

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA COM ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA**

Paulo Roberto Sano

**Avaliação da adesão bacteriana em discos de titânio com
nanotopografia: estudo *in situ***

**São Paulo
2014**

Paulo Roberto Sano

**Avaliação da adesão bacteriana em discos de titânio com
nanotopografia: estudo *in situ***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Implantodontia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Santo Amaro, sob orientação da Prof. Dra. Karina Cogo Müller e co-orientação do Prof. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

**São Paulo
2014**

“Nada é por acaso.”

Dedico este trabalho a Deus, por sempre me iluminar e estar ao meu lado.

Aos meus pais, pela vida.

À querida Luiza, pela paciência, amor e compreensão ao longo destas últimas décadas.

Aos meus filhos Luis Paulo e Mariana, Bons filhos, Bons amigos e Bons professores.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Karina Cogo Müller, pela paciência, altruísmo e constante boa vontade na orientação desta dissertação. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendik, pela coordenação deste excelente curso. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho pelos brilhantes ensinamentos e permissão para uso das caracterizações. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Caio Vinícius Roman-Torres, pelas importantes observações na correção desta dissertação. Obrigado.

Às futuras colegas Tauane Ramaldes Martins e Nathália Ramaldes, pelos auxílios no laboratório de microbiologia.

À Sra Regina Marques dos Anjos de Paula, secretária da pós graduação, pela atenção e simpatia.

À Neodente, pela confecção e doação das pastilhas utilizadas para o presente estudo.

À Universidade de Santo Amaro, pelo uso das instalações.

Ao amigo Fausto Horiguti, por me convencer a realizar este curso. Valeu!

Aos colegas e futuros colegas participantes como voluntários neste estudo.

A todos os professores e colegas, pela boa convivência e estímulo ao conhecimento.

RESUMO

As características da superfície dos implantes podem influenciar na adesão microbiana. Recentemente, a nanotopografia foi avaliada quanto à capacidade de osseointegração, mostrando melhores resultados em relação às superfícies com microtopografia e usinada. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da nanotopografia de superfícies de titânio no processo de adesão microbiana em modelo de estudo *in situ*. Dezoito participantes utilizaram por 24 h os dispositivos bucais contendo os discos de titânio. Após esse período, os discos foram avaliados pelo método de cultura microbiana por meio de contagem total de aeróbios e anaeróbios, e por microscopia eletrônica de varredura, para visualização da estrutura dos biofilmes. Os dados de contagem bacteriana foram transformados em logaritmo e submetidos à comparação pelo teste ANOVA. Os valores de média e desvio padrão do logaritmo das unidades formadoras de colônia (ufc/disco) para as bactérias aeróbias foram: usinados ($6,65 \pm 0,38$), micro ($6,72 \pm 0,32$) e nano ($6,70 \pm 0,44$). Para a contagem de anaeróbios, os valores de logaritmo da média e desvio padrão foram: usinados ($6,86 \pm 0,27$), micro ($6,80 \pm 0,50$) e nano ($6,94 \pm 0,41$). Não foram encontradas diferenças significativas entre a contagem de microrganismos entre os grupos, tanto para a quantificação de anaeróbios quanto para a de aeróbios ($p > 0,05$). Na análise por MEV, os grupos apresentaram uma distribuição bacteriana semelhante entre si, com predominância de cocos e poucos bacilos. Dessa forma, concluímos que a superfície com nanotopografia não altera a adesão bacteriana em relação à superfície usinada e à superfície com microtopografia, considerando um período inicial de formação de biofilme.

Palavras-chaves: Titânio, Biofilme Dentário, Contagem Bacteriana

ABSTRACT

The surface characteristics of implants can influence the microbial adhesion. Recently, the nanotopography was evaluated about its osteointegration competence, showing better results in comparison to microtopography and machined surfaces. Thus, this study aimed to evaluate the influence of titanium surface nanotopography in the microbial adherence process *in situ*. Eighteen subjects wore the buccal devices containing the titanium disks for 24h. After this period, the disks were evaluated through microbial culture method by quantifying aerobic and anaerobic bacteria and through scanning electron microscopy, to visualize biofilm structures. Bacterial counting data were converted to logarithm and submitted to comparison through ANOVA test. Mean and standard deviation values of the colony-forming units' logarithm (log of ufc/disk) for the aerobic bacteria were 6.65 ± 0.38 for machined surface, 6.72 ± 0.32 for microtopography and 6.70 ± 0.44 for nanotopography. For anaerobic bacteria, mean and standard deviation values were 6.86 ± 0.27 for machined surface, 6.80 ± 0.50 for microtopography and 6.94 ± 0.41 for nanotopography. There were no significant differences among the groups, neither for anaerobic or for aerobic bacteria quantification ($p > 0.05$). In SEM images, the disks presented similar bacterial distribution throughout the surfaces, with predominance of cocci and few bacilli. Therefore, we concluded that nanotopography may not alter bacterial adherence when compared to microtopography and machined surfaces, considering initial biofilm formation period.

Key words: Titanium, Dental Plaque, Bacterial Load

SUMÁRIO

1	Introdução.....	7
2	Revisão da literatura.....	9
2.1	Tratamento de superfície dos implantes.....	9
2.2	Relação biofilme e mucosite/peri-implantite.....	Erro! Indicador não definido.
2.3	Relação da superfície de implante e adesão bacteriana.....	12
3	Proposição.....	18
4	Material e Métodos.....	19
4.1	Desenho Experimental.....	19
4.2	Obtenção dos discos de titânio e caracterização da superfície.....	19
4.3	Sujeitos do estudo, critérios de inclusão e exclusão.....	20
4.4	Confecção dos dispositivos bucais e fixação dos discos de titânio.....	21
4.5	Experimento <i>in situ</i> de adesão bacteriana nas superfícies de titânio.....	23
4.6	Quantificação de microrganismos aderidos ao disco pela técnica de cultivo..	25
4.7	Análise qualitativa da adesão bacteriana por Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	26
4.8	Análise estatística.....	27
5	Resultados.....	28
5.1	Quantificação da adesão de microrganismos aeróbios e anaeróbios.....	28
5.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
6	Discussão.....	31
7	Conclusão.....	36
	Referências.....	37
	Anexo.....	41

1 INTRODUÇÃO

Como uma ciência em evolução, a odontologia tem sido contemplada com o desenvolvimento de novos materiais e descobertas científicas que fazem com que esta continue a ter seu valor de destaque dentro da ciência médica. Dentre estas descobertas, a introdução dos implantes dentários como método terapêutico para repor dentes perdidos foi talvez o maior salto evolutivo da odontologia nestas últimas décadas. O uso de implantes dentários na odontologia comprovadamente apresenta um alto grau de sucesso (ASTRAND et al., 2008; LEKHOLM et al., 1999;; Lekholm et al., 2006) e é uma das ferramentas clínicas que os profissionais da mesma rotineiramente utilizam para repor a perda de dentes e devolver as funções estética, fonética e mastigatória.

Apresentado ao mundo científico por George Zarb (1982), os primeiros implantes criados por P. I. Branemark na década de 1960 apresentavam-se com superfície lisa (usinada). Em busca de melhorias técnicas, muitos fabricantes modificaram esta superfície, alterando sua rugosidade seja com técnica de jateamento abrasivo, irradiação ultravioleta de superfície cristalina de TiO_2 , ablação a laser, oxidação anódica, condicionamento ácido, etc., sendo que estas alterações de superfície geram rugosidades mensuráveis em escalas milimétricas, micrométricas e nanométricas (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b).

Essas modificações nas superfícies dos implantes, comprovadamente aumentam a área de contato com o osso (LAZARA et al., 1999; LANG e JEPSEN, 2009) e estas superfícies rugosas e moderadamente rugosas normalmente aumentam a osseointegração, quando comparadas com superfícies lisas (Lang e Jepsen, 2009). No entanto, apesar do aumento de rugosidade favorecer a osseointegração, ainda é desconhecido o quanto este fator está relacionado ao aumento da colonização bacteriana na superfície dos implantes.

Como toda técnica terapêutica, os implantes dentários também apresentam insucessos e fracassos. Nesta parte negativa da implantodontia, a mucosite e a peri-implantite têm se mostrado presente em muitos estudos: mucosite foi diagnosticada em 48% dos implantes acompanhados por 09 a 14 anos (ROOS-JANSKER et al., 2006). Em outro artigo deste mesmo estudo, a peri-implantite foi diagnosticada em 6,6% dos casos (ROOS-JANSKER et al., 2006b). Outro estudo realizado por

Fransson et al. (2005) relata que 12,4% de 3143 implantes em função no mínimo há cinco anos apresentavam perda óssea progressiva, assim como estudos de revisão de literatura mais recente conduzidos por Mombeli et al.(2012) e Atieh et al. (2013), a peri-implantite foi diagnosticada em 10% dos implantes e em 20% dos pacientes e 9,6% dos implantes e 18,8% dos pacientes , respectivamente..

Se por um lado uma recente revisão de literatura relata que não existem evidências de que as características da superfície do implante possam ter um significativo efeito na iniciação da peri-implantite (RENVERT et al., 2011), muitos trabalhos (AL-AHMAD et al., 2013; BÜRGERS et al., 2009; QUIRYNEN e BOLLEN, 1995; RIMONDINI et al., 1997; SUBRAMANI et al., 2009,) demonstram uma relação direta entre quantidade de biofilme e grau de rugosidade da superfície de titânio.

Alguns trabalhos tem demonstrado que as modificações na superfície de titânio em escala nanométrica apresentaram resultados significativamente superiores em relação à maior formação de matriz mineralizada (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011 a), aumento no contato osso-implante (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b) e modulação de expressão de genes relacionados com a osseointegração (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011c), assim como outros estudos com nanotopografia tem demonstrado um aumento da aderência de tecidos moles com uma possível redução de perda óssea (WENNERBERG et al., 2009) e não alteração de sua biocompatibilidade (DE WILDE et al., 2013).

Considerando os ótimos resultados em relação à osseointegração e osteogênese da superfície com nanotopografia, assim como seu comportamento favorável em relação à adesão aos tecidos moles, é necessário investigar mais afundo essa superfície com características promissoras. Existem poucos relatos na literatura de como ocorre a adesão microbiana e a formação de biofilme nessa superfície. Sendo assim, é necessário conhecer o perfil de colonização bacteriana nas superfícies com nanotopografia em comparação com as superfícies lisas e micro-estruturadas. A hipótese do presente estudo foi a de que o grupo com nanotopografia apresentaria menor adesão microbiana na superfície na sua superfície em relação ao grupo com microtopografia, sendo equivalente à superfície usinada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tratamento de superfície dos implantes

Originariamente, os implantes introduzidos por Branemark utilizavam titânio comercialmente puro grau 1, mas atualmente o que mais se utiliza é o titânio grau 4 e também algumas ligas de titânio (grau 5) (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b). Em virtude de alguns estudos revelarem insucessos significativos destes implantes de superfície lisa quando instalados em maxilas com rebordos alveolares com pouca altura e baixa densidade óssea (osso tipo IV), incrementou-se a pesquisa e desenvolvimento por superfícies texturizadas (NAGEN FILHO et al., 2009).

Wennerberg et al.(1998) avaliaram o torque de remoção dos implantes com diferentes grau de rugosidade. A superfície dos implantes foram jateadas com partículas de óxido de alumínio de diferentes tamanhos que resultaram em diferentes graus de rugosidade média e encontraram maiores torque de remoção para os implantes tratados com partículas entre 25 e 75 μm . Lazara et al.(1999) instalaram mini implantes (2mm x 5mm) usinados e implantes que sofreram duplo ataque ácido na maxila posterior de 11 pacientes (um de cada lado) e, na análise histológica após 06 meses, encontraram um maior valor de contato osso-implante para a superfície com tratamento de superfície. Atualmente dispomos de várias tecnologias para tratamento de superfície dos implantes dentários que resultam em superfícies lisas ou usinadas, superfícies macrotextrizadas, microtexturizadas, superfícies nanotextrizadas e superfícies biomiméticas ou: superfície lisa ($S_a < 0,5 \mu\text{m}$), superfície com rugosidade mínima ($S_a = 0,5-1,0\mu\text{m}$), superfície com rugosidades moderado ($S_a = 1-2\mu\text{m}$) e superfície rugosa ($S_a > 2\mu\text{m}$)(ALBREKTSSON e WENNERBERG 2004)

Dentre essas tecnologias, o próprio processo de torneamento ou usinagem nos fornece um tipo de superfície. Superfícies torneadas ou usinadas comumente são lisas ($S_a < 0,5 \mu\text{m}$) ou minimamente rugosa ($S_a 0,5-1,0\mu\text{m}$). Atualmente este processo é mais usado para obter o macrodesign do implante, que depois será tratado superficialmente (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b). Os tratamentos destas superfícies podem ser considerados como tratamento de adição (quando acrescentam algo à superfície do implante ou de subtração quando removemos parte da camada superficial) (GROISMAM e VIDIGAL, 2005).

Um método de tratamento de superfície é a oxidação anódica ou anodização. Este método é o utilizado para a superfície TiUnite® (Nobel Biocare – Gothenburg, Suécia). Neste processo o implante é colocado em uma célula eletroquímica servindo como ânodo e um potencial elétrico é aplicado à amostra, gerando transferência de carga e íons resultando no fluxo contínuo destes íons na célula elétrica. Em condições controladas, o campo elétrico guiará o processo de oxidação e, com a adição de íons fosfato(P) resultará em uma camada de dióxido de titânio maior, potencializando o processo de osseointegração (DE BRANDÃO et al., 2010).

O Plasma Spray foi talvez um dos métodos mais comuns de modificação de superfície. Essa tecnologia pode ser usada para aplicação de uma camada de Ti ou hidroxiapatita, formando rugosidades devido à aderência destas partículas à superfície do implante. O valor da rugosidade superficial para Ti plasma spray é $R_a= 1,82\mu\text{m}$ e para Ha plasma spray é $R_a= 1,59$ a $2,94\mu\text{m}$ (SYKARAS et al., 2000).

A tecnologia sol-gel é um método que utiliza alcóxidos metálicos ou sais inorgânicos como fonte de cátions e ânions, água como agente de hidrólise e álcoois como solventes. Esta técnica permite a deposição sobre superfícies com controle relativamente fácil, em grande quantidade para um grande número de implantes. Uma solução específica é preparada e quase sempre retém a fase líquida e sólida. A amostra é então mergulhada várias vezes, com um processo de secagem entre elas. Após este procedimento é aquecida, solidificando e sinterizando o recobrimento. Esta técnica é usada para obtenção de nanotopografia e um exemplo disso é a superfície nanotite (Biomet 3I®), que tem sua superfície tratada com uma discreta deposição de fosfato de cálcio derivado de um sol-gel (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b.).

Outro processo utilizado para aumentar a rugosidade superficial é o ataque ácido. O implante é submergido em uma solução ácida, subtraindo componentes e alterando a sua superfície com a criação de irregularidades de dimensões e formas específicas. A concentração da solução ácida, tempo e temperatura são fatores determinantes do resultado do ataque químico e microestruturas de superfície (Sykaras et al., 2000), Em 1996 um implante foi introduzido no mercado e tinha sua superfície condicionado duplamente com ácido hidrocloreídrico e ácido sulfúrico (HCl – H₂SO₄). Este implante (Osseotite, Implant Innovation, Palm Beach Garden Flórida)

apresentou resistência ao torque quatro vezes maior quando comparado com implante de superfície usinada (SYKARAS et al., 2000).

Um processo bastante utilizado é o processo de jateamento abrasivo, que pode originar superfícies com diferentes médias de rugosidade, dependendo das partículas utilizadas no procedimento (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b). TiOblast® e Osseospeed® são superfícies produzidos pela Astra Tech Dental AB Mölndal, Suécia. Ambas são tratados com jatos do óxido de titânio e com valor de $S_a = 1,1\mu\text{m}$, sendo que a segunda recebe um tratamento químico de íons fluorídricos (ROCCI et al., 2008). O jateamento abrasivo também pode ser associado ao ataque ácido, como por exemplo na superfície SLA® e SLA active®, onde a superfície de titânio é tratado com jatos de óxido de alumínio de grande diâmetro e posteriormente tratado com ácido hidrófluorídrico (NAGEM FILHO et al., 2007).

Outra tecnologia que pode ser citada é o processo de ablação a laser: neste procedimento é utilizada uma fonte de laser de alta potência (CO_2 Nd-YAG ou Nd-glass). O processo rápido de fusão e solidificação cria diferentes rugosidades e porosidades sobre as superfícies que resultam na formação de uma fina camada de óxido e favorece propriedades das superfícies como a dureza e resistência à corrosão. A camada de TiO_2 formada sobre a superfície favorece a adesão de apatita graças à alta afinidade química que existe entre TiO_2 e hidroxiapatita (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011b).

Um trabalho interessante dentro deste assunto, é o trabalho de Svanborg et al.(2009), no qual os autores realizaram a caracterização de implantes dentais de conhecidas marcas comerciais (Lifecore® usinado, Astra Tech Tiobast®, Lifecore, RBM®, 3i Osseotite parte polida, 3i Osseotite parte tratada, Astra Tech Osseospeed, 3i Prevail, 3i nanotite®, Southern Implant®, Nobel Biocare TiUnite®, Strauman SLA®, Dentatus® usinado e Dentatus® jateado) em nível nanométrico e compararam com as já conhecidas caracterizações em nível micrométrico. Nenhuma evidente correlação entre a rugosidade micrométrica e a rugosidade nanométrica foi observada. Os resultados mostraram que um implante considerado liso em nível micrométrico, não era necessariamente liso em nível nanométrico.

2.2 Relação da superfície de implante e adesão bacteriana

De acordo com Subramani et al.(2009), a sequência de colonização bacteriana nos implantes dentais e formação de biofilme é semelhante à que ocorre nos dentes e as espécies que colonizam os implantes dentais incluem as mesmas espécies que são encontradas na gengiva sadia e sítios de gengivite, ou seja, o esmalte do dente é recoberto por uma película salivar (película adquirida) segundos após uma limpeza e sua superfície é rapidamente colonizada por bactérias da cavidade oral presentes na saliva (10^8 bactérias por ml). As bactérias começam a colonizar a superfície dental entre 0 a 4 horas após a formação da película adquirida. Nas próximas 4 a 24 horas, essas bactérias aderidas se multiplicam e crescem, levando à formação de microcolônias distintas. Nos próximos 1-14 dias, essa placa de bactérias dominada por *Streptococcus* muda para uma placa dominada por *Actinomyces*. Entre duas a quatro semanas as espécies bacterianas se tornam mais diversas, com um alto nível de bactérias filamentosas gram-negativas anaeróbicas e a placa amadurece em um biofilme.

Nyvad e Fejerskov(1987) estudaram *in situ* a colonização bacteriana em superfícies de cimento e esmalte dentário nos períodos de 4, 8,12 e 24 horas e concluíram que a colonização bacteriana precoce é determinada pela estrutura superficial do dente. Observaram também uma colonização predominada por cocos após um período de 24 horas e no período de 48 horas observaram uma grossa camada aderente formada por cocos e bactérias filamentosas.

Com o objetivo de saber como as características da superfície do implante influenciam a doença peri-implantar, Renvert et al.(2011) revisaram a literatura, encontrando treze estudos, incluindo estudos em humanos e estudos de peri-implantite induzido em animais; na análise criteriosa dos estudos, não encontrou nenhuma evidência comprovando uma relação direta entre as características da superfície do implante e a iniciação da peri-implantite.

Em busca de uma resposta sobre como a rugosidade superficial e a energia livre de superfície de implantes e componentes protéticos influenciam a formação do biofilme, Quirynen e Bollen(1995), revisaram a literatura e analisaram 19 trabalhos publicados entre 1961 e 1993 e concluíram que para o biofilme supra gengival, a rugosidade superficial do implante e a energia livre de superfície, nesta ordem, são os dois fatores que mais influenciam a formação do biofilme, quanto maior a

rugosidade superficial do implante ou a energia livre de superfície, uma colonização mais rápida da superfície e uma maturação mais rápida do biofilme foi verificada. Na visão dos autores, para o biofilme subgingival esses fatores são menos influentes, pois o ambiente oferece mais nichos para adesão bacteriana e sobrevivência desta.

Nakazato et al.(1997) estudaram a exposição de diferentes materiais de implantes *in situ* no meio bucal (alumina cristal simples, zircônia policristal parcialmente estabilizada, hidroxiapatita, titânio puro e resina acrílica), após 4 horas demonstraram que 50 por cento das bactérias eram formadas por *Streptococcus* e que a adesão precoce de bactérias tendiam a ser afetadas pela rugosidade do material, porém após 48 horas, nenhuma diferença foi encontrada entre os materiais. Eles observaram ao microscópio eletrônico de varredura que após 4 horas, no material com maior rugosidade superficial, a superfície foi coberta por uma película fina e que a rugosidade diminuía acentuadamente com a aderência de *Streptococcus*, verificaram também que a quantidade de anaeróbios aumentava para todos os materiais após 48 horas.

Rimondini et al. (1997) avaliaram *in situ* a formação de biofilme em três tipos de superfícies de titânio com variados graus de rugosidades para determinar o grau de polimento ideal para inibir a formação precoce de biofilme e concluíram que uma superfície de titânio com rugosidade média menor ou igual a 0,088 μm inibe significantemente o acúmulo e maturação do biofilme num período de 24 horas.

Para avaliar *in vitro* modificações na superfície de implantes em relação à adesão precoce de bactérias (1 hora), GröBner-Schreiber et al.(2001) utilizaram dois conhecidos iniciadores do biofilme (*Streptococcus mutanse Streptococcus sanguis*) e modificaram discos de titânio da seguinte forma: deposição física de vapor , cobertura com nitreto de titânio ou com nitreto de zircônia ,oxidação térmica e estruturação com radiação a laser; tendo superfície polida de titânio como controle.As rugosidades de superfície (R_a) variavam entre 0,14 e 1,0 μm . Os resultados mostraram uma menor adesão de bactérias às superfícies com cobertura de nitreto de titânio e nitreto de zircônia.

Scarano et al.(2004) realizaram um estudo, onde dez voluntários sadios usaram uma placa acrílica contendo dois discos de zircônia no lado direito e dois discos de titânio no lado esquerdo por 24 horas. A rugosidade superficial (R_a) verificada foi de 0,73 μm para os discos de titânio e de 0,76 μm para os discos de

zircônia. Os resultados mostraram um percentual de 12,1% da área dos discos de zircônia coberta por bactéria contra 19,3% das áreas dos discos de titânio.

Numa revisão sistemática para avaliar o impacto das características da superfície (energia livre de superfície, rugosidade e composição química na formação do biofilme), Teughels et al.(2006) analisaram 36 estudos publicados entre 1966 e 2005 e concluíram que aumentando a rugosidade média da superfície acima do limiar de $0,2\mu\text{m}$ e ou a energia livre de superfície, facilita-se a formação do biofilme nos materiais restauradores e, quando ambas interagem uma com a outra, a rugosidade de superfície mostrou-se como o fator dominante. A formação do biofilme também é influenciada pelo tipo de biomaterial (composição química).

Procurando avaliar o efeito da molhabilidade e da microtopografia de superfície dos implantes de titânio na formação inicial do biofilme, Schwarz et al.(2007), realizaram um estudo, onde três voluntários utilizaram um dispositivo oral contendo cinco discos de titânio que receberam um dos seguintes tratamentos: polimento, resultando em uma $R_a = 0,04\mu\text{m}$ (P); ataque ácido com HCl/H₂SO₄, resultando em uma $R_a = 0,83\mu\text{m}$ (A); ataque ácido com HCl/H₂SO₄, e enxaguado sob proteção de N₂, e guardado em uma solução isotônica de NaCl(modA); jateado com grânulos grandes e ataque ácido com HCl/H₂SO₄, resultando em uma $R_a = 3,22\mu\text{m}$ (SLA) e mesmo tratamento anterior, porém, lavado protegido contra N₂ e guardado em solução isotônica de NaCl (modSLA). Os resultados mostraram uma menor formação de biofilme para os grupos A e modA e entre os grupos modificados e não modificados a molhabilidade não parece influenciar na formação de biofilme.

Com o objetivo de revisar a literatura com relação à influência das características de superfície (química, energia livre de superfície e rugosidade) dos implantes dentais e materiais de pilares protéticos na formação do biofilme, Subramani et al.(2007) analisaram cinquenta e três artigos publicados entre 1966 e junho de 2007 e concluíram que um aumento na rugosidade superficial e na energia livre de superfície facilitam a formação de biofilme. A química de superfície e as características do desenho da configuração implante-pilar também desempenham um importante papel na formação do biofilme.

Em um estudo *in situ* e também *in vitro*, Bürgers et al.(2009) analisaram a adesão de bactérias à superfície de titânio usinada e superfície de titânio tratada com jato de areia e ataque ácido *in situ* após 12 horas e *in vitro* a adesão de *S.*

sanguini após duas horas, concluindo que a adesão de bactérias às diferentes texturas de titânio é primariamente influenciada pela rugosidade superficial, ficando a energia livre de superfície em segundo plano.

Al-Ahmad et al.(2010) estudaram *in situ*, após três dias e após cinco dias, a formação de biofilme em seis diferentes superfícies: titânio usinado, titânio modificado, zircônia modificada, alumina usinada temperada com zircônia, zircônia usinada e esmalte dental bovino. A rugosidade média dos materiais variou de 14,3nm (esmalte bovino) a 544,2nm (titânio modificado). Doze voluntários sadios usaram dispositivos bucais com os materiais, que foram analisados após três e cinco dias. Com exceção de titânio usinado, os resultados após três dias mostraram uma correlação entre rugosidade superficial e espessura do biofilme, ao passo que após cinco dias esta correlação diminuiu significativamente.

Para avaliar *in situ* a formação de biofilme em diferente superfícies, após duas e 14 horas, Fröjd et al.(2011) utilizaram superfícies de titânio jateadas, jateadas e subsequentemente oxidadas na presença de acetato de cálcio, superfície de titânio comercialmente puro usinada e superfícies de titânio oxidadas na presença ou ausência de acetato de cálcio. Foram utilizadas as seguintes bactérias: *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeslundii* e *Lactobacillus salivarius*. Foi observado que superfícies mais porosas apresentaram até sete vezes mais bactérias que a superfície usinada após duas horas, apesar de que a incorporação de cálcio reduziu a adesão de bactérias após o período de duas horas, mas o volume de biofilme foi similar para todas as superfícies após 14 horas.

Dorkhan et al.(2011) estudaram *in vitro* a adesão precoce de *Streptococcus oralis* ao titânio com superfície lisa ($S_a = 0,1\mu\text{m}$) ou moderadamente rugosa ($S_a = 1,4\mu\text{m}$) e a influência da saliva ou cobertura de soro. Os resultados mostraram uma adesão mais que duas vezes maior para a superfície moderadamente rugosa coberta com saliva.

Para verificar *in situ* num período de 24horas a adesão bacteriana a três tipos diferentes de superfícies: titânio usinado (MPT), titânio fundido e polido (CPT) e zircônia usinada (Zr) Nascimento et al.(2013) confeccionaram 3 placas para cada um dos 6 pacientes nas quais foram fixados 4 discos da mesma espécie em cada uma. Os resultados mostraram uma sensível diferença na contagem de bactérias para os

três grupos; CPT apresentou maior média de contagem, seguido de MPT e Zr. A posição anterior ou posterior dos discos não alterou os resultados.

Ribeiro(2013) estudou *in situ* a influência de diferentes tratamentos de superfície em discos de titânio comercialmente puro sobre a formação e aderência do biofilme inicial. Para esse trabalho, a autora utilizou 60 discos de titânio, divididos em três grupos: Ti CP, superfície duplamente condicionada com ácido (Masters Pours Implant®) e superfície submetida à irradiação laser-anodizada (Vulcano Actives®; a rugosidade superficial verificada (Ra) foi de 0,771 μm , 0,735 μm e 1,423 μm respectivamente. Os resultados não evidenciaram diferenças significantes entre as quantidades de bactérias entre as diferentes superfícies.

Em outro estudo, Al-ahmad et al.(2013) estudaram *in situ*, a adesão bacteriana (*Eubacteria*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *actinomyces naeslundii* e *Streptococcus spp*) a superfícies de diferentes rugosidades e composição química, sendo as superfícies de 544,2nm e 488,7nm as mais porosas e a superfície de esmalte bovino(14,3nm), a mais lisa. As superfícies foram analisadas após 30 e 120 minutos de exposição na cavidade bucal. Seus resultados mostraram uma correlação significativa entre adesão precoce de bactérias e rugosidade superficial do material.

Lin et al.(2013), estudaram *in vitro* a influência da rugosidade superficial do implante na formação do biofilme bacteriano e sua interferência no tratamento com antimicrobianos. Foram utilizadas uma superfície uma superfície lisa (PT) e uma superfície moderadamente rugosa (SLA®). As médias de rugosidades (S_a) foram respectivamente 0,3 μm e 1,4 μm . Foram utilizadas colônias de *Streptococcus mutans* (01 e 03 dias) e *Porphyromonas gingivalis*(03 dias). Os autores concluíram que uma superfície moderadamente rugosa não incrementa a formação do biofilme, porém diminui a eficácia do tratamento com clorexidina.

Como apresentado, existem vários estudos utilizando superfícies de titânio com diferentes tratamentos e utilizando diferentes metodologias para avaliar a adesão microbiana. De forma geral, na maioria dos estudos a rugosidade e o grau de energia livre de superfície parecem influenciar a adesão bacteriana inicial, sendo que esses fatores influenciam positivamente na formação inicial do biofilme. No entanto, apesar dessas evidências, ainda não há um consenso na literatura científica de qual o grau de rugosidade, ou grau de energia livre ou mesmo o tipo de

topografia que realmente influenciam de forma significativa a adesão bacteriana. Sendo assim, estudos comparando diferentes superfícies de titânio ainda são necessários para elucidar o quanto as características de uma superfície podem influenciar a formação do biofilme bacteriano, considerando que todas essas superfícies estão em constante evolução.

3 PROPOSIÇÃO

Levando em consideração a constante evolução das superfícies dos implantes, o objetivo deste estudo foi avaliar a adesão bacteriana em superfície de titânio com nanotopografia, tendo como comparativo as superfícies com microtopografia e superfície usinada, em estudo *in situ*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

No presente estudo, 18 participantes utilizaram dispositivos bucais de acrílico contendo os discos de titânio com 3 diferentes tipos de tratamento durante 24 h. Após esse período, foi quantificada a formação de biofilme por contagem microbiana total de aeróbios e anaeróbios (pela técnica de cultivo). A adesão bacteriana também foi verificada qualitativamente por microscopia eletrônica de varredura.

4.2 Obtenção dos discos de titânio e caracterização da superfície

As amostras de discos de titânio (10 mm x 2 mm) utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas e cedidas pela empresa NEODENT (Curitiba, Paraná, Brasil), Figura 1. Três tipos de superfície de titânio foram analisadas: A – usinado; B- microtopografia e C – nanotopografia. As amostras de titânio comercialmente puro (grau 4) foram usinadas no formato de discos e submetidas a um processo de modificação de superfície. A microtopografia foi obtida por um processo de jateamento com partículas de óxido de alumínio, seguido de um procedimento de condicionamento ácido (propriedade comercial). A nanotopografia foi obtida pelo tratamento com volumes iguais de uma solução de H₂SO₄ e de H₂O₂ 30% (Nanci et al.,1998)

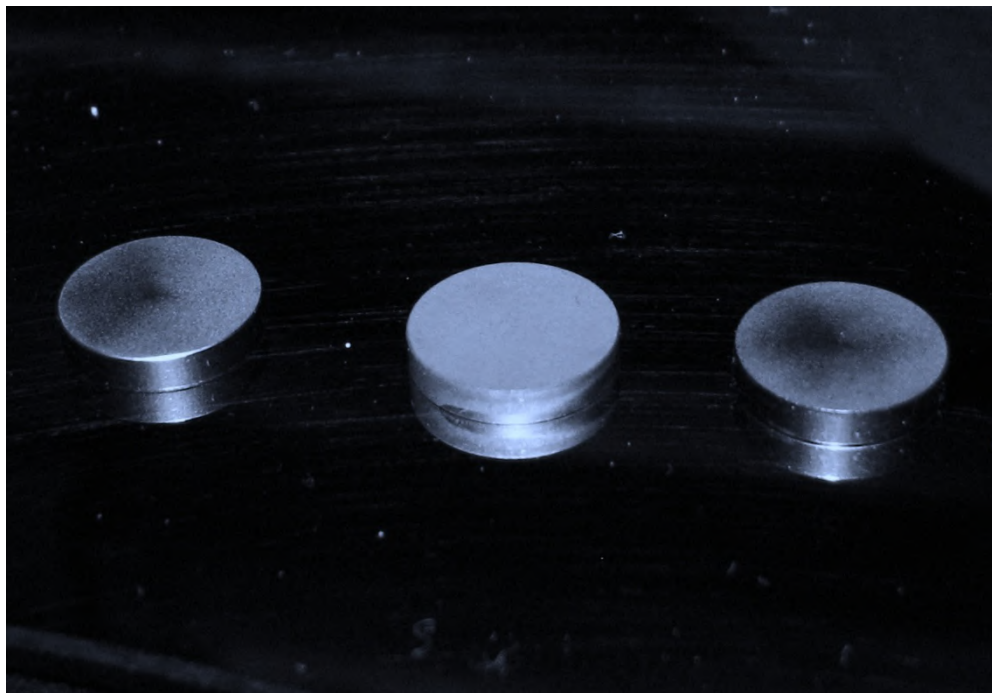


Figura-1: discos de titânio 10 X 2mm, fornecidos pela Neodent®. Superfície com Microtopografia, superfície usinada e com nanotopografia (da esquerda para direita)

A caracterização da rugosidade, química e morfologia desses discos de titânio já foi realizada por um trabalho previamente conduzido por um dos colaboradores do presente estudo (prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho, professor do curso de mestrado em Implantodontia da UNISA). A caracterização da topografia das amostras foi feita no nível micrométrico usando interferômetro ótico (MicroXam; ADE Phase Shift Technology Inc., Tucson, EUA) e microscopia de força atômica (Dimension 3000 SPMTM, Digital Instruments, Santa Barbara, EUA) para avaliação na escala nanométrica. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) (LEO 440 – Zeiss, Oberkochen, Alemanha) foi utilizada para a avaliação da morfologia das superfícies. E para avaliação da química de superfície foi utilizada a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS; LEO 440). Os resultados encontram-se publicados também no artigo: Schwartz-Filho HO, et al. Titanium surfaces with nanotopography modulate cytokine. J Biomed Mat Res A. 2012 Oct;100(10):2629-36 e alguns desses resultados encontram-se na seção ANEXOS.

As características de topografia e de rugosidade desses discos foram utilizadas para a comparação com os resultados microbiológicos.

4.3 Sujeitos do estudo, critérios de inclusão e exclusão

O projeto foi enviado ao Comitê de Ética da Universidade de Santo Amaro, via plataforma Brasil, foi avaliado sob o número CAAE 25698614.8.0000.0081 e aprovado com o parecer nº544.111 (Anexo). Após a aprovação do projeto pelo comitê de ética da Universidade de Santo Amaro, foram selecionados dezoito voluntários adultos sem comprometimento de saúde sistêmica e/ou bucal para participar do estudo. Todos os sujeitos foram informados do objetivo e da metodologia da pesquisa e aqueles que concordaram em participar da mesma assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os participantes selecionados apresentavam idade acima de 18 anos, saudáveis sistemicamente (ausência de distúrbios endócrinos, hematológicos, imunes, alterações nutricionais ou portadores de patologias) e não fumantes. Somente pacientes com excelente saúde bucal foram selecionados, ou seja, pacientes que tinham dentição completa, ausência de periodontite, ausência de bolsas periodontais maiores do que 4 mm, que não apresentavam perda de inserção

clínica e inflamação gengival (LOPES, SMITH E GUTIERREZ, 2002). Os pacientes deveriam apresentar um fluxo salivar de $1,2 \pm 0,2$ ml por minuto e não terem alterações nas glândulas salivares. Os critérios de exclusão foram consumo de álcool, consumo de nicotina, uso de antimicrobianos ou enxaguatórios bucais nos últimos 3 meses, uso de aparelho ortodôntico, gravidez e lactação (AL-AHMAD et al., 2013; BURGERS et al., 2010). Também foram excluídos aqueles que apresentavam qualquer tipo de comprometimento sistêmico e/ou bucal, os que eram desdentados totais ou e usuários de prótese removível em qualquer uma das arcadas.

4.4 Confeção dos dispositivos bucais e fixação dos discos de titânio

Para confecção dos dispositivos bucais (DB), foi realizada a moldagem da arcada superior de todos os participantes. As moldagens foram realizadas com auxílio de moldeiras de aço tipo Vernes pré-fabricadas para dentados (Tecnodont®, São Paulo, Brasil, ou similar) e hidrocolóide irreversível (Jeltrat, Dentsply® Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Para confecção dos modelos de gesso, foi utilizado gesso pedra amarelo (Herodent, Vigodent S/A Indústria e comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), o qual foi vertido no interior do molde e, posteriormente, sobre o modelo obtido, foi confeccionada a moldeira com resina acrílica Palaton®, Dencril Comercio de Plásticos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil), sendo estes dispositivos bucais similares aos utilizadas por Al-Ahmad et al. (2010), com algumas modificações, figura 2.



Figura 2 –Dispositivo bucal (DB) contendo os discos de titânio alocados nos nichos preparados nas faces vestibulares

Nesses dispositivos foram incluídos os discos de titânio, em nichos de 11 mm por 4 mm de profundidade, previamente preparados. Os discos foram alocados na face vestibular de cada dispositivo bucal, em ambos os lados, em regiões de pré-molares e molares, sendo colocado um disco de cada grupo em cada lado do DB (A1, B1, C1 no lado direito e A2, B2, C2 no lado esquerdo, totalizando dois discos de cada grupo por paciente). Os discos foram fixados de acordo com uma combinação previamente estabelecