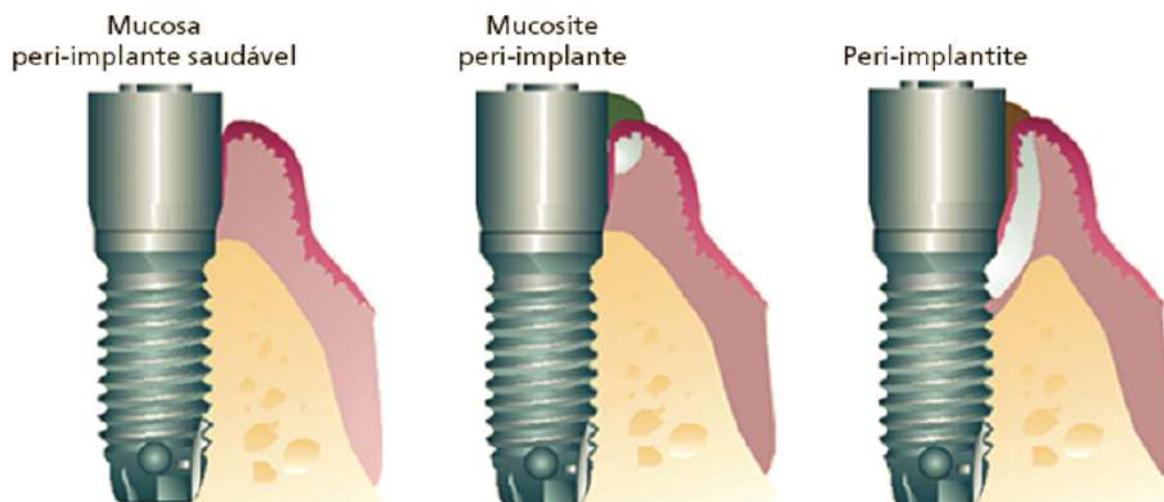


Figura 6 – Desenho esquemático ilustrando mucosa peri-implante saudável, mucosite peri-implante e peri-implantite.

Fonte: Retirada de Berglundh, Lindhe e Land (2018).

Os achados microbiológicos sugerem que a infecção peri-implantar é, possivelmente, a causa da perda tardia dos implantes após estarem sob função mastigatória. Os microorganismos mais associados com a doença peri-implantar são as espiroquetas, como a *Treponema denticola*, bastonetes, organismos gram-negativos facultativos ou anaeróbios estritos, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatobacter actinomycetemcomitans*. Estas bactérias podem lesar os tecidos peri-implantares de diferentes maneiras: invadindo e destruindo diretamente os tecidos peri-implantares por meio de liberação de enzimas, subprodutos e fatores de reabsorção óssea; diminuindo as defesas do hospedeiro; induzindo uma reação inflamatória mediada pelo sistema imune do hospedeiro; bem como pela combinação dos fatores citados (2).

PERSSON e RENVERT (2013) estudaram a presença de 78 espécies bacterianas usando o método de hibridização DNA-DNA *checkerboard* em implantes saudáveis e com diagnóstico de peri-implantite. Várias espécies foram encontradas em níveis mais elevados nos implantes com peri-implantite, incluindo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aythoceptocureus*, *Staphylococcus aythoceptocureus*, *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*. A análise da curva característica de operação do receptor identificou *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. socranskii*, *Staph. aureus*, *Staph. anaeróbio*, *Strep. intermedius* e *Strep. mitis* na peri-implantite compreendendo 30% da microbiota total. Cabe ressaltar que nenhum dos participantes recebeu antibioticoterapia durante

os 6 meses anteriores nem mesmo algum tipo de tratamento para peri-implantite. Esse estudo identificou que as bactérias comumente associadas à periodontite são altamente prevalentes na peri-implantite, além de concluir que a doença peri-implantar é uma infecção polimicrobiana (Figura 7).

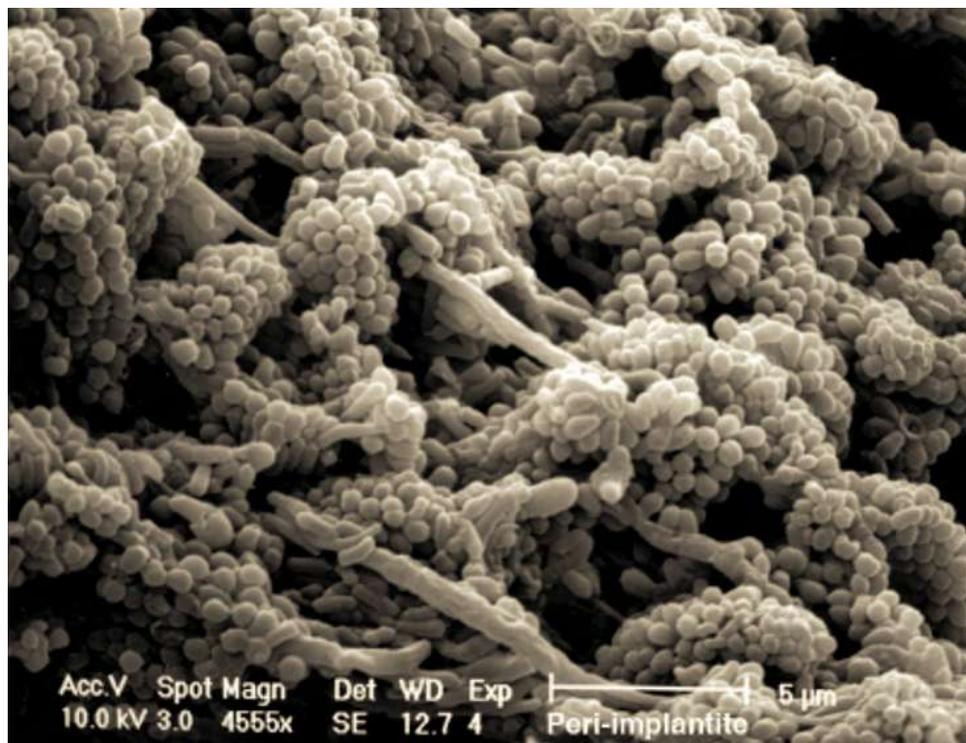


Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura mostrando a complexidade da composição da microbiota de biofilme submucoso associado à peri-implantite.

Fonte: Retirada de Heitz-Mayfield, Teles e Lang (2018).

Segundo LEITE (2015), devido às diferenças entre as técnicas utilizadas, não existe um consenso quanto ao grupo de bactérias determinante no desenvolvimento da peri-implantite. Desta forma, realizou um trabalho objetivando diagnosticar e determinar a prevalência da peri-implantite e relacionar quais bactérias cultiváveis estão envolvidas no desenvolvimento de infecções ao redor dos implantes dentários. A fim de quantificar os parâmetros peri-implantares, 150 indivíduos com implantes dentários reabilitados a mais de 2 anos, de ambos os gêneros, foram submetidos a exames intra-bucais através de sondagem para verificar a profundidade de bolsa peri-implantar. Todos os indivíduos diagnosticados com peri-implantite foram submetidos a uma radiografia periapical da região para observação do nível ósseo radiográfico ao redor dos implantes. Para identificação das espécies de bactérias, foi utilizada a cultura bacteriana com provas bioquímicas. Todas as coletas apresentaram bactérias cultiváveis que foram isoladas e identificadas em gêneros e espécies. A prevalência da peri-implantite na população examinada foi de 23,34%. Quanto aos implantes avaliados, 9,7% foram diagnosticados com peri-implantite, apresentando

uma profundidade de sondagem peri-implantar de 5 a 13 mm, tendo como média 8 mm. Ainda, 66% deles apresentaram imagem radiográfica em forma de taça, sugerindo perda óssea ao redor dos implantes. Os microorganismos cultivados com maior frequência nas regiões peri-implantares nesta pesquisa foram: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens/tanneriae*, *Gemella morbillorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas migra*. Quanto ao tipo de respiração das colônias identificadas, houve grande predomínio das anaeróbicas estritas/obrigatórias. Pelos resultados obtidos, o autor supôs que a peri-implantite possa estar relacionada às características dos tecidos peri-implantares, à capacidade de higienização e ao controle de placa bacteriana ao redor dos mesmos e à colonização dos tecidos peri-implantares por bactérias periodontopatogênicas, que se tornam também nocivas aos implantes.

De acordo com HEITZ-MAYFIELD, TELES e LANG (2018), em relação à microbiota associada às infecções peri-implante, a maioria dos estudos demonstrou que sua composição na região submucosa é similar àquela da periodontite crônica, com uma infecção anaeróbica mista dominada por bactérias gram-negativas. Alguns estudos também encontraram alto número de outros microorganismos não comumente associados às doenças periodontais, incluindo bastonetes entéricos e fungos ou microorganismos associados a infecções extraorais, como estafilococos (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) ou *Peptostreptococcus*. Achados de outras pesquisas descreveram a similaridade da microbiota encontrada entre a mucosite peri-implantar e a peri-implantite, bem como em locais com infecção peri-implante e periodontite. O citomegalovírus humano e o vírus Epstein-Barr também foram associados à infecção peri-implante, sugerindo um possível papel etiológico por supressão imune local, permitindo o crescimento excessivo de patógenos periodontais. Em locais saudáveis e com mucosite peri-implante, nenhuma coinfeção foi detectada.

Os autores ressaltaram que as características dos biofilmes relacionadas à doença peri-implante foram estudadas com o uso de várias técnicas microbiológicas e métodos de amostragem, a maioria dos quais desfaz a estrutura tridimensional do biofilme. Desta forma, a verdadeira natureza, o valor e a diversidade da microbiota, associados às infecções peri-implante, somente poderão ser compreendidos quando o foco de investigações futuras for o estudo de microorganismos não cultiváveis, com o uso de técnicas que não comprometam a estrutura tridimensional do biofilme.

BERGLUNDH, LINDHE e LANG (2018) complementaram que a mucosite peri-implante e a gengivite compartilham muitas características. A resposta do hospedeiro à ameaça bacteriana nos dentes e implantes inclui o desenvolvimento de sinais clínicos de inflamação e o estabelecimento de lesões inflamatórias no tecido conjuntivo da mucosa/gengiva. Em relação à peri-implantite, seus sinais e sintomas se relacionam à natureza infecciosa/inflamatória da lesão (Figura 8). Portanto, além da evidência radiográfica de perda óssea, existem sinais clínicos consistentes de inflamação da mucosa, incluindo edema

e rubor, assim como sangramento à sondagem delicada e supuração da “bolsa” (Figuras 9A e 9B). O implante permanece estável somente enquanto houver alguma “osseointegração”.



Figura 8 – Sinais clínicos de peri-implantite. Observar a grande quantidade de biofilme, cálculo (tártaro) e sinais visíveis de inflamação na mucosa peri-implante.

Fonte: Retirada de Berglundh, Lindhe e Land (2018).

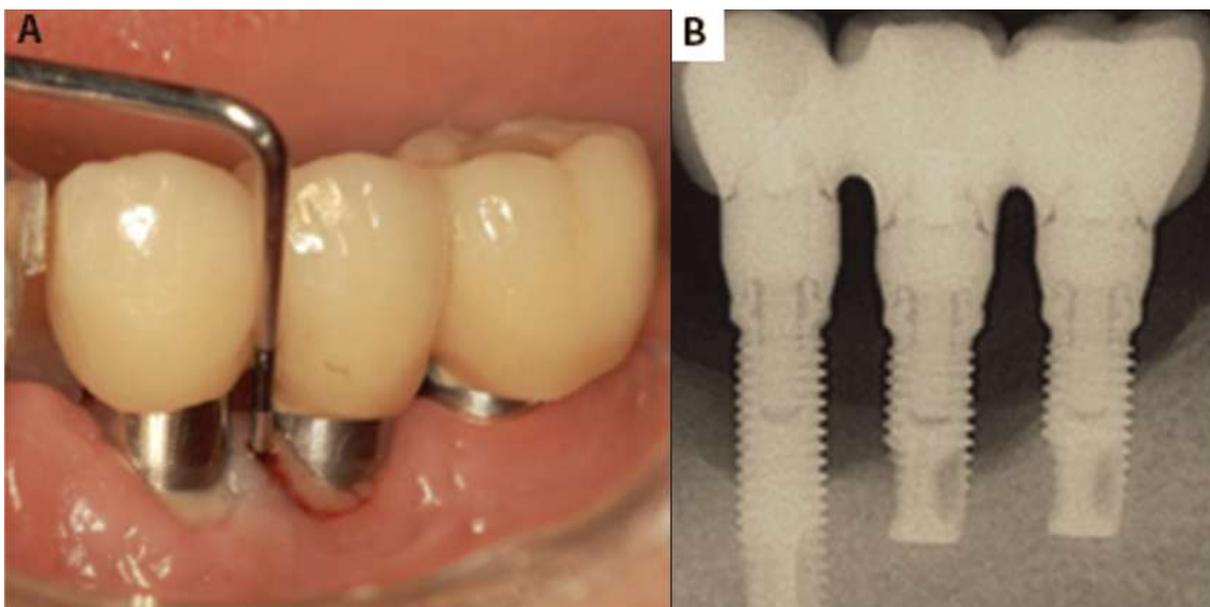


Figura 9 – Características clínica (A) e radiográfica (B) de três locais de implantes, no lado esquerdo da mandíbula, com peri-implantite. Notar a presença de edema e supuração na mucosa peri-implante (A) e acentuada perda óssea ao redor dos implantes na radiografia (B).

Fonte: Retirada de Berglundh, Lindhe e Land (2018).

Tratando-se dos fatores de risco para o desenvolvimento da peri-implantite, há evidências de que os pacientes com alta suscetibilidade para a periodontite, adicionada à higiene oral precária, tabagistas e/ou diabéticos, correm maior risco para peri-implantite (8). Assim, além das características dos pacientes, incluindo o fator microbiano, a qualidade

óssea e a presença de mucosa queratinizada, a sobrecarga oclusal, o tipo de restauração e as características das superfícies dos implantes devem ser avaliados quanto à possibilidade de exercerem riscos inerentes aos processos de falência de implantes e peri-implantites (2).

Diferentes fatores que influenciam no selamento transmucoso têm sido investigados, como a presença de mucosa queratinizada, que apresenta um efeito mais positivo na arquitetura do tecido mole e na capacidade do tecido de resistir ao estresse da mastigação, trauma ou recessão (13).

A sobrecarga oclusal tem recebido intensa atenção pelos pesquisadores. Entretanto, os resultados dos estudos são contraditórios, devido à dificuldade de adequar um modelo animal que reproduza as condições durante os hábitos excursivos e parafuncionais do sistema estomatognático. Embora esse fator seja bastante discutido nas doenças periodontal e peri-implantar, algumas características inerentes à histopatofisiologia do tecido peri-implantar, tais como a ausência de ligamentos e a orientação dos feixes de fibras colágenas, paralelas aos implantes osseointegrados, poderiam distribuir e/ou absorver as forças oclusais de maneira diferente quando comparada ao periodonto. Foi relatado que a microbiota presente em implantes falidos devido à peri-implantite foi diferente da microbiota detectada em implantes perdidos devido à sobrecarga oclusal (2).

Em relação à superfície do implante, foi observada que a progressão da peri-implantite é mais acentuada nos implantes com superfície rugosa do que naqueles com superfície lisa (8), caso o implante se torne exposto ao ambiente oral. O impacto da rugosidade da superfície sobre a formação do biofilme pode ser explicado por vários fatores, incluindo a proteção contra as forças de cisalhamento, a área aumentada para adesão e a dificuldade na limpeza das superfícies rugosas, o que possibilita o rápido crescimento do biofilme pela multiplicação das espécies bacterianas residentes (5). Ainda, a forma e o tipo de conexão do pilar ao implante dentário parecem influenciar na estabilidade do tecido duro e conseqüentemente na saúde dos tecidos moles e estética peri-implantar. Foi hipotetizado que os pilares com uma microtopografia semelhante a do esmalte do dente podem selar melhor o tecido mole, evitando assim a invasão microbiana, com a preservação da crista óssea e, finalmente, levando a uma melhor taxa de sucesso (13).

## 2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COBRE / ÓXIDOS DE COBRE

Sabe-se que alguns materiais têm propriedades biocidas, mas seus modos de ação ainda não estão bem elucidados, devido a muitos fatores que devem ser considerados, dentre eles: a presença de cápsula nas bactérias, a estrutura da parede celular, a presença de células livre no meio ou aderidas em biofilmes e a estabilidade do material. O modo de ação do óxido de cobre II (CuO) em relação às suas propriedades biocidas também não foi

completamente esclarecido, mas, pela proximidade na distribuição periódica com a Ag, é possível prever um mecanismo semelhante (18), provocando alterações no metabolismo das bactérias, afetando a membrana celular e fragmentando o DNA (7).

A propriedade bactericida das nanopartículas de óxido de cobre II (CuONPs) depende de seu tamanho, estabilidade e concentração adicionados ao meio de crescimento, uma vez que isso proporciona maior tempo de retenção para a interação de nanopartículas (NPs) bacterianas. Em geral, as células bacterianas estão na faixa do tamanho de um micron. A maioria das células bacterianas tem membranas celulares que contêm poros na faixa nanométrica. Uma propriedade única de atravessar a membrana celular pode potencialmente ser atribuída a NPs sintetizadas através desses poros bacterianos. No entanto, para tornar isso possível, é importante superar desafios e preparar/desenhar NPs estáveis o suficiente para restringir significativamente o crescimento bacteriano durante o cruzamento da membrana celular (19).

CuONPs foram caracterizadas e investigadas por REN et al (2009) com relação a potenciais aplicações antimicrobianas. Para comparação, nanopartículas de cobre (CuNPs), nanopartículas de óxido de cobre I (Cu<sub>2</sub>ONPs), nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) e nanopartículas de prata (AgNPs) também foram testadas. CuONPs em suspensão de 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 50 e 20 µg/ml foram usadas para determinar a menor concentração bactericida necessária para impedir o crescimento de bactérias após a transferência para meios livres de NPs. As seguintes cepas foram usadas: *Staphylococcus aureus* EMRSA-16 (*S. aureus* epidêmico resistente à meticilina), EMRSA-15 (resistente à meticilina), *S. aureus* (MRSA) 252, *S. aureus* 'Golden' (isolado laboratorialmente), *S. aureus* Oxford (NCTC 6571), *Staphylococcus epidermidis* SE-51 e SE-4, *Escherichia coli* NCTC 9001 *Pseudomonas aeruginosa* PAOI (isolado laboratorialmente) e *Proteus spp.* (isolado laboratorialmente). Suspensões de NPs foram preparadas em caldo de soja de triptona e sonicadas para garantir a dispersão ideal de NPs. Utilizou-se um sonicador Soniprep 150 MSE, com pulsos de 3 s e descansos de 6 s por um total de 90 s. Aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/ml de cada microrganismo foram adicionadas à suspensão de NPs em uma diluição de 1 em 100. A incubação foi então realizada em uma incubadora de agitação (200 rpm a 37°C no ar por 24 h). Caldos livres de NPs inoculados foram usados como controles negativos. O crescimento foi então avaliado plaqueando cada NPs/suspensão bacteriana em placas de ágar de soja triptona (oxóide). As placas foram incubadas a 37°C no ar com 10% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

CuONPs demonstraram atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo MRSA. Em contraste com Ag, com valores de concentração bactericida mínima (CBM) de 100 µg/ml contra todas as 10 cepas testadas, os valores de CBM para CuO variaram de 100 µg/ml para *S. aureus* (Oxford) a 5000 µg/ml para *P. aeruginosa* e *Proteus spp.* Com CuNPs, valores de 250, 2500 e 2500 µg/ml,

respectivamente, foram observados com essas bactérias. Além de Cu<sub>2</sub>ONPs contra *P. aeruginosa*, todos os valores de CBM para Cu<sub>2</sub>ONPs e ZnONPs foram iguais ou superiores aos determinados para CuONPs. Usando ensaios de *time-kill*, as populações de organismos Gram-positivos (cepas × 4) e Gram-negativos (cepas × 3) testadas foram reduzidas em 68% e 65%, respectivamente, na presença de 1000 µg/ml CuONPs. Esse estudo concluiu que CuONPs em suspensão mostraram atividade contra uma variedade de patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Escherichia coli*, com CBMs variando de 100 µg/ml a 5000 µg/ml. CuONPs foram eficazes na morte de uma variedade de patógenos bacterianos envolvidos em infecções hospitalares. No entanto, em comparação com AgNPs e CuNPs, maiores concentrações de CuONPs foram necessárias para alcançar um efeito bactericida. A capacidade das CuONPs de reduzir as populações bacterianas a zero foi aumentada na presença de concentrações de AgNPs.

AZAM (2012) sintetizou CuONPs de diferentes tamanhos controlando a temperatura de recozimento durante a síntese de combustão em gel e explorou a atividade antibacteriana dependente do tamanho de cada preparação de CuONPs. Nesta abordagem, nitrato cúprico tri-hidratado e ácido cítrico foram dissolvidos em água destilada com uma proporção molar de 1:1. A solução resultante foi agitada a 100°C, até que o gel fosse formado. O gel foi deixado queimar a 200°C para obter pó amorfo, que foi recozido em diferentes temperaturas para obter CuONPs de tamanhos diferentes. Os espectros de difração de Raios X (DRX) confirmaram a formação de CuONPs monofásicas. FTIR e Raman também validaram a pureza das CuONPs. Verificou-se que o tamanho do cristalito aumenta com o aumento da temperatura de recozimento devido à difusão atômica. Um tamanho mínimo de cristalito de 20 nm foi observado no caso de CuONPs recozidas a 400°C. Os resultados da microscopia eletrônica de transmissão (MET) corroboraram bem os resultados da DRX. Investigaram-se, ainda, as propriedades antibacterianas contra duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e duas bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) usando difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e métodos de CBM.

Nesse estudo, as CuONPs mostraram atividade antibacteriana notável contra bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). A extensão da inibição do crescimento bacteriano observada neste estudo mostrou-se variável e dependente do tamanho. As menores CuONPs (tamanho de partícula  $20 \pm 1,24$  nm) sintetizadas na temperatura de 400°C mostrou um efeito inibitório significativo contra bactérias Gram-negativas e positivas em comparação com as amostras de CuO sintetizadas em temperaturas mais altas. Uma observação única foi que CuONPs sintetizadas a 400°C com o menor tamanho de partícula demonstraram a zona máxima de inibição no caso de *B. subtilis*, que foi 20% a mais do que a zona de inibição observada para a tetraciclina. Ao comparar o efeito de NPs sintetizadas em faixas de temperatura variáveis, o maior efeito inibitório foi registrado para essas partículas de CuO, que foram sintetizadas a

400°C contra a cepa *P. aeruginosa*. Além disso, as partículas menores sintetizadas a 400°C tinham uma zona de raios de inibição duas vezes maior que a das partículas produzidas a 700°C. Relacionando-se o efeito das NPs nas cepas bacterianas, as CuONPs foram mais tóxicas para *E. coli*, independentemente do tamanho das partículas. Em todos os casos, quanto menores as CuONPs, menores os valores de CIM, que apresentaram diferenças mais pronunciadas entre todas as cepas, exceto *S. aureus*, entre NPs de 400°C e 500°C. No caso de *S. aureus*, o maior aumento na CIM foi observado para NPs sintetizadas em temperaturas entre 500°C e 600°C. Para *E. coli* e *S. aureus*, os valores de CIM para partículas sintetizadas a 700°C foram três vezes maiores do que os registrados para as NPs sintetizadas a uma temperatura comparativamente menor (400°C). Em geral, as CuONPs tiveram um efeito menos pronunciado em outras cepas bacterianas, mas esses efeitos ainda eram duas vezes maiores do que os determinados para partículas sintetizadas a 700°C. Os valores de CBM foram ainda mais drasticamente dependentes do tamanho das partículas. Ou seja, o autor concluiu que a atividade antibacteriana avaliada em vários microrganismos obteve a maior eficácia com as CuONPs recozidas a 400°C devido ao menor tamanho de partícula desta amostra em comparação com outras amostras. Além disso, a CIM e a CBM de CuONPs recozidas a 400°C foram menores para todas as cepas bacterianas.

BAGCHI et al (2013) sintetizaram um compósito de argila à base de CuNPs. As CuNPs foram intercaladas e adsorvidas na superfície com diâmetros menor que 5 nm (para intercaladas) e entre 25–30 nm (para adsorvidas). O compósito mostrou boa estabilidade por mais de 3 meses no ar. Foi observada excelente atividade antimicrobiana do compósito para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* com taxas de mortalidade maior que 90% após 12 horas. Os autores relataram que as principais fontes de ação antibacteriana são através de danos à membrana celular permeados por fixação direta do compósito e danos indiretos causados pelo íon de Cu liberado.

A maior resistência das bactérias aderidas no biofilme em relação à forma livre sugere a busca de materiais com superfícies que atuem como bactericida ou que diminuam a adesão destes biofilmes. Com isso, o trabalho de SCHEIDT (2013) consistiu em modificar a superfície de vidros comerciais por meio da deposição de filmes finos de Cu / CuO, utilizando óxidos pela sua estabilidade, para fins antibacterianos. Desta forma, este trabalho procurou investigar a ação antibacteriana frente a células bacterianas livres em caldo e aderidas em biofilmes. Para os testes antibacterianos, utilizou-se como modelo experimental a bactéria *Acinetobacter sp*, pela sua capacidade de formar biofilme, a qual foi cultivada em caldo Luria e em lâminas planas após contato com vidros com e sem filmes. Para a avaliação da formação de biofilme pela linhagem bacteriana, utilizou-se o método de colorção de cápsula ou coloração de Gins (teste complementar que não envolve os filmes finos de Cu). Pode-se observar que as bactérias *Acinetobacter sp*. apresentam cápsula e

esta ajuda as células a se fixarem umas nas outras. Assim, do ponto de vista da bactéria, a estrutura da cápsula gera uma proteção contra os agentes externos; entretanto, em relação à saúde humana, as cápsulas representam uma resistência a mais para eliminação desse foco. Verificou-se ainda que a metodologia de crescimento em caldo não foi capaz de avaliar a eficiência do filme fino de Cu/CuO como agente antibacteriano. Estes resultados provavelmente foram devido à diluição das partículas biocidas em relação ao volume do meio de cultura líquido, fazendo com que a bioatividade fosse diminuída. No entanto, nos testes em lâminas planas, as análises por microscopia óptica mostraram que os biofilmes não aderiram na superfície com filmes finos de Cu quando comparados com o controle e lâminas de vidro sem filmes. Logo, apresentou-se eficiente no combate da adesão de biofilme, considerado um dos principais meios de contaminação bacteriana. Os resultados obtidos mostraram que o filme fino de Cu foi eficiente na inibição da adesão do biofilme em superfície de lâmina de vidro. Este é um fator importante, uma vez que os biofilmes bacterianos são relatados como barreiras que protegem essas células da ação de biocidas para controle de contaminação.

O método eletroquímico foi investigado por KATWAL et al (2015) para a síntese de CuONPs sob diferentes condições reacionais, bem como a atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e cepas fúngicas (*Aspergillus nigris* e *Candida albicans*) pelo método da curva de crescimento. As bactérias foram cultivadas durante à noite em caldo de nutrientes e o fungo foi cultivado em solução de caldo de dextrose de batata (PDB) em um agitador de incubadora a 37°C. A cultura microbiana foi exposta a CuONPs com diferentes concentrações (25 µg/ml e 50 µg/ml) e a concentração de células microbianas foi ajustada para aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/ml. O controle foi usado sem as NPs. As culturas foram agitadas a 150 rpm a 37°C. Após 1 hora, 3 ml de suspensão foram retirados para determinar as taxas de crescimento microbiano medindo a densidade óptica a 600 nm (OD600) usando um espectrofotômetro UV-visível. O mesmo procedimento foi repetido a cada 1 hora por 16 h para obter a curva de crescimento das bactérias e fungos. A eficiência das NPs para inibir o crescimento de microrganismos foi determinada pelas diferenças no percentual de micróbios antes e após o tratamento. Os autores observaram que o crescimento máximo de bactérias e fungos foi inibido em 50 µg/ml, após o período de incubação de 16 horas em todos os casos. Além disso, houve inativação de 94% de *A. nigris*, o que pode ser devido à ligação de NPs à membrana externa desses fungos, o que resultou na interrupção da síntese e do transporte ativo de ácidos nucleicos. Os autores ainda relataram que a forma, o tamanho e o rendimento das NPs foram altamente afetados pelos parâmetros reacionais (por exemplo, eletrodo, eletrólito, temperatura, tempo de eletrólise, solvente atual, solução e dimensão ou forma da célula).

Objetivo do trabalho de ARAB (2018) foi sintetizar, caracterizar e testar a atividade antimicrobiana de ZnONPs, CuONPs e AgNPs em bactérias Gram-positivas (*Staphylo-*

*coccus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) com o propósito de investir em processos que retardam/inibam o crescimento de microrganismos em alimentos. Para a síntese das ZnONPs foram realizados os métodos de precipitação e sonoquímica (ultrassom), para as de CuONPs, além destes métodos, realizou-se também a síntese hidrotérmica e para as de AgNPs por precipitação. Considerada um antimicrobiano universal, Ag foi utilizada como parâmetro de comparação nos estudos, por isso a realização apenas da síntese mais tradicional, por precipitação. As caracterizações realizadas para as NPs foram DRX, FTIR, FESEM e potencial zeta.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi demonstrada por meio do teste de difusão em ágar (análise qualitativa) e do teste de agitação em frasco (análise quantitativa). Este último foi realizado para as bactérias que mostraram maior inibição no teste de difusão (*S. aureus* e *E. coli*) e para as sínteses que obtiveram menores NPs, sendo a de ultrassom para ZnO, ultrassom 2 h para CuO e precipitação para Ag. A espessura das NPs manteve-se entre 10 a 40 nm. No teste de difusão, as ZnONPs mostraram halos de inibição para as bactérias *S. aureus* (12 a 14 mm  $\pm$  0,05) e *E. faecalis* (5 mm  $\pm$  0,05); as CuONPs formaram halos para *S. aureus* (6,6 a 9,6 mm  $\pm$  0,05) e levemente para *E. coli* (4,5 a 5,2 mm  $\pm$  0,05); já para as AgNPs, houve a formação de halos de inibição em todas as bactérias: *S. aureus* (12,4 mm  $\pm$  0,05); *E. faecalis* (9,7 mm  $\pm$  0,05); *E. coli* (8,6 mm  $\pm$  0,05) e *Salmonella* (8,1 mm  $\pm$  0,05). Enquanto no teste de agitação em frasco, para *S. aureus*, as NPs obtiveram uma inibição de aproximadamente 100% em relação ao controle com uma concentração por volta de 200  $\mu\text{g/ml}$  para CuONPs e AgNPs e a 350  $\mu\text{g/ml}$  para ZnONPs. Para *E. coli*, com a maior concentração estudada para todas as NPs, 500  $\mu\text{g/ml}$ , foi possível uma inibição por volta de 90% em relação ao controle. A atividade antimicrobiana das NPs utilizadas mostraram maior inibição para as bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas. De acordo com os estudos realizados, as NPs testadas (ZnO, CuO e Ag) mostraram-se como potenciais agentes antimicrobianos e podem ser consideradas de grande importância com o propósito de investir em processos que retardam/inibem o crescimento bacteriano.

O estudo de RIBEIRO (2019) teve por objetivo investigar o uso de micropartículas de cobre (CuMP) e CuNPs como agentes antimicrobianos em compósitos com matriz polimérica a base de estireno-butadieno-estireno e polipropileno (SEBS/PP). Como foco biológico desse estudo, se avaliou o uso dos compósitos para prevenir o desenvolvimento de microrganismos em sistemas de ar condicionado automotivo. Os resultados dos ensaios mostraram que a adição das partículas metálicas não gerou variações na estrutura e nas propriedades que comprometam o desempenho mecânico dos compósitos, quando comparados a uma formulação sem a adição do metal. Os testes antimicrobianos desenvolvidos em laboratório mostraram uma redução quase total do número de bactérias nas amostras com CuMPs e CuNPs, sendo que, contra fungos, as NPs foram mais efetivas, mesmo usadas em teores bem inferiores aos de MPs. Entretanto, em testes de campo,

os nanocompósitos fixados em filtros de ar condicionado automotivo mostraram baixa eficiência antimicrobiana, provavelmente devido às condições de menor umidade quando comparados às condições dos testes em laboratório.

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO GRAFENO / ÓXIDO DE GRAFENO

Segundo YUSONG TU et al (2013), G puro e as nanopartículas de óxido de grafeno (GONPs) podem penetrar e extrair grandes quantidades de fosfolipídios das membranas celulares de *Escherichia coli*. Em seu estudo, GONPs, que são dispersáveis em água, foram produzidas utilizando o método de Hummers modificado. As células de *E. coli* foram incubadas com 100 mg/ml de GONPs a 37 °C. O processo de incubação foi observado com microscopia eletrônica de transmissão (MET) durante o processo de incubação de 2,5 horas. Inicialmente, as células de *E. coli* toleraram as GONPs, especialmente em baixas concentrações. Porém, após algum tempo, as membranas celulares de *E. coli* foram parcialmente danificadas, com algumas células exibindo baixa densidade de fosfolipídios. Posteriormente, houve perda da integridade celular devido à ação das Nps (as membranas celulares foram severamente danificadas e algumas células perderam completamente o citoplasma). Os pesquisadores ainda demonstraram que a atividade antibacteriana é proporcional ao aumento do tamanho e da concentração de G. Os autores acreditam que mecanismos semelhantes se aplicam a outros tipos de bactéria e, com isso, que o G pode se tornar um novo tipo de material antibacteriano para o uso diário, oferecendo pouca resistência bacteriana, já que o mecanismo de ataque aos organismos invasores é baseado em dano estrutural.

O G é um material que possui elevada atividade bactericida e não permite o crescimento de bactérias em sua superfície. A maior parte das investigações sobre sua atividade antimicrobiana são com GO e óxido de grafeno reduzido (rGO), e não com grafeno puro, pois esses compostos são muito mais ativos na viabilidade de bactérias. Os estudos que estão sendo realizados sobre as possibilidades do G e seu efeito bactericida estão divididos em artigos que expõem derivados do G diretamente em contato com bactérias e artigos que estudam o G em combinação com um substrato ou dopando-o com outro material. As inúmeras investigações realizadas começaram a delimitar os aspectos que influenciam esta atividade, desde o tipo de G utilizado (G; GO; rGO), a sua concentração, o tempo de exposição, o tamanho das suas partículas, como também as propriedades do substrato no qual é depositado ou com o material com o qual está combinado. Sabe-se que o GO e o rGO melhoram sua capacidade antibacteriana ao utilizar substratos metálicos ou em combinação com dopantes como Ag, gerando sinergia nas qualidades do material obtido (7).

Foi verificado que as paredes nanométricas de G depositadas sobre um substrato de aço inoxidável favorecem as ações mecânica e de estresse oxidativo. Este fato ocorre devido ao efeito produzido pelas arestas agudas dessas paredes sobre as bactérias que, ao serem depositadas, causam danos irreparáveis às membranas celulares. Essas membranas têm uma leve carga negativa e interagem com as bordas das paredes nanométricas, que são boas receptoras de elétrons e, com isso, se atraem, o que causa danos à parede celular. A ação combinada das nanoparedes faz do grafeno um excelente material, pois apresenta uma superfície homogênea e eficiente que interage com os microrganismos devido a uma razão eficiente entre o comprimento da borda e a espessura do seu revestimento (7).

## 2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓXIDO DE GRAFENO E NANOPARTÍCULAS DE COBRE

A atividade bactericida oriunda da associação de GO e Cu não foi relatada no meio odontológico. Entretanto, LI, YANG e CUI (2017) afirmaram que as aplicações de GO, rGO e das CuNPs encontra-se em grande expansão na agricultura. Resultados da literatura mostraram que o GO-CuNPs têm excelente atividade antibacteriana em concentrações extremamente baixas. Um composto GO-CuNPs danifica a estrutura celular, aumenta o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminui o conteúdo de DNA nas células bacterianas. ROS são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular ou derivados dos produtos da redução. Os organismos expostos ao oxigênio produzem ROS em seu metabolismo normal. Entretanto, em situações patológicas seus níveis aumentam.

Testes in vivo em tomateiros indicaram que GO-CuNPs podem reduzir a severidade da mancha bacteriana sem fitotoxicidade. Observaram que quando *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* foram expostas às GO-CuNPs, as CuNPs foram liberadas e aderiram às superfícies das células bacterianas. Em seguida, as CuNPs reagiram com a proteína da membrana, levando ao aumento da permeabilidade celular e danificando a integridade da membrana/parede celular. Portanto, CuNPs na superfície celular podem penetrar no interior das células, o que causa sérios danos ao reagir com o DNA e outros compostos intracelulares. Essas reações produzem um alto nível de ROS, que medeiam um forte estresse oxidativo. Os lipídios da membrana, proteínas, DNA e outros compostos foram posteriormente degradados sob o ambiente oxidativo. Finalmente, as células bacterianas foram completamente mortas .

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 MATERIAIS

Foram utilizadas amostras de Ti em forma de discos com 6,5 mm de diâmetro e 3,5 mm de espessura obtidas através do corte mecânico de barras de Ti grau 5 ASTM F-136 (Ti-6Al-4V), fornecidas pela empresa Conexão Sistema e Prótese (Arujá, SP).

Por ser mais ativo na viabilidade de bactérias que o G (7), o GO foi o material de escolha nesse trabalho. O GO foi sintetizado no Laboratório de Filmes Finos do Instituto Militar de Engenharia (IME) pelo método de Hummers modificado. O GO utilizado apresenta uma variedade dimensional com algumas folhas de tamanhos superiores a 100  $\mu\text{m}$ , de acordo com o estudo realizado por LIMA et al (2017).

A atividade antimicrobiana do CuO é comprovadamente mais eficiente que do Cu<sub>2</sub>O (20). A utilização de Cu<sub>2</sub>OSMPs neste estudo ocorreu pela disponibilidade desse material, fornecido pela empresa Nanotec (Chile).

Para o ensaio de viabilidade bacteriana, foi utilizada uma cepa padrão ATCC (American Type Culture Collection, EUA) de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), fornecida pela Divisão de Biologia Celular e Molecular da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas, SP).

### 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TITÂNIO

Para a preparação das amostras foram seguidos os passos detalhados a seguir:

1. Secção das barras de Ti na cortadora metalográfica Struers, modelo Miniton;
2. Soldagem de um fio rígido de Cu ao Ti para permitir a passagem da corrente durante a eletrodeposição;
3. Embutimento dos discos em resina acrílica, obtendo um formato circular (Figura 10);
4. Polimento das amostras por apresentarem sinais de corte e imperfeições. O procedimento foi realizado na lixadeira metalográfica AROTEC, Modelo AROPOL-VV, utilizando lixas de granulação 80, 100, 320, 500, 1000 e 1200, no tempo de 1 min cada. Ao mudar de lixa, as amostras foram giradas em 90°, para não ocorrer impressões indesejadas das lixas;

5. Remoção de contaminações introduzidas na superfície das amostras devido às operações anteriores. Para isso, duas lavagens foram realizadas na cuba ultrassônica Cristófoli à temperatura ambiente (Figura 11A). Primeiramente com 50 ml de água destilada durante 10 min, seguida pela imersão em 30 ml de álcool isopropílico por 6 min;
6. Secagem à temperatura ambiente;
7. Tratamento da superfície das amostras através da imersão em solução de ácidos sulfúrico, clorídrico e água destilada (Figura 11B) à 80°C, durante 15 min, com o objetivo de receber GO e Cu<sub>2</sub>OSMPs;
8. Lavagens consecutivas na cuba ultrassônica conforme etapa já descrita anteriormente;
9. Secagem em estufa a 70°C durante 15 min.

As amostras preparadas foram divididas em 4 grupos:

- G1: Ti com revestimento de Cu<sub>2</sub>OSMPs
- G2: Ti com revestimento de GO
- G3: Ti com revestimento de GO e Cu<sub>2</sub>OSMPs
- G4: Ti sem revestimento (SR)



Figura 10 – Amostra de Ti grau 5 soldada no fio rígido de Cu e embutida em resina acrílica.



Figura 11 – A) Lavagem das amostras na cuba ultrassônica; B) Tratamento das superfícies através da imersão em solução de ácidos sulfúrico, clorídrico e água destilada à 80°C.

### 3.3 ELETRODEPOSIÇÃO DE SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I

A deposição ocorreu a partir de uma solução aquosa com 0,5 mg/ml de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  (pesadas em balança analítica APX-200-Denver Instrument) em agitação magnética constante e mínima. Foi necessário realizar sonicação da solução aquosa de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  para evitar a formação de aglomerados (Figura 12). Como não há na literatura parâmetros de tensão e tempo definidos para a eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  (Figuras 13A e 13B), foram utilizados 4 subgrupos. Usou-se o código Gx.yV.zt, onde Gx é o grupo ( $x = 1$ ), yV a voltagem usada na deposição ( $yV = 5, 7$  ou  $9$ ) e zt o tempo de deposição ( $zt = 15$  ou  $20$  minutos), conforme a seguir:

- G1.5.15: grupo 1, 5 V, durante 15 minutos
- G1.7.15: grupo 1, 7 V, durante 15 minutos
- G1.9.15: grupo 1, 9 V, durante 15 minutos
- G1.9.20: grupo 1, 9 V, durante 20 minutos

Como realizado por CORADO et al (2022), fez-se deposição catódica, colocando-se como anodo uma placa de platina, oxidando-a. Desta forma, permitiu-se a deposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  na amostra de Ti catódica.



Figura 12 – Sonicação da solução aquosa contendo 0,5 mg/ml de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ .

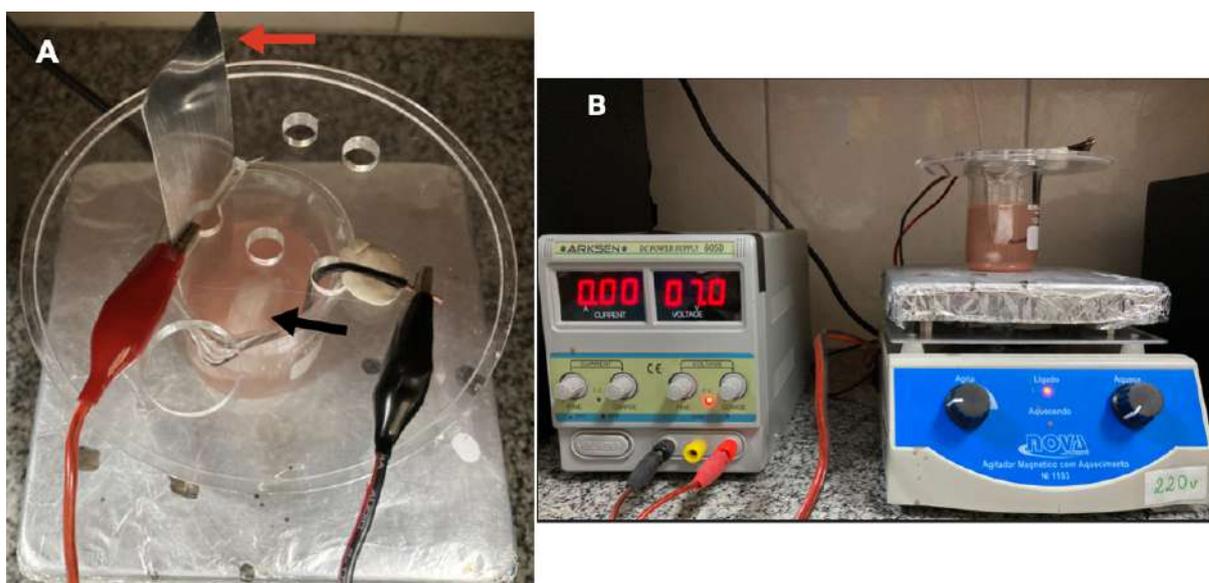


Figura 13 – A) Placa de platina (seta vermelha) e amostra de Ti (seta preta); B) Eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  na amostra de Ti.

### 3.4 ELETRODEPOSIÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO

Nas amostras do G2, realizou-se a eletrodeposição de GO com agitação magnética constante em solução aquosa com 1,0 mg/ml (Figura 14), da mesma forma que na de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ . A tensão aplicada compreendeu a faixa de 8 a 11V, durante 10 minutos, em agitação mínima.



Figura 14 – Eletrodeposição de GO na amostra de Ti.

### 3.5 ELETRODEPOSIÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO E SUBMICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE I

Objetivando verificar a melhor sequência de eletrodeposição, as amostras foram divididas em dois subgrupos:

- G3.Cu.GO: deposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ , seguida de GO
- G3.GO.Cu: deposição de GO, seguida de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$

Em ambas as amostras foram utilizados como parâmetros para  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ , 5V por 15 min, e para GO, entre 8 a 11 V por 10 min. Fez-se duas eletrodeposições separadas em eletrólitos diferentes.

## 3.6 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE

### 3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram analisadas por meio do MEV, modelo Quanta FEG, disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica do IME, Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizados os aumentos entre 500 e 15000x, tensão de 20 kV, *spot size* de 5.0 ou 5.5 e distância de trabalho de 7,8 a 12,9 mm. O MEV permite a visualização da morfologia, do tamanho, da aglomeração e dos aspectos da superfície das partículas presentes nas amostras.

### 3.6.2 Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva

Realizou-se a caracterização por EDS, acoplado ao MEV, para uma avaliação química qualitativa e semiquantitativa, estimando a concentração dos elementos presentes.

### 3.6.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As medições das amostras foram realizadas com o Vertex 70 FT-MIR Analyzer da Bruker, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, operando no modo absorvância com acessório de refletância total atenuada (ATR). O software OPUS versão 5.5 foi usado para aquisição de dados. Os sinais de fundo foram adquiridos primeiro. Depois de posicionar corretamente a amostra, medidas espectrais em triplicata foram realizadas na respectiva amostra. Os espectros foram adquiridos na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  números de onda, resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , com média de 32 varreduras à temperatura de  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Esse método permite a identificação da presença de grupos funcionais na estrutura de uma substância através de vibrações entre diferentes ligações atômicas. Isso é possível porque os átomos dos materiais possuem frequências específicas de vibração, que variam de acordo com a estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. Utilizou-se o acessório ATR que permite a análise de amostras sólidas.

### 3.6.4 Espectroscopia Raman

A eletrodeposição do GO foi avaliada por meio da espectroscopia Raman, modelo LabRAM HR Evolution, com microscópio confocal Olympus BX41, Horiba, disponível na Seção de Tecnologia de Materiais de Carbono (STMC) do Centro Tecnológico do Exército (CTEx), Rio de Janeiro, Brasil.

É uma técnica que pode proporcionar informações química e estrutural de compostos orgânicos ou inorgânicos, permitindo sua identificação por meio de informação vibracional específica para as ligações químicas e simetria de moléculas.

### 3.6.5 Rugosidade

A avaliação da rugosidade foi realizada com o rugosímetro por interferometria óptica Zygo NewView 7100 (Zygo Corporation, Middlefield, CT, Estados Unidos), disponível no Laboratório de Biomateriais do IME. Como parâmetros de amplitude, foram quantificadas a rugosidade média ( $R_a$ ), bem como a rugosidade quadrada média ( $R_q$ ). E, como parâmetros de espaçamento, os números de picos (Pc) e de vales das amostras de Ti. Foram avaliados 3 discos de cada grupo de amostras, com 5 medições lineares por superfície. Devido à falta

de normas específicas para a medida de rugosidade usando interferometria, seguiu-se as recomendações das normas ABNT NBR ISO 3274, 4287 e 4288.

### 3.6.6 Molhabilidade

O equipamento utilizado foi o goniômetro FTA 100 (*First Ten Angstroms*, Portsmouth, VA, EUA) disponível no Laboratório de Biomateriais do IME. As medidas do ângulo de contato foram realizadas pela técnica da gota séssil contendo em torno de 8  $\mu\text{l}$ . Foram realizadas 3 medições por superfície em 3 discos de cada grupo de amostras.

## 3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE BACTERIANA

O ensaio de viabilidade bacteriana foi realizado na Divisão de Biologia Celular e Molecular da Faculdade São Leopoldo Mandic (Campinas, SP). Foram seguidas as seguintes etapas, conforme descritas por LEMOS et al (2021):

1. Cultivo das cepas de *Streptococcus mutans* em caldo BHI estéril a 37°C por 18 h;
2. Centrifugação da suspensão bacteriana a 2200 rpm a 18°C por 5 min, obtendo-se a concentração microbiana de  $12 \times 10^8$  células/ml;
3. Cúltivo das bactérias nas amostras G1 ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) e G2 (GO) e incubação por 4 h a 37°C;
4. Enxague das amostras com 0,9% de solução salina estéril;
5. Utilização do kit *BacLight Live/Dead (Molecular Probe, OR, EUA)* para o teste de viabilidade bacteriana. A coloração *live/dead* foi preparada diluindo 1  $\mu\text{l}$  de SYTO 9 (componente de coloração A) e 1  $\mu\text{l}$  de iodeto de propídio (componente de coloração B) em 3 ml de água destilada. Setenta  $\mu\text{l}$  do reagente foi distribuída em cada superfície e as amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente. Uma lâmina de vidro coberta com óleo (componente C) foi posicionada na superfície e armazenada em câmara escura a 4°C até o processamento posterior;
6. Avaliação das amostras por meio do microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha) com ampliação de 400X. A excitação / comprimentos de onda de emissão do SYTO 9 foi de 480 / 500 nm e do iodeto de propídio foi de 490 / 635 nm.
7. Determinação da viabilidade bacteriana em cada amostra por meio da medição das zonas verde e vermelha, as quais indicam células vivas e mortas, respectivamente. Foi utilizado o *software ImageJ (National Institute of Health, NIH, EUA)* para a

contagem das células bacterianas (em unidades arbitrárias - UA, e em porcentagem) para cada corante em relação à área total de cada amostra.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

#### 4.1.1 Amostras de submicropartículas de óxido de cobre I

Os resultados obtidos mostraram que a eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  com 5V durante 15 min (G1.5.15) permitiu obter uma superfície mais homogênea e em maior percentual de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  (Figura 15). O aumento da tensão ou do tempo não aumentou o percentual de SMPs depositadas (Figura 16); há necessidade de combinação da tensão e do tempo. GRECCO (2020) referenciou que o potencial de deposição do  $\text{Cu}_2\text{O}$  (5V) é menor do que o do Cu metálico (8V), corroborando o resultado observado na caracterização da amostra G1.5.15, na qual verificou-se a melhor eletrodeposição.

Observou-se, ainda, que os tamanhos das partículas do  $\text{Cu}_2\text{O}$  variaram em torno de 878 a 4.600 nm, sendo que a amostra G1.5.15 apresentou as menores partículas (Figura 17). Em geral, as células bacterianas são menores que 2.000 nm. A maioria das células bacterianas tem membranas celulares que contêm poros com tamanho nanométrico. A propriedade bactericida do  $\text{CuO}$  depende de seu tamanho, estabilidade e concentração adicionados ao meio de crescimento, uma vez que isso proporciona maior tempo de retenção para a interação com as NPs bacterianas (19). Esses fatores ressaltam a importância em obter partículas de menores tamanhos e em maior quantidade, como no caso da amostra G1.5.15.

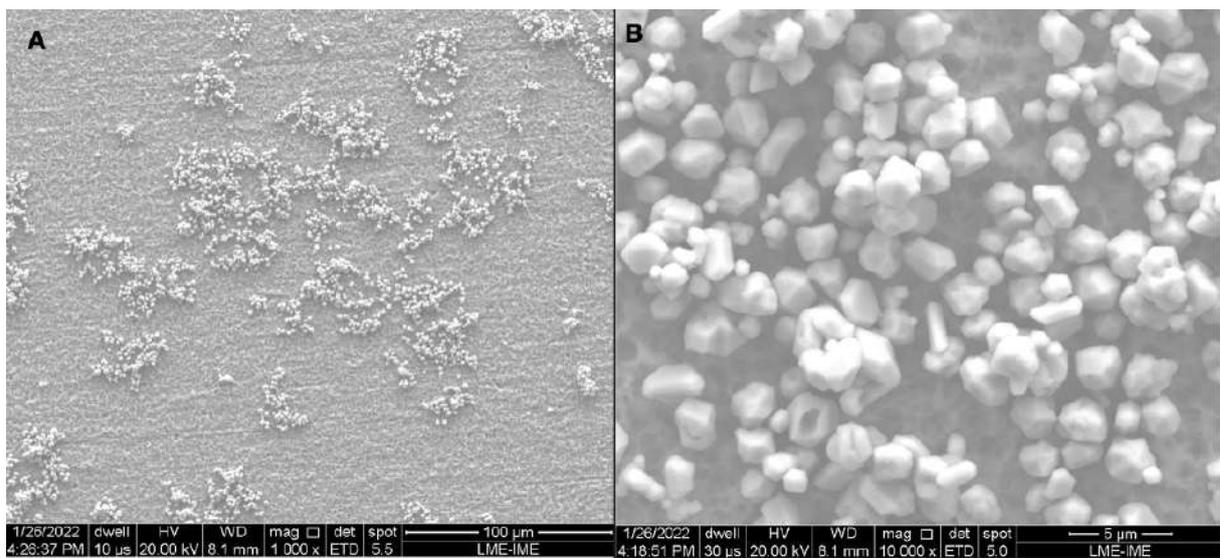


Figura 15 – Morfologia da amostra G1.5.15. A) Aumento de 1000x; B) Aumento de 10000x.

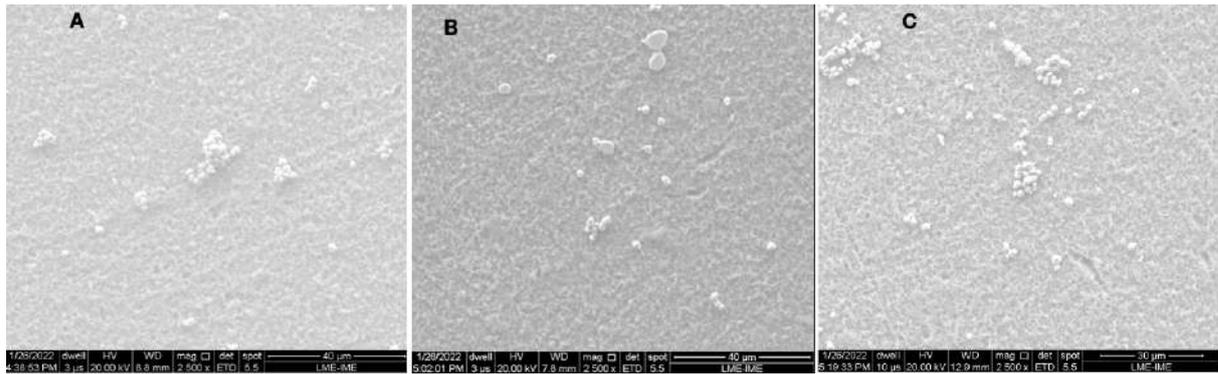


Figura 16 – Morfologias das amostras com aumento de 2500x. A) G1.7.15; B) G1.9.15; C) G1.9.20.

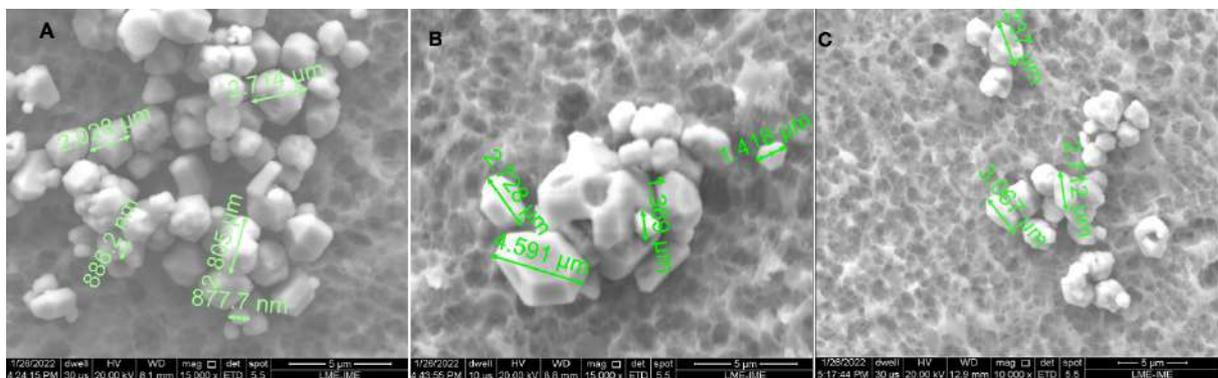


Figura 17 – Tamanho das partículas. A) G1.5.15; B) G1.7.15; C) G1.9.20.

#### 4.1.2 Amostra de óxido de Grafeno

A eletrodeposição de GO (G2) entre 8 e 11V durante 10 min mostrou resultado satisfatório em relação à homogeneidade e quantidade de G na amostra (Figura 18). YUSONG TU et al (2013) afirmaram que a atividade antibacteriana de G é proporcional ao aumento de tamanho e de sua concentração.

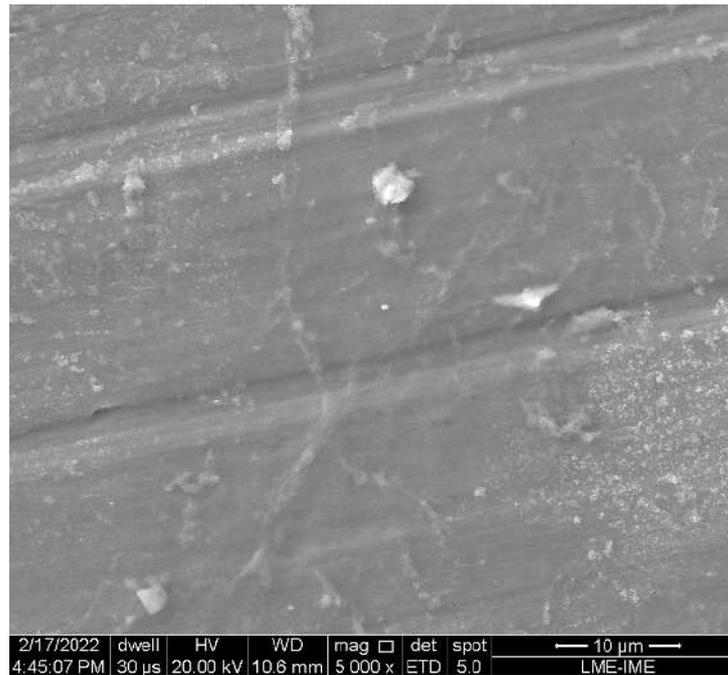


Figura 18 – Morfologia da amostra G2 com aumento de 5000x.

#### 4.1.3 Amostras de óxido de grafeno e submicropartículas de óxido de cobre I

Comparando-se as Figuras 19 e 20, a eletrodeposição de GO seguida de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  (G3.GO.Cu) mostrou-se com maior concentração de GO e  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ , tornando-se a referência para este estudo.

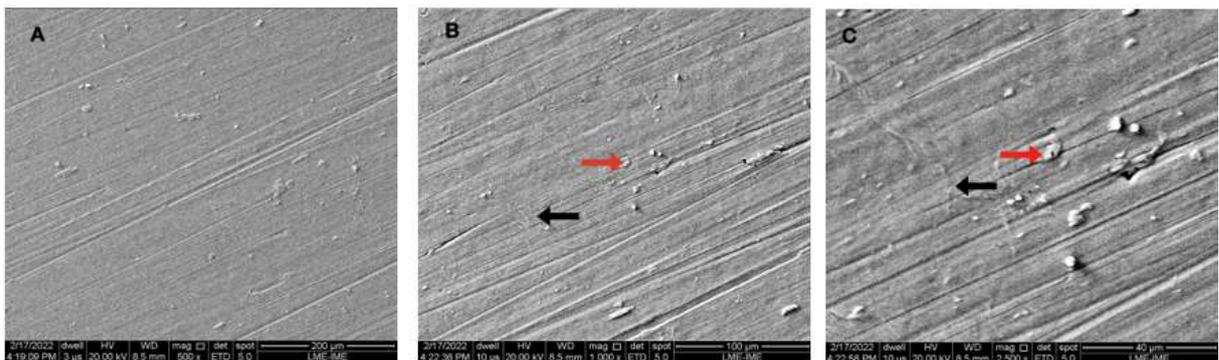


Figura 19 – Morfologia da amostra G3.Cu.GO. A) Aumento de 500x; B) Aumento de 1000x; C) Aumento de 2500x. Seta vermelha:  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ . Seta preta: GO.

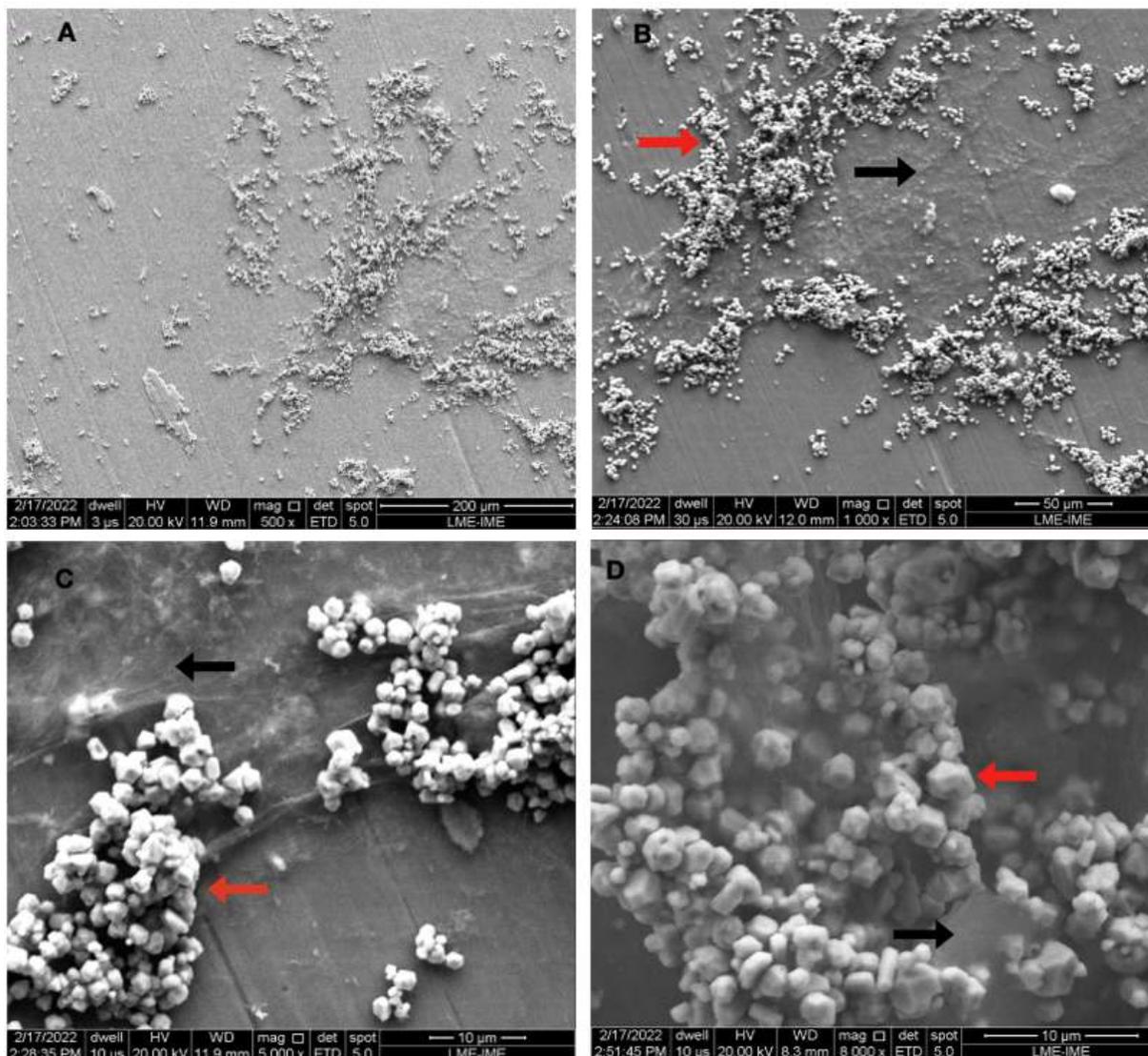


Figura 20 – Morfologia da amostra G3.GO.Cu. A) Aumento de 500x; B) Aumento de 1000x; C) Aumento de 5000x; D) Aumento de 8000x. Seta vermelha:  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ . Seta preta: GO.

## 4.2 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA

No espectro apresentado na Figura 21, pode-se observar que a amostra analisada (G2) possui predomínio dos elementos Ti, Vanádio (V), Alumínio (Al), havendo também a presença de Oxigênio (O), Enxofre (S) e Carbono (C). Na Figura 22 (G3.Cu.GO), a amostra apresenta, em uma escala de maior para menor quantidade, os elementos Ti, Cu, V, Al e C. Na Figura 23 (G3.GO.Cu), a sequência de Cu, Ti, O, Ca (cálcio), V e C. Verifica-se maior quantidade de Cu em G3.GO.Cu em relação à G3.Cu.GO, como já observada nas imagens por MEV.

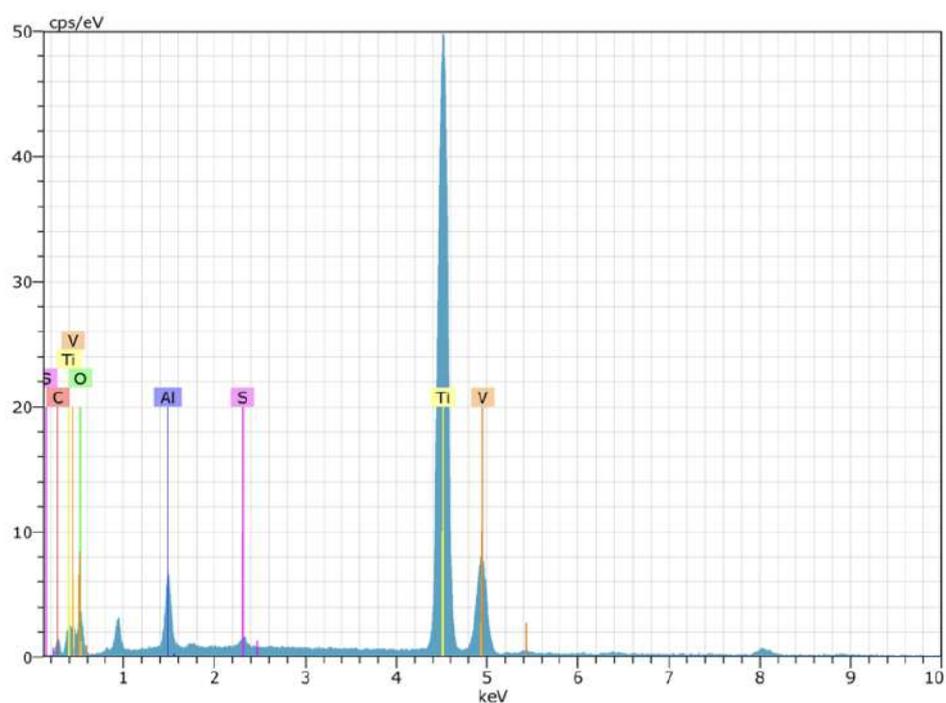


Figura 21 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com GO (G2).

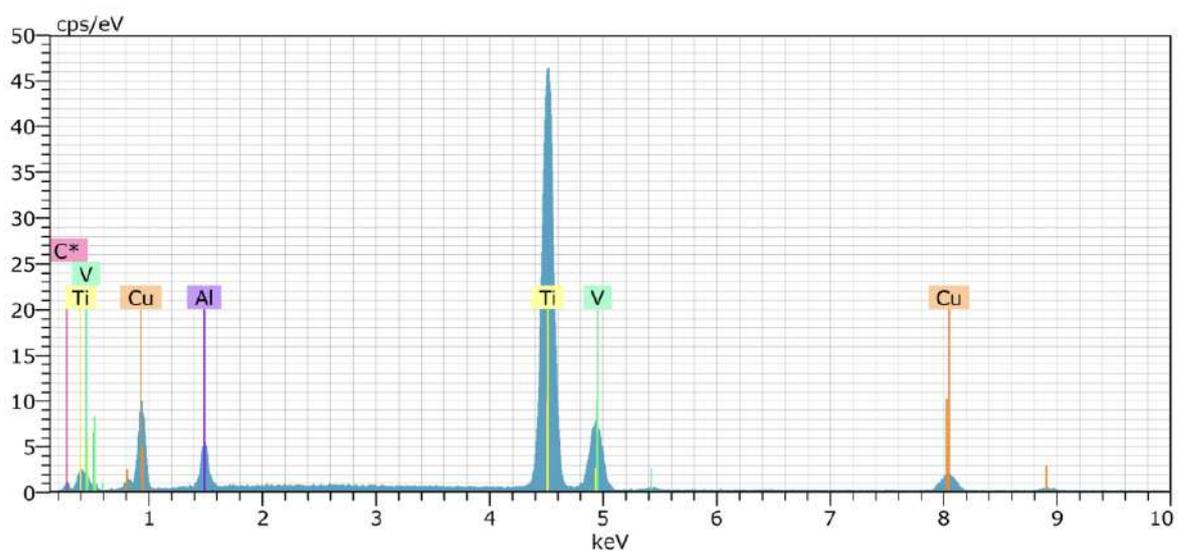


Figura 22 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com Cu<sub>2</sub>O seguido de GO (G3.Cu.GO).

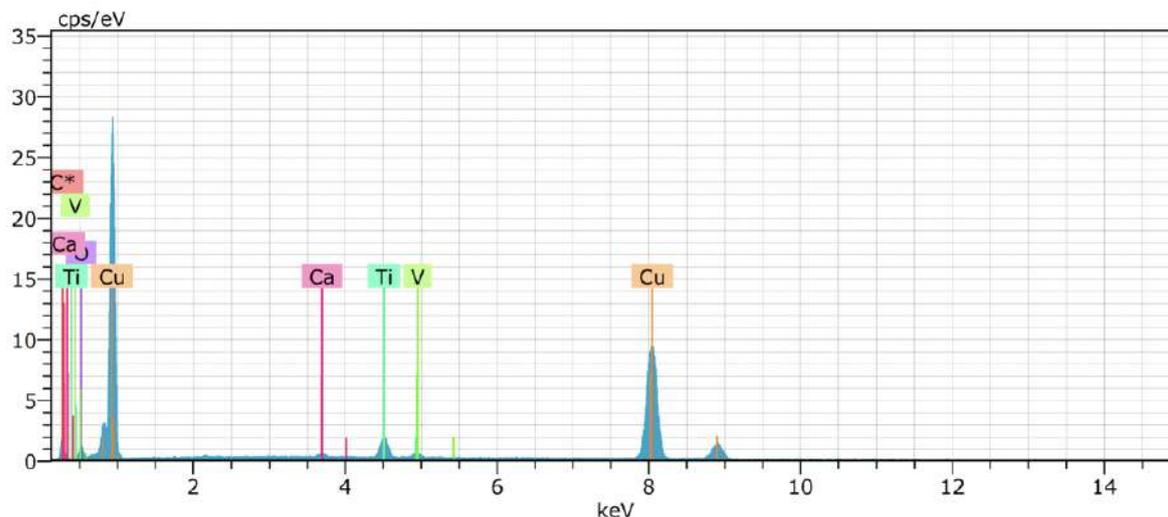


Figura 23 – Microanálise qualitativa de elementos químicos presentes na amostra com GO seguido de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3.GO.Cu).

### 4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Através das bandas dos espectros de FTIR-ATR, observadas na Figura 24, pode-se identificar os grupos funcionais presentes em cada amostra.

O espectro FTIR de  $\text{CuO}$  mostra picos em torno de  $437$ ,  $516$  e  $590\text{ cm}^{-1}$  (31). As vibrações de estiramento de ligações  $\text{Cu}_2\text{-O}$  de partículas  $\text{Cu}_2\text{O}$  são encontradas nas faixas entre  $500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  (32, 33, 34) e  $1100\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  (33). Nos espectros dos grupos G1 e G3 pode-se observar um pico entre  $600$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  e três entre  $1100\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ , confirmando a eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Na Tabela 1 estão apresentadas as principais bandas encontradas no espectro referente ao GO com suas respectivas atribuições (35, 36).

Tabela 1 – Principais bandas apresentadas no espectro FTIR pelo GO.

BANDAS ( $\text{cm}^{-1}$ )	ATRIBUIÇÕES
3600-3400	Grupamentos hidroxílicos
1720	Ligação C=O
1580-1620	Deformação de estiramento da ligação C=C de anel aromático
1400	Deformação angular da ligação C-O-H
1200-1260	Deformação de estiramento assimétrica da ligação C-O-C
1100-1010	Deformação de estiramento normal de C-O de álcoois ou fenóis
900-800	Deformação angular de C-H fora do plano do anel
803	Anel aromático para-substituído
662	Deformação C-H de alceno

Nos espectros de GO dos grupos G2 (GO) e G3 (GO + Cu<sub>2</sub>O) foram identificados os picos abaixo discriminados:

- 650 cm<sup>-1</sup>: deformação C-H do alceno;
- 800 cm<sup>-1</sup>: anel aromático para-substituído;
- 900 cm<sup>-1</sup>: deformação angular do C-H fora do plano do anel;
- 1100 cm<sup>-1</sup>: deformação de estiramento normal de C-O;
- 1200-1260 cm<sup>-1</sup>: deformação de estiramento da ligação C-O-C;
- 1400 cm<sup>-1</sup>: deformação angular da ligação C-O-H;
- 1500 cm<sup>-1</sup>: deformação de estiramento da ligação C=C de anel aromático;
- 1700 cm<sup>-1</sup>: ligação C=O.

Verifica-se também nos espectros analisados a presença de bandas na faixa de 2280-2400 cm<sup>-1</sup> correspondentes à vibração de estiramento do grupo C=O, oriundo do CO<sub>2</sub> atmosférico (37, 38). Foram identificados picos em torno 1150 cm<sup>-1</sup> (37) e 3000 cm<sup>-1</sup> que podem ser atribuídos à vibração de estiramento de grupos -OH de moléculas de água adsorvidas do meio ambiente (32). Outro pico em 1600 cm<sup>-1</sup> está relacionado à vibração de flexão H-O-H pela presença de H<sub>2</sub>O (37).

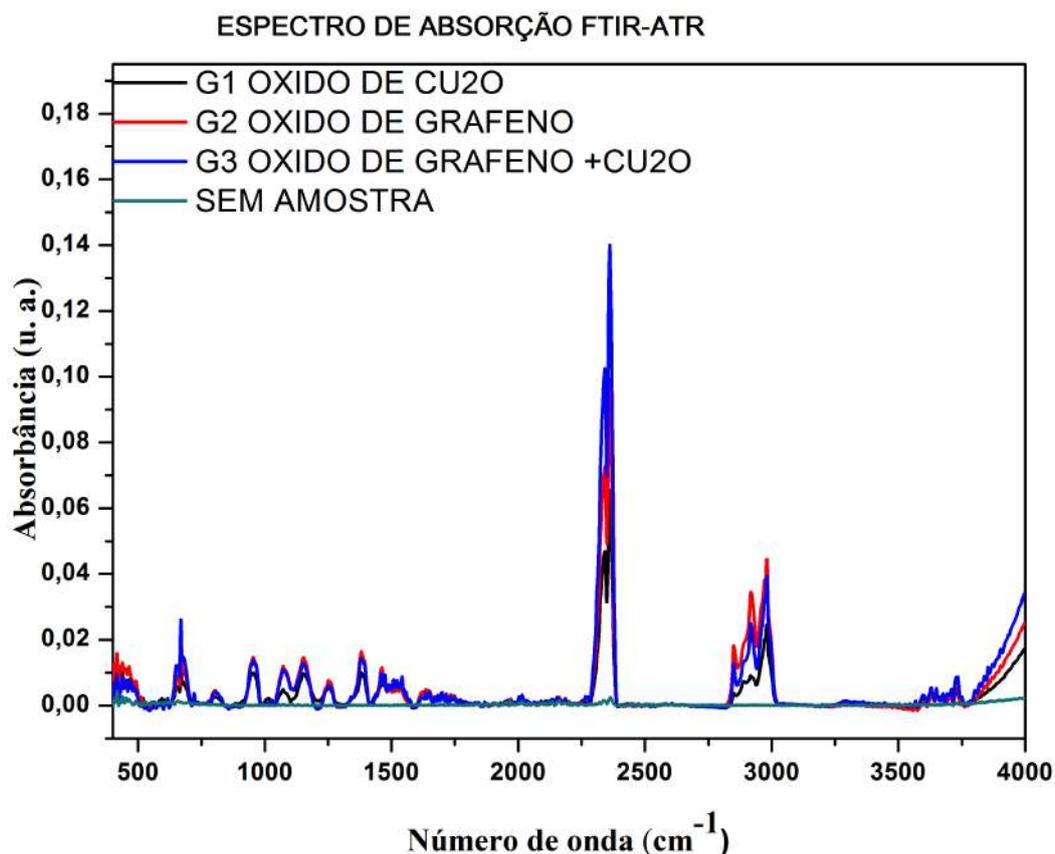


Figura 24 – Espectros de absorção FTIR-ATR das amostras com revestimento de Cu<sub>2</sub>O (G1), de GO (G2) e de GO seguido de Cu<sub>2</sub>O (G3).

## 4.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN

O espectro Raman do grafeno possui dois picos bem característicos, a banda G, referente ao estiramento da ligação CC, em aproximadamente 1580 cm<sup>-1</sup> e a banda 2D ou G' em torno de 2700 cm<sup>-1</sup>. Quando a estrutura cristalina é imperfeita, com a presença de defeitos, surge a banda D com uma frequência em aproximadamente 1350 cm<sup>-1</sup> (39). Desta forma, no espalhamento Raman de primeira ordem, as espectroscopias da grafite e do GO apresentam duas bandas predominantes conhecidas como banda D (desordem) e G (gráfrica). Na grafite, a banda D encontra-se em aproximadamente 1360 cm<sup>-1</sup> e a máxima intensidade da banda G ocorre em aproximadamente 1585 cm<sup>-1</sup>, sendo uma característica da estrutura gráfrica ordenada (40). Com a introdução de grupos oxigenados na rede cristalina formando carbonos hibridizados, o GO apresenta a banda D em torno de 1200 a 1400 cm<sup>-1</sup> (36, 40), com aumento de sua intensidade, indicativo de muitos defeitos na estrutura cristalina pelo processo de oxidação (40). A banda G, por volta de 1500 a 1600 cm<sup>-1</sup> (36, 40), está associada à ordenação da estrutura gráfrica em que se verifica o

tamanho médio dos agregados ou às regiões de hibridização  $sp^2$  relacionadas com a banda D. Há também a presença de espalhamento Raman de segunda ordem, em torno de  $2908\text{ cm}^{-1}$ , chamada de 2D (40).

A Figura 25 mostra os resultados das análises dos espectros Raman nas amostras G2 (GO) e G3 (GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Foram observadas as presenças das bandas D em torno de  $1340\text{ cm}^{-1}$  e G em aproximadamente  $1600\text{ cm}^{-1}$ , conforme relatado por ALMEIDA, SANTOS e EDWARDS (2021), o que confirma que os materiais analisados são GO.

Enfatiza-se que G2 (GO) apresenta a banda G mais intensa que G3 (GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$ ), como demonstrado na Figura 26. De acordo com LEAL (2016), observa-se que a intensidade do pico G aumenta à medida que novas camadas são acrescentadas. Ou seja, quanto maior a espessura, maior a intensidade do pico. Percebe-se, nas Figuras 27 e 28, a correlação das intensidades correspondentes às diferentes espessuras do GO, bem como a boa distribuição desse material nas amostras.  $I_D$  e  $I_G$  indicam as intensidades das bandas D e G, respectivamente.

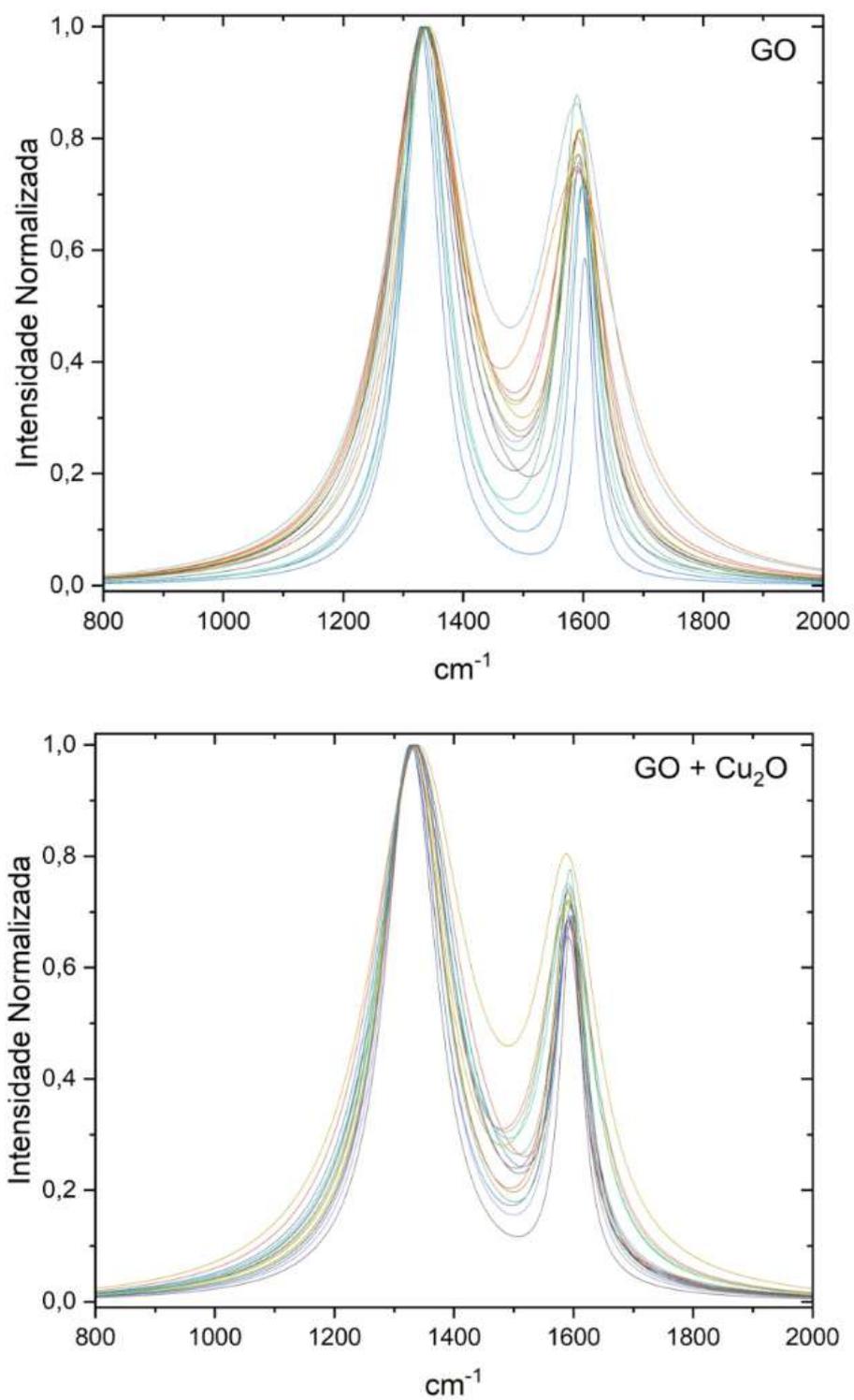


Figura 25 – Espectroscopias Raman das amostras com revestimento de GO (G2) e de GO seguido de Cu<sub>2</sub>O (G3).

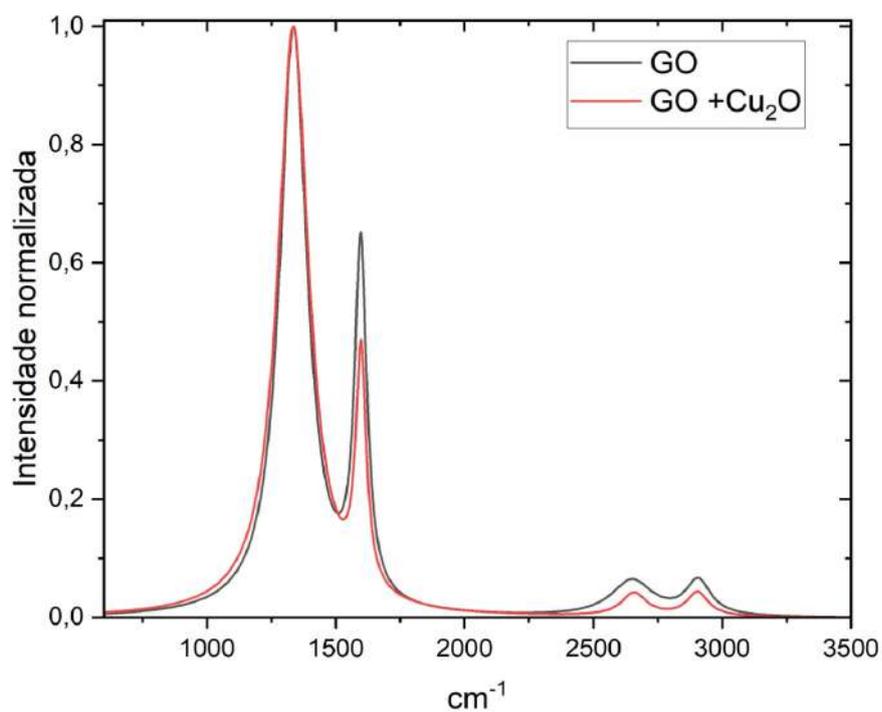


Figura 26 – Sobreposição das espectroscopias Raman das amostras com revestimento de GO (G2) e de GO seguido de Cu<sub>2</sub>O (G3).

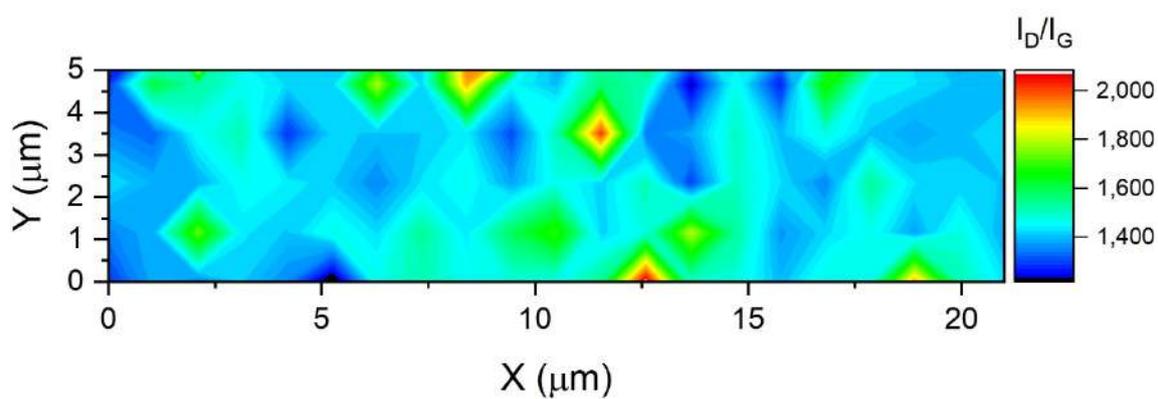


Figura 27 – Mapeamento Raman da amostra com revestimento de GO (G2). As regiões em vermelho indicam defeitos na amostra.

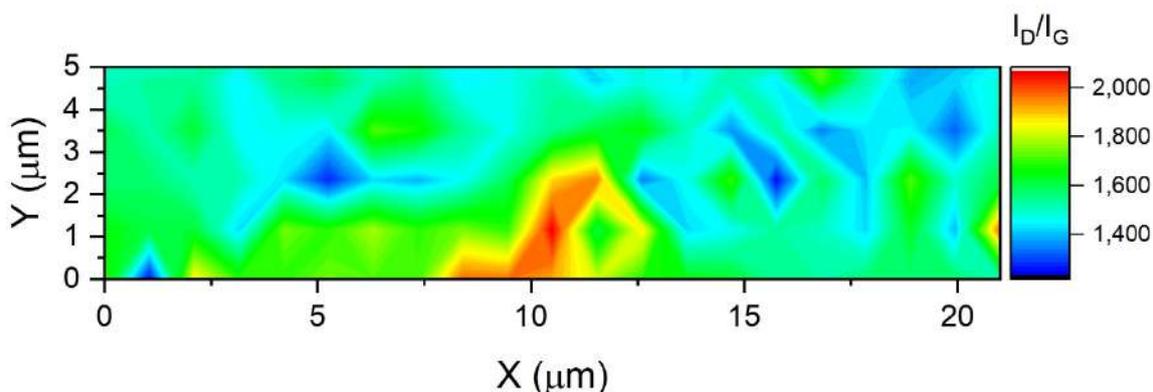


Figura 28 – Mapeamento Raman da amostra com revestimento de GO seguido de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3). As regiões em vermelho indicam defeitos na amostra.

## 4.5 RUGOSIDADE

Foram realizadas as análises estatísticas ANOVA (análise da variância entre os grupos) e TUKEY (teste de comparação de média) dos parâmetros de amplitude ( $R_a$  e  $R_q$ ) e espaçamento ( $P_c$  e Vales) das amostras de Ti, conforme descritas nas Tabelas 2 a 9. As análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5%. Em todos os parâmetros avaliados os valores de F foram maiores que o F crítico (Tabelas 2, 4, 6 e 8), o que permitiu rejeitar a hipótese nula. Conceitualmente, a hipótese nula significa que a média de todas as amostras são iguais, ou seja, não há nenhuma variação em média entre os grupos.

Com relação à superfície do implante, foi observada que a progressão da peri-implantite é mais acentuada nos implantes com superfície rugosa do que nas lisas (8). A influência da rugosidade da superfície sobre a formação do biofilme pode ser explicada por vários fatores, incluindo a área aumentada para adesão de microorganismos e a dificuldade na limpeza das superfícies rugosas, o que possibilita o rápido crescimento do biofilme pela multiplicação das espécies bacterianas residentes (5). A rugosidade da superfície maior que  $0,4 \mu\text{m}$  aumenta a afinidade dos microorganismos e o risco de doenças peri-implantares (13). Desta forma, é importante que a interface tecido mole/implante apresente uma superfície polida para melhor selamento epitelial (41).

A superfície do implante tratada com ácido apresenta uma morfologia superficial que varia com as condições do tratamento (tipo de ácido, porcentagem de composição química, tempo e temperatura). Com o ataque ácido é possível controlar a rugosidade, o número, o tamanho e a distribuição das cavidades em escalas micrométricas e nanométricas. Este tipo de tratamento pode ser realizado por imersão dos implantes em soluções de ácidos sulfúrico e clorídrico ou ácidos fluorídrico e nítrico ou somente ácido nítrico (42).

MORALES e ELIAS (2021) realizaram o tratamento da superfície de amostras de Ti grau 5 com solução de ácidos sulfúrico e clorídrico. Em seus experimentos, os autores mantiveram as porcentagens químicas dos ácidos, utilizaram o tempo de 15 min, mas variaram a temperatura entre 60° C e 80° C. Na condição de 80° C, obtiveram rugosidade similar a do cimento do dente (0,099  $\mu\text{m}$ ), adequada para a adesão de fibroblastos nas superfícies dos componentes protéticos para próteses suportadas por implantes. Considerando que o tratamento não removeu os sulcos oriundos da usinagem, é possível o direcionamento do crescimento de colágeno em forma circular na superfície do pilar. As fibras colágenas fornecem resistência ao tecido conjuntivo e sua orientação deve ser a mais similar possível à condição natural.

Para avaliar a influência da concentração dos ácidos e do tempo de tratamento na rugosidade, aumentou-se discretamente a concentração da solução ácida e reduziu-se o tempo, mantendo a temperatura em 80° C. As médias dos parâmetros de rugosidade Ra ( $\mu\text{m}$ ) foram de  $0,962 \pm 0,316$  (G1);  $1,457 \pm 0,585$  (G2);  $0,983 \pm 0,349$  (G3) e  $0,562 \pm 0,128$  (G4). Estes resultados mostraram valores acima de 0,4  $\mu\text{m}$ , não sendo ideal para os pilares dos implantes odontológicos. Percebeu-se que a porcentagem da composição química dos ácidos influenciou significativamente no padrão de rugosidade, mesmo com a diminuição do tempo.

Com o objetivo de obter um padrão de rugosidade menor que 0,4  $\mu\text{m}$ , para o tratamento da superfície das amostras com os ácidos sulfúrico e clorídrico foram replicadas as mesmas condições utilizadas por MORALES e ELIAS (2021), no tempo de 15 min a 80° C. Nestas condições, observou-se que as médias da rugosidade Ra ( $\mu\text{m}$ ) nos grupos (Tabela 2) foram de  $0,222 \pm 0,150$  (G1);  $0,120 \pm 0,005$  (G2);  $0,094 \pm 0,018$  (G3) e  $0,175 \pm 0,010$  (G4). Houve diferença significativa entre os grupos G1 X G4 e G2 X G3, com  $p < 0,05$  (Tabela 3). As médias da rugosidade Rq ( $\mu\text{m}$ ) (Tabela 4) foram de  $0,372 \pm 0,028$  (G1);  $0,169 \pm 0,011$  (G2);  $0,154 \pm 0,036$  (G3) e  $0,230 \pm 0,018$  (G4). Somente os grupos G2 e G3 diferiram significativamente entre si ( $p = 0,0128$ ;  $p < 0,05$ ), como observado na Tabela 5.

Segundo ELIAS, ROESTEL e GIORDANI (2019), a superfície dos pilares com baixa rugosidade facilita a adesão dos tecidos moles e minimiza a adsorção e adesão de biofilme. Esta característica permite um melhor selamento da mucosa e minimiza a peri-implantite. Como as superfícies de todas as amostras foram menores que 0,4  $\mu\text{m}$ , mostraram-se adequadas para obter melhor selamento entre o pilar e os tecidos moles (Figura 29). Enfatiza-se que o grupo G3 (GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$ ) apresentou valor médio de Ra ( $0,094 \pm 0,018$   $\mu\text{m}$ ) similar à porção cervical da raiz do dente (0,099  $\mu\text{m}$ ), conforme analisado por MORALES e ELIAS (2021).

A média de Pc (Tabela 6) foi de  $553 \pm 105$  (G1);  $449 \pm 42$  (G2);  $402 \pm 77$  (G3) e  $395 \pm 45$  (G4), enquanto a do número de vales (Tabela 8) foi de  $160 \pm 38$  (G1);  $254$

$\pm 49$  (G2);  $234 \pm 24$  (G3) e  $303 \pm 12$  (G4). No parâmetro Pc, os grupos G1 X G3 e G1 X G4 foram significativamente diferentes entre si (Tabela 7). No número de vales, houve diferença significativa entre os grupos G1 X G2, G1 X G3 e G3 X G4 (Tabela 9).

A interação das células com o implante é afetada pela topografia em níveis macroscópicos e pela rugosidade em nível microscópico. A princípio, espera-se que o aumento da área superficial do implante aumente o número de sítios para as células se ligarem e facilite o crescimento dos tecidos. Contudo, o efeito da microestrutura superficial na adesão celular depende do tipo de célula. Desta forma, caso o implante possua grandes número de picos ou de vales e este apresente superfície lisa, os fibroblastos (células mais comuns do tecido conjuntivo) terão melhor fixação. Entretanto, macrófagos (células de defesa do tecido conjuntivo), células osteoblásticas (células responsáveis pela produção da matriz óssea) e epiteliais (que formam o tecido epitelial), que exibem rugofilia, não conseguirão aderir ao implante (45). Quando as distâncias entre os picos forem aproximadamente iguais ou maiores que o tamanho da bactéria, sua adesão será favorecida (46). G1 apresentou o maior número de picos, seguido dos grupos G2, G3 e G4. Quanto maior a densidade de picos, menor a distância entre eles, diminuindo a adesão do biofilme.

Tabela 2 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Ra para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4)

<b>ANOVA</b>				
Ra ( $\mu\text{m}$ )				
<b>AMOSTRAS</b>	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	0,222	0,150	97,9439	3,2389
<b>GO</b>	0,120	0,005		
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,094	0,018		
<b>SR</b>	0,175	0,010		

Tabela 3 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Ra para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

<b>TUKEY</b>		
Ra ( $\mu\text{m}$ )		
<b>GRUPOS</b>	p-valor	Significância
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO</b>	5,8835E-07	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	1,7859E-06	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0005	Sim
<b>GO X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0128	Sim
<b>GO X SR</b>	4,1599E-06	Não
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	1,8867E-05	Não

Tabela 4 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Rq para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

<b>ANOVA</b>				
Rq ( $\mu\text{m}$ )				
<b>AMOSTRAS</b>	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	0,372	0,028	256,2684	3,2389
<b>GO</b>	0,169	0,011		
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,154	0,036		
<b>SR</b>	0,230	0,018		

Tabela 5 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Rq para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

<b>TUKEY</b>		
Rq ( $\mu\text{m}$ )		
<b>GRUPOS</b>	p-valor	Significância
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO</b>	4,7669E-08	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	6,9994E-08	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	4,6264E-07	Não
<b>GO X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0128	Sim
<b>GO X SR</b>	4,1599E-06	Não
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	1,8867E-05	Não

Tabela 6 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Pc para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

<b>ANOVA</b>				
Pc				
<b>AMOSTRAS</b>	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	553	105	5,1044	3,2389
<b>GO</b>	449	42		
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	402	77		
<b>SR</b>	395	45		

Tabela 7 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Pc para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

<b>TUKEY</b>		
Pc		
<b>GRUPOS</b>	p-valor	Significância
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO</b>	0,0738	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0321	Sim
<b>Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0149	Sim
<b>GO X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,2669	Não
<b>GO X SR</b>	0,0866	Não
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,8646	Não

Tabela 8 – Análise estatística ANOVA do parâmetro Vales para as amostras de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1), GO (G2), GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3) e SR - sem revestimento (G4).

ANOVA				
Vales				
AMOSTRAS	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
$\text{Cu}_2\text{O}$	160	38	15,3821	3,23889
GO	254	49		
GO + $\text{Cu}_2\text{O}$	234	24		
SR	303	12		

Tabela 9 – Análise estatística TUKEY do parâmetro Vales para as amostras de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1), GO (G2), GO +  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3) e SR - sem revestimento (G4).

TUKEY		
Vales		
GRUPOS	p-valor	Significância
$\text{Cu}_2\text{O}$ X GO	0,0097	Sim
$\text{Cu}_2\text{O}$ X GO + $\text{Cu}_2\text{O}$	0,0067	Sim
$\text{Cu}_2\text{O}$ X SR	4,4761E-05	Não
GO X GO + $\text{Cu}_2\text{O}$	0,4272	Não
GO X SR	0,0599	Não
GO + $\text{Cu}_2\text{O}$ X SR	0,0004	Sim

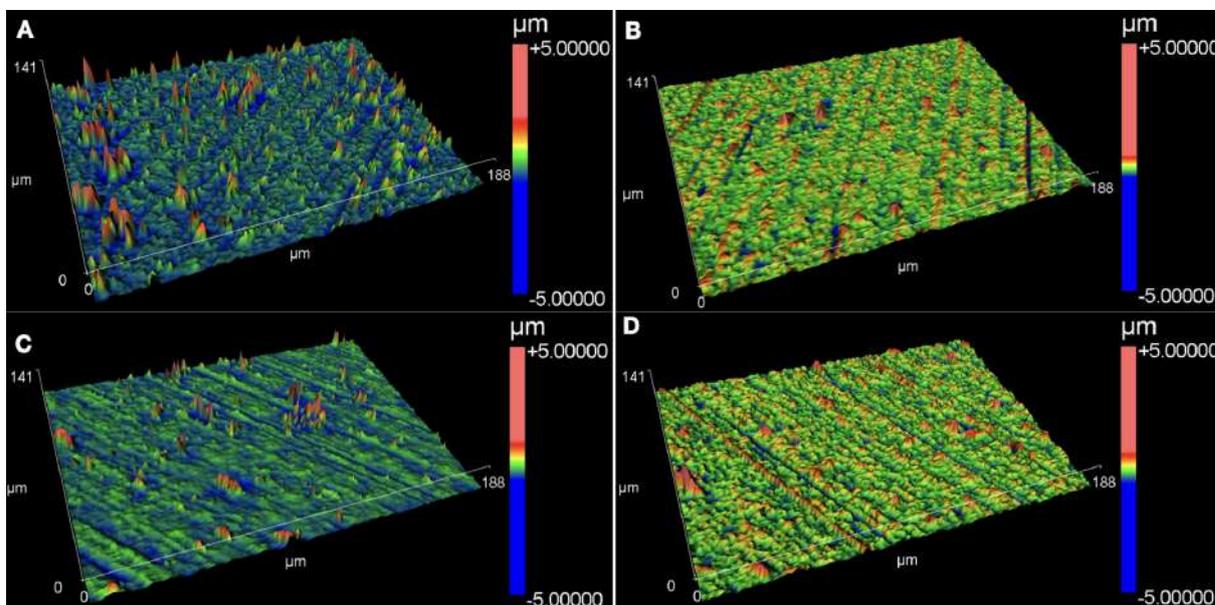


Figura 29 – Interferometria mostrando a morfologia das amostras de Ti grau 5. A) Revestimento de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1); B) Revestimento de GO (G2); C) Revestimento de GO seguido de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3); D) Sem revestimento. A cor azul indica a presença de vales na superfície e a cor vermelha indica a presença de picos.

## 4.6 MOLHABILIDADE

O ângulo entre a interface da superfície e a gota (ângulo  $\theta$ ), observado na Figura 30, relaciona a capacidade do líquido não molhar ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ) ou molhar ( $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ) a superfície, sendo hidrofóbico ou hidrofílico, respectivamente (47). A hidroflicidade das superfícies dos componentes protéticos de implantes dentários é um dos fatores que influencia na adesão de fibroblastos. A organização perpendicular das fibras de colágenos em relação à interface transmucosa pode ser alcançada em superfícies hidrofílicas (13). Entretanto, nas superfícies hidrofóbicas, com ângulos mais altos, a colonização de microorganismos será menor. Logo, essas identificações de propriedades topográficas serão essenciais no sucesso de implantes, principalmente em pacientes em algum estágio ou risco de doença periodontal (41).

A energia da superfície medida pela molhabilidade envolve as interações celulares com o biomaterial, afetando vários eventos biológicos a nível celular e subcelular, como a adsorção de proteínas, adesão e espalhamento celulares. A manutenção da arquitetura da camada de células endoteliais requer adesões estáveis não somente entre células vizinhas, mas também entre células e matriz extracelular. A molhabilidade do substrato controla a adesão e a organização do citoesqueleto de células endoteliais, tendo um impacto na habilidade das células em estabelecer coesões célula-célula, devido à acessibilidade de domínios específicos de adsorção de proteínas (48). Foi demonstrado que em substrato hidrofóbico ocorreu maior coesão célula-célula. Em contrapartida, em substrato hidrofílico predominou a adesão celular ao substrato (49).

Para avaliação estatística do ângulo de contato e da energia de superfície nos diferentes grupos, foram realizadas as análises ANOVA seguida de TUKEY, com nível de significância de 5%, como pode ser verificado nas tabelas 10 a 13. O F foi maior que o F crítico em ambos parâmetros (Tabelas 10 e 12).

As médias dos ângulos de contato (Tabela 10) foram de  $88,3 \pm 4,89$  (G1);  $74,48 \pm 3,0$  (G2);  $76,7 \pm 5,55$  (G3) e  $57,76 \pm 9,72$  (G4). Não houve diferença significativa entre os grupos G1 X G3 e G2 X G3 (Tabela 11). Os resultados indicam um comportamento mais hidrofílico para a superfície sem revestimento (G4), sendo esta mais adequada para a adesão de fibroblastos e organização das fibras colágenas. Em contrapartida, a amostra com deposição apenas de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1) foi a que apresentou menor hidroflicidade (maior ângulo de contato), sendo a mais indicada para o revestimento do pilar que objetiva o efeito bactericida.

Com base na Tabela 12, as médias das energias de superfície ( $\text{mJ}/\text{m}^2$ ) foram de  $2,16 \pm 6,23$  (G1),  $19,52 \pm 3,67$  (G2),  $16,73 \pm 6,84$  (G3) e  $38,57 \pm 10,51$  (G4). Todos os grupos diferiram significativamente entre si (Tabela 13). Implantes com alta energia de superfície (acima de  $30 \text{ mJ}/\text{m}^2$ ) adsorvem macromoléculas mais facilmente e possuem

maior número de sítios favoráveis à adesão celular, importante para a osseointegração. Entretanto, verificou-se que nas superfícies com baixa energia (entre 20 e 30 mJ/m<sup>2</sup>) ocorreu a maior presença de fibroblastos, células responsáveis pela integridade do tecido conjuntivo (42). ELIAS, ROESTEL e GIORDANI (2019) acrescentaram que o tecido conjuntivo ao redor do implante não serve apenas para evitar a infiltração de bactérias orais, mas também para suprir todos os tecidos com nutrientes transportados pelo sangue. É importante que o tecido mole peri-implantar desempenhe funções semelhantes à dos tecidos periodontais.

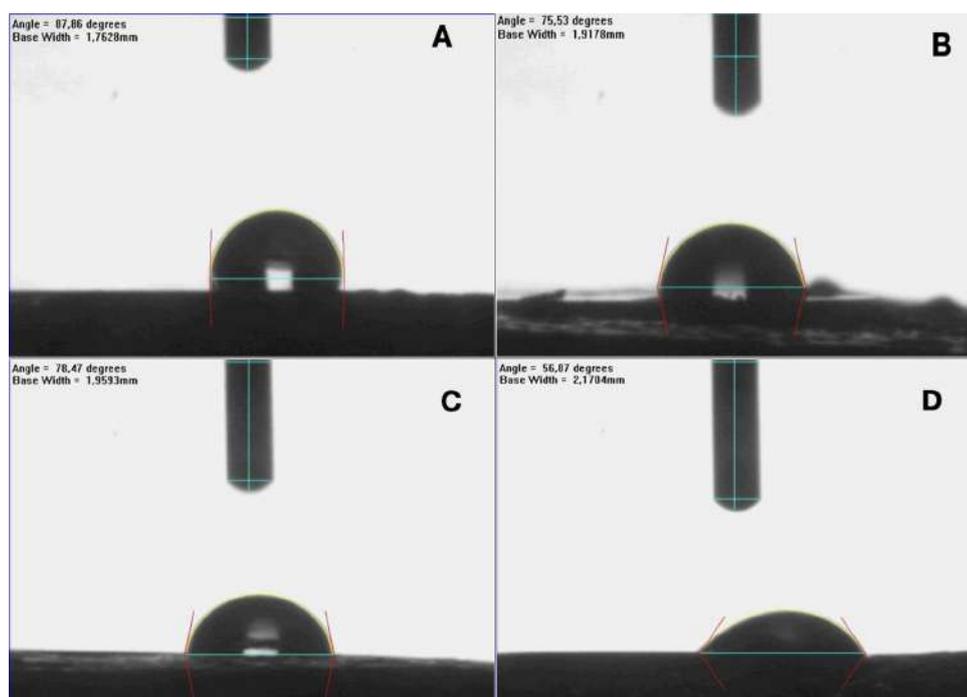


Figura 30 – Imagens representativas das gotas d água depositadas nas amostras. O ângulo de contato e as linhas de referência são mostradas nas figuras. A) Revestimento de Cu<sub>2</sub>OSMPs (G1); B) Revestimento de GO (G2); C) Revestimento de GO seguido de Cu<sub>2</sub>OSMPs (G3); D) Sem revestimento (G4).

Tabela 10 – Análise estatística ANOVA do ângulo de contato para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

ANOVA				
Ângulo de contato (°)				
AMOSTRAS	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	88,30	4,89	11,7554	4,0662
<b>GO</b>	74,48	3,00		
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	76,75	5,55		
<b>SR</b>	57,76	9,72		

Tabela 11 – Análise estatística TUKEY do ângulo de contato para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

TUKEY		
Ângulo de contato (°)		
GRUPOS	p-valor	Significância
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO</b>	0,0141	Sim
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0554	Não
<b>Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0083	Sim
<b>GO X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,6145	Não
<b>GO X SR</b>	0,0466	Sim
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0455	Sim

Tabela 12 – Análise estatística ANOVA da energia de superfície para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

ANOVA				
Energia de superfície (mJ/m <sup>2</sup> )				
AMOSTRAS	Média	Desvio Padrão	F	F crítico
<b>Cu<sub>2</sub>O</b>	2,16	6,23	79,0032	4,0062
<b>GO</b>	19,52	3,67		
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	16,73	6,84		
<b>SR</b>	38,57	10,51		

Tabela 13 – Análise estatística TUKEY da energia de superfície para as amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1), GO (G2), GO + Cu<sub>2</sub>O (G3) e SR - sem revestimento (G4).

TUKEY		
Energia de superfície (mJ/m <sup>2</sup> )		
GRUPOS	p-valor	Significância
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO</b>	0,0142	Sim
<b>Cu<sub>2</sub>O X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0001	Sim
<b>Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0011	Sim
<b>GO X GO + Cu<sub>2</sub>O</b>	0,0002	Sim
<b>GO X SR</b>	0,0031	Sim
<b>GO + Cu<sub>2</sub>O X SR</b>	0,0428	Sim

## 4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE BACTERIANA

O *Streptococcus mutans* é uma espécie bacteriana muito comum na cavidade oral (29). A maioria de suas cepas é hidrofóbica, mas há outras com hidrofobicidade reduzida, as quais não apresentam várias proteínas de alto peso molecular (50). É um colonizador precoce das superfícies de diferentes biomateriais, incluindo o Ti ((29). Essa colonização precoce permite a adesão de outros patógenos (16), contribuindo para a evolução das doenças peri-implantares.

Após a incubação da suspensão bacteriana de *S. mutans*, as amostras foram coradas com a coloração *live/dead*, a qual usa uma mistura de corantes de ácido nucléico fluorescente. Um deles é o corante verde SYTO 9, que cora todas as bactérias, e o outro é o corante vermelho de iodeto de propídio, que cora apenas bactérias com membranas danificadas, causando uma redução na intensidade da fluorescência SYTO 9 quando ambos os corantes estão presentes, conforme explicado por NAGANO-TAKEBE et al (2014). Assim, após a coloração *live/dead*, as bactérias com membranas celulares intactas são coradas em verde fluorescente, enquanto as bactérias com membranas danificadas são coradas em vermelho fluorescente (Figura 31). A intensidade de fluorescência foi obtida medindo-se o valor médio de cinza em relação à área total de cada amostra, usando o *software ImageJ* (16, 29). Todas as imagens apresentaram 696 x 1786 pixels (82 mm<sup>2</sup>).

Na Tabela 14 verifica-se a análise qualitativa *live/dead*. No grupo G1 (Cu<sub>2</sub>O), a contagem de células bacterianas vivas foi de 173.449 UA (correspondendo a 62,02% do total de bactérias vivas e mortas de G1) e a porcentagem de área da amostra com bactérias vivas foi de 13,95%. Para bactérias mortas, os dados correspondem a 106.211 UA (37,98% do total de bactérias vivas e mortas) e 8,54% para a porcentagem de área. No grupo G2 (GO), a contagem de cepas vivas representou 307.691 UA (57,62% do total de bactérias de G2) e a porcentagem de área 24,75%, enquanto de mortas 226.334 UA (42,38% do total) e 18,21% da área. Ao comparar os dois grupos, percebeu-se que as contagens tanto de bactérias vivas como de mortas em UA foram significativamente maiores em G2 em relação à G1. Ou seja, na superfície com deposição de GO houve maior aderência de bactérias ao mesmo tempo que proporcionou maior número de bactérias mortas. Em ambos os grupos, houve maior percentual de bactérias vivas do que de mortas, possivelmente pelo pouco tempo de incubação.

Como já mencionado, não houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2 no que tange os parâmetros de rugosidade Ra, Rq e Pc. Entretanto, ocorreu diferença nos resultados obtidos do número de vales entre os dois grupos, com G2 apresentando mais vales que G1, o que pode explicar a maior quantidade de bactérias aderidas devido à maior área de superfície.

Foi observado diferença significativa em relação à molhabilidade, com G1 sendo menos hidrofílico e apresentando menor energia superficial que G2. De acordo com BRITO et al (2021), a colonização de microorganismos, de uma maneira geral, é menor nas superfícies hidrofóbicas. McBRIDE et al (1984) esclarecem que numerosas proteínas existem dentro da parede celular bacteriana e se estendem a partir da superfície celular em estruturas chamadas de revestimentos difusos ou fibrilares. Algumas dessas proteínas podem ser hidrofóbicas ou podem possuir domínios que são ricos em aminoácidos hidrofóbicos e vice-versa, influenciando na adesividade bacteriana em diferentes superfícies. LEMOS et al (2021) são mais específicos ao afirmarem que bactérias hidrofóbicas colonizam melhor

superfícies hidrofóbicas e a mesma correlação é observada para bactérias hidrofílicas. Possuindo em sua maioria cepas hidrofóbicas, *S. mutans* deveriam ter sido encontradas em maior quantidade em G1, divergindo dos resultados deste trabalho. No entanto, McBRIDE et al (1984) relataram que há influência das condições do crescimento bacteriano na aderência de *Streptococcus*. Quando o cultivo das cepas é realizado em BHI, como nesse trabalho, as bactérias são menos hidrofóbicas quando em caldo de soja triptico, o que pode justificar a menor adesão das bactérias em G1.

Além disso, LIMA, ELIAS e MEIRELLES (2003) afirmaram que para o estudo da biocompatibilidade dos materiais precisa-se dos valores quantitativos e qualitativos do nível de energia superficial dos implantes, os quais influenciam na atração, repulsão e interações entre as superfícies do biomaterial com as proteínas, células e bactérias. Como regra geral, materiais com valores de tensão superficial superiores apresentam maior bioadesão. Observou-se que G1 apresentou energia de superfície extremamente baixa comparada com G2 e conseqüentemente sua bioadesão será menor, como observado pela contagem do número de bactérias aderidas.

A atividade bactericida do G / GO é proporcional ao aumento do tamanho e concentração de G, levando à destruição da membrana celular (plasmática) (25). O modo de ação do Cu / CuO em relação às suas propriedades biocidas está associado a danos na membrana plasmática (7) e ao aumento da permeabilidade celular, causando degradação de DNA, mitocôndria, lipídios, proteínas, dentre outros compostos (26). As NPs de Cu e de CuO são mais efetivas em atravessar as membranas, que contêm poros na faixa nanométrica (19), o que deve ter interferido na menor quantidade de bactérias mortas em G1 comparativamente a G2, uma vez que se trabalhou com SMPs de Cu<sub>2</sub>O.

LEMOS et al (2021) avaliaram a viabilidade de *S. mutans* em discos de Ticp grau 4 com superfícies usinadas, duplo ataque ácido e deposição de íons flúor, através do método *live/dead*. Os resultados obtidos variaram de  $8,34 \pm 2,48$  % a  $11,76 \pm 3,95$  % de área com bactérias vivas, enquanto de  $0,68 \pm 0,18$  % a  $1,95 \pm 0,70$  % para mortas. Verificou-se que os resultados encontrados tanto de bactérias vivas como mortas nos grupos G1 e G2 de Ti grau 5 com superfícies polidas ( $Ra < 0,4 \mu m$ ) foram superiores comparativamente ao Ticp grau 4 com superfícies rugosas. Esperava-se, no entanto, uma adesão bacteriana menor nas superfícies analisadas neste trabalho, uma vez que a baixa rugosidade diminui a afinidade dos microrganismos, como descrito por RESK et al (2018). BRUNETTE (2001) ressaltou que uma característica interessante do Ti quando comparado a outros metais usados como implantes endósseos é que existe uma possível especificidade do material para colonização bacteriana da superfície. Foi demonstrado in vitro que *Staphylococcus epidermidis* aderiu preferencialmente ao V puro e em regiões ricas com V da liga Ti4Al6V (grau 5). Concluiu-se que as interações entre metais e bactérias podem ser influenciadas pela composição química dos óxidos de superfície. Essa característica pode justificar a

adesão superior de *S. mutans* nas superfícies do Ti grau 5. A superioridade do número de bactérias mortas deste estudo, comparativamente aos resultados de LEMOS et al (2021), possivelmente deve-se à presença de  $\text{Cu}_2\text{O}$  e GO.

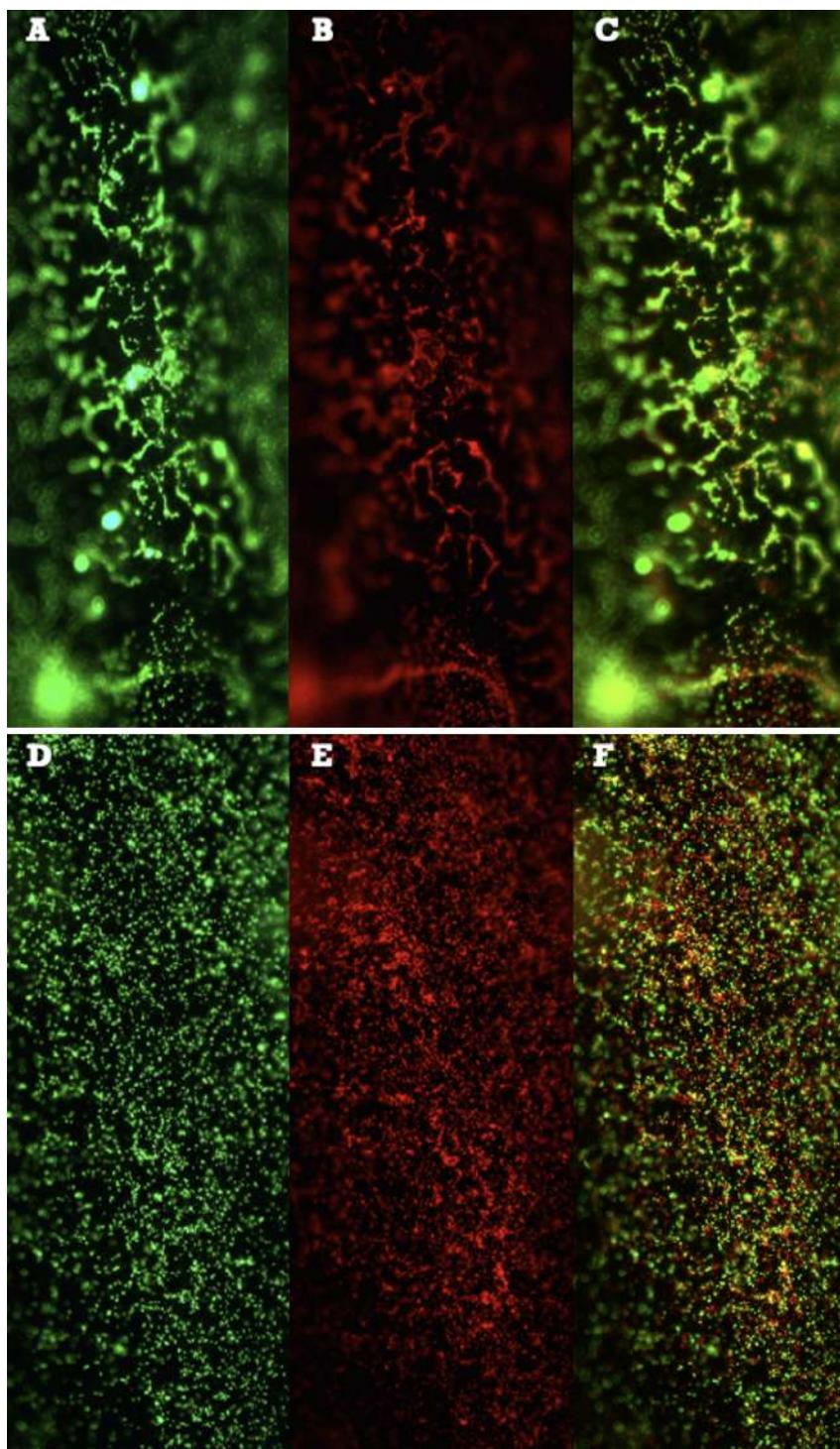


Figura 31 – Micrografias de microscopia de fluorescência de *S. mutans*. A, B e C: Ti com revestimento de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1); D, E e F: Ti grau 5 com revestimento de GO (G2). A e D: Bactérias vivas coradas com SYTO 9 (verde); B e E: Bactérias mortas coradas com iodo de propídio (vermelho); C e F: Bactérias vivas e mortas (verde e vermelho). Ampliação 100X.

Tabela 14 – Análise qualitativa *live/dead* das amostras de Cu<sub>2</sub>O (G1) e GO (G2).

GRUPOS	BACTÉRIAS VIVAS			BACTÉRIAS MORTAS		
	UA	%	% Área	UA	%	% Área
Cu <sub>2</sub> O	173.449	62,02	13,95	106.211	37,98	8,54
GO	307.691	57,62	24,75	226.334	42,38	18,21

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se chegar as seguintes conclusões:

1. A eletrodeposição de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  com 5V durante 15 min (G1.5.15) permitiu obter uma superfície mais homogênea e em maior percentual de SMPs. Os tamanhos de suas partículas também foram os menores, tornando-se mais adequados à penetração nas membranas celulares bacterianas. O aumento da voltagem ou do tempo não aumentou o percentual de SMPs depositadas;
2. A sequência de deposição de GO seguida de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3.GO.Cu) foi a que apresentou a maior concentração tanto de GO como de  $\text{Cu}_2\text{O}$ ;
3. EDS e FTIR comprovaram, respectivamente, as composições e vibrações de ligações químicas relacionadas aos revestimentos com GO e  $\text{Cu}_2\text{O}$ ;
4. A espectroscopia Raman confirmou a eletrodeposição de GO nas amostras, bem como sua boa distribuição;
5. Para a obtenção de  $R_a$  e  $R_q$  menor que  $0,4 \mu\text{m}$ , foi realizado tratamento de superfície das amostras de Ti com ácidos sulfúrico e clorídrico, por 15 min a  $80^\circ \text{C}$ . O aumento da porcentagem da composição química dos ácidos in fluência significativamente no padrão de rugosidade, mesmo com a diminuição do tempo;
6. Nos quatro grupos os valores médios de  $R_a$  e  $R_q$  encontraram-se menores que  $0,4\mu\text{m}$ , o que permite um melhor selamento da mucosa e minimiza a peri-implantite. A amostra de GO e  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3) apresentou valor médio de  $R_a$  ( $0,094 \pm 0,018 \mu\text{m}$ ) similar à porção cervical da raiz do dente ( $0,099 \mu\text{m}$ );
7. A amostra com revestimento de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1) apresentou o maior número de picos; enquanto a amostra sem revestimento (G4), a maior quantidade de vales. Quanto maior número de picos ou de vales, adicionado a uma superfície lisa, melhor fixação de células fibroblásticas. Além disso, quanto maior a densidade de picos, há menor distância entre os mesmos, o que propicia a diminuição da formação do biofilme;
8. As médias dos ângulos de contato indicam um comportamento mais hidrofílico para a superfície sem revestimento (G4), sendo esta mais adequada para a adesão de fibroblastos e organização das fibras colágenas. Em contrapartida, a amostra com deposição apenas de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1) foi a que apresentou menor hidroflicidade, sendo a mais indicada para o revestimento do pilar que objetiva o efeito bactericida;

9. As amostras com GO (G2) e GO seguida de  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3) foram as que apresentaram energia de superfície mais adequada para a presença de fibroblastos;
10. No ensaio qualitativo *live/dead* de viabilidade bacteriana, a superfície do Ti com GO (G2) permitiu maior adesão de cepas de *S. mutans*, bem como apresentou maior número de bactérias mortas comparativamente ao grupo com  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G1).

## 6 TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos a serem desenvolvidos a partir deste, pode-se sugerir os seguintes:

1. Analisar a adesão dos revestimentos para verificar a permanência e estabilidade das partículas na superfície dos pilares;
2. Realizar tratamento térmico após a eletrodeposição para analisar a possibilidade de melhorar a adesão;
3. Avaliar a citotoxicidade dos revestimentos com GO e  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$ ;
4. Realizar a caracterização por DRX nas amostras com revestimento de  $\text{Cu}_2\text{OSMPs}$  e confirmar a eletrodeposição a partir da estrutura cristalina;
5. Realizar o ensaio de viabilidade bacteriana nas amostras com revestimento de GO e  $\text{Cu}_2\text{O}$  (G3) e sem revestimento (G4) e comparar todos os grupos.

## REFERÊNCIAS

- 1 LEITE, F. H. M. *Estudo descritivo de uma série de casos de peri-implantite: epidemiologia e microbiologia*. Tese (Doutorado), 2015.
- 2 CERBASI, K. P. Etiologia bacteriana e tratamento da peri-implantite. *Innovations Implant Journal*, Instituto Nacional de Experimentos e Pesquisas Odontológicas-INEPO, v. 5, n. 1, p. 50–55, 2010.
- 3 JÚNIOR, S.; FERREIRA, J.; LEMOS, C. A. A.; BATISTA, V. E. d. S.; MELLO, C. C.; ALMEIDA, D. A. d. F.; VERRI, F. R.; PELLIZZER, E. P. Manutenção em próteses implantossuportadas: peri-implantite. *Revista Odontológica de Araçatuba*, p. 14–22, 2013.
- 4 CANULLO, L.; PESCE, P.; PATINI, R.; ANTONACCI, D.; TOMMASATO, G. What are the effects of different abutment morphologies on peri-implant hard and soft tissue behavior? a systematic review and meta-analysis. *Int J Prosthodont*, v. 33, n. 3, p. 297–306, 2020.
- 5 HEITZ-MAYFIELD, L.; TELES, R. O.; LANG, N. P. Infecções peri-impante. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 202–215.
- 6 LOPES, A. C.; REZENDE, C. E. E.; FERNANDES, M. d. S.; WEINFELD, I. Infiltração bacteriana na interface implante/pilar: considerações ao implantodontista. *RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)*, Mundi Brasil Gráfica e Editora Ltda., v. 58, n. 2, p. 239–242, 2010.
- 7 BENÍTEZ, P. de la P.; GARCÍA-SANTOS, A. Diseño nanotecnológico de superficies con propiedades antibacterianas: el grafeno. *Revista ingeniería de construcción*, SciELO Chile, v. 31, n. 3, p. 201–207, 2016.
- 8 BERGLUNDH, T.; LINDHE, J.; LANG, N. P. Mucosite peri-implante e peri-implantite. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 462–473.
- 9 RODRIGUES, D. *Prótese sobre implantes: passos clínicos e laboratoriais*. Natal: Idea, 2011. 231 p.
- 10 SOARES, F.; ELIAS, C. N.; MONTEIRO, E. S.; COIMBRA, M. E. R.; SANTANA, A. I. C. Galvanic corrosion of ti dental implants coupled to cocrmo prosthetic component. *International Journal of Biomaterials*, Hindawi, v. 2021, 2021.
- 11 LIMA, E. G. d. Infiltração bacteriana nas interfaces entre implantes e pilares: efeito do desenho das conexões protéticas. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2014.
- 12 ELIAS, C. N.; ROESTEL, J.; GIORDANI, G. Simplificação da prótese dentária digital e selamento da mucosa peri-implantar: Perio one base concept. *Implant News Perio*, v. 4, p. 933–944, 2019.

- 13 REZK, F. A.; TRIMPOU, G.; LAUER, H.-C.; WEIGL, P.; KROCKOW, N. Response of soft tissue to different abutment materials with different surface topographies: a review of the literature. *General Dentistry*, v. 66, n. 1, p. 18–25, 2018.
- 14 FERRARIS, S.; SARTORI, A. Surface modification of titanium for improvement of soft tissue adhesion and reduction of bacterial contamination. 2018.
- 15 ZAFAR, M. S.; KHURSHID, Z. *Dental implants: materials, coatings, surface modifications and interfaces with oral tissues*. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2020.
- 16 NAGANO-TAKEBE, F.; MIYAKAWA, H.; NAKAZAWA, F.; ENDO, K. Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating. *Biointerphases*, American Vacuum Society, v. 9, n. 2, p. 029006, 2014.
- 17 PERSSON, G. R.; RENVERT, S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clinical implant dentistry and related research*, Wiley Online Library, v. 16, n. 6, p. 783–793, 2014.
- 18 SCHEIDT, G. et al. Filmes finos de cobre/óxido de cobre como agentes inibidores da adesão de biofilmes bacterianos. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, 2013.
- 19 AZAM, A.; AHMED, A. S.; OVES, M.; KHAN, M. S.; HABIB, S. S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, Dove Press, v. 7, p. 6003, 2012.
- 20 REN, G.; HU, D.; CHENG, E. W.; VARGAS-REUS, M. A.; REIP, P.; ALLAKER, R. P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International journal of antimicrobial agents*, Elsevier, v. 33, n. 6, p. 587–590, 2009.
- 21 BAGCHI, B.; KAR, S.; DEY, S. K.; BHANDARY, S.; ROY, D.; MUKHOPADHYAY, T. K.; DAS, S.; NANDY, P. In situ synthesis and antibacterial activity of copper nanoparticle loaded natural montmorillonite clay based on contact inhibition and ion release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 108, p. 358–365, 2013.
- 22 KATWAL, R.; KAUR, H.; SHARMA, G.; NAUSHAD, M.; PATHANIA, D. Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Elsevier, v. 31, p. 173–184, 2015.
- 23 ARAB, F. E. Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Universidade Federal de São Carlos, 2018.
- 24 RIBEIRO, V. F. Desenvolvimento de compósitos antimicrobianos a base de sebs/pp aditivados com partículas de cobre. 2019.
- 25 TU, Y.; LV, M.; XIU, P.; HUYNH, T.; ZHANG, M.; CASTELLI, M.; LIU, Z.; HUANG, Q.; FAN, C.; FANG, H. et al. Destructive extraction of phospholipids from escherichia coli membranes by graphene nanosheets. *Nature nanotechnology*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 8, p. 594–601, 2013.

- 26 LI, Y.; YANG, D.; CUI, J. Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against *pseudomonas syringae* pv. tomato. *Rsc Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 62, p. 38853–38860, 2017.
- 27 LIMA, A. M.; FARIA, G. S.; NARDECCHIA, S.; CRUZ, L. R. de O.; SOUZA, M. d. M. V. M.; PINHEIRO, W. A. Produção e caracterização de filmes finos transparentes e condutores de óxido de grafeno reduzido.
- 28 CORADO, H. P. R.; SORAES, F. M. de S.; BARBOSA, D. M.; LIMA, A. M.; ELIAS, C. N. Titanium coated with graphene and niobium pentoxide for biomaterial applications. *International Journal of Biomaterials*, v. 2022, 2022. 01 dez. de 2022. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2022/2786101/>>.
- 29 LEMOS, A. B.; ELIAS, C. N.; BASTOS, R. R.; MARTINEZ, E. F. Nanometric deposition of fluoride ions on titanium alloys and its influence on in vitro bacterial adhesion and viability. *Materials Research*, SciELO Brasil, v. 24, 2021.
- 30 GRECCO, V. R. Eletrodeposição de semicondutores para aplicação em energia renovável. In: \_\_\_\_\_. *As Engenharias e seu Papel no Desenvolvimento Autossustentável*. Paraná: Atena, 2020. p. 14–27.
- 31 ELANGO, M.; DEEPA, M.; SUBRAMANIAN, R.; MUSTHAFSA, A. M. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of polyindole/ag–cuo nanocomposites by reflux condensation method. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, Taylor & Francis, v. 57, n. 14, p. 1440–1451, 2018.
- 32 RAHAL, H.; KIHAL, R.; AFFOUNE, A. M.; RAHAL, S. Electrodeposition and characterization of cu<sub>2</sub>o thin films using sodium thiosulfate as an additive for photovoltaic solar cells. *Chinese journal of chemical engineering*, Elsevier, v. 26, n. 2, p. 421–427, 2018.
- 33 MARGARET, S. M.; WINSTON, A. J. P. P.; MUTHUPANDI, S.; SHOBHA, P.; SAGAYARAJ, P. A comparative study of nanostructures of cuo/cu<sub>2</sub>o fabricated via potentiostatic and galvanostatic anodization. *Journal of Nanomaterials*, Hindawi, v. 2021, 2021.
- 34 SAHAI, A.; GOSWAMI, N.; KAUSHIK, S.; TRIPATHI, S. Cu/cu<sub>2</sub>o/cuo nanoparticles: Novel synthesis by exploding wire technique and extensive characterization. *Applied Surface Science*, Elsevier, v. 390, p. 974–983, 2016.
- 35 GASCHO, J.; COSTA, J.; HOEPFNER, J.; PEZZIN, S. *Estudo Do Filme De Grafeno/Óxido De Grafeno Obtido Por Redução Química Parcial Do Óxido De Grafite*. Tese (Doutorado) — Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais . . . .
- 36 OLIVEIRA, M.; POLETTO, M.; SEVERO, T. C. Rota química para produção de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite comercial. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*, v. 3, n. 6, p. 16–20, 2018.
- 37 MUTHUKUMARAN, S.; GOPALAKRISHNAN, R. Structural, ftir and photoluminescence studies of cu doped zno nanopowders by co-precipitation method. *Optical Materials*, Elsevier, v. 34, n. 11, p. 1946–1953, 2012.
- 38 ROLLE, F.; SEGA, M. Use of ftir spectroscopy for the measurement of co<sub>2</sub> carbon stable isotope ratios. In: EDP SCIENCES. *19th International Congress of Metrology (CIM2019)*. [S.l.], 2019. p. 05002.

- 39 LEAL, N. N. d. S. et al. Mapeamento da condutividade de camadas de grafeno de diferentes espessuras usando a microscopia de força atômica condutora e espectroscopia raman. Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- 40 ALMEIDA, E. C.; SANTOS, R. N.; EDWARDS, E. R. Síntese e caracterização de óxido de grafeno para uso em capacitor eletroquímico. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, v. 7, n. 7, p. 30–42, 2021.
- 41 BRITO, T.; NASCIMENTO, M.; ROCHA, A.; NATTRODT, A.; MARQUES, A.; NETTO, M.; LIMA, M.; SOUZA, B.; MORALES, L.; ELIAS, C. A influência da rugosidade nos mecanismos da osseointegração de implantes: uma revisão de literatura. *Odontologia: pesquisa e práticas contemporâneas*, v. 2, p. 40–58, 2021.
- 42 ELIAS, C. N. Factors affecting the success of dental implants. *Implant dentistry: a rapidly evolving practice. Rijeka: InTech*, p. 319–64, 2011.
- 43 MORALES, L. M. M.; ELIAS, C. N. Dental implant prosthetic abutment surface treatment to improve gingival adhesion. In: *Middle East International Conference on Contemporary Scientific Studies*. Lebanon: s. n., 2021. p. 474–281.
- 44 MORALES, L. M. M.; ELIAS, C. N. Comparison of the surface roughness of dental implant abutment and tooth root. *International Journal of Dentistry, Diabetes, Endocrinology and Oral Hygiene*, v. 3, p. 1–13, 2022.
- 45 LIMA, J.; ELIAS, C.; MEIRELLES, L. *Odontologia: Arte e Conhecimento*. [S.l.]: São Paulo: Artes Médicas, 2003. 353–365 p.
- 46 MOZAFARI, M. *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2020.
- 47 ABI-RACHED, F. O.; MARTINS, S. B.; CAMPOS, J. A.; FONSECA, R. G. Evaluation of roughness, wettability, and morphology of an yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal ceramic after different airborne-particle abrasion protocols. *The Journal of prosthetic dentistry*, Elsevier, v. 112, n. 6, p. 1385–1391, 2014.
- 48 ELIAS, C. N.; VASCONCELLOS, V.; RESENDE, C. Análise dos mecanismos celulares durante a osseointegração dos implantes. In: METALLUM SÃO PAULO. *Anais do VII Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. [S.l.], 2012. p. 1–28.
- 49 TZONEVA, R.; FAUCHEUX, N.; GROTH, T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Elsevier, v. 1770, n. 11, p. 1538–1547, 2007.
- 50 MCBRIDE, B.; SONG, M.; KRASSE, B.; OLSSON, J. Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of streptococcus mutans. *Infection and immunity*, Am Soc Microbiol, v. 44, n. 1, p. 68–75, 1984.
- 51 BRUNETTE, D. M.; TENGVALL, P.; TEXTOR, M.; THOMSEN, P. *Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*. [S.l.]: Springer, 2001.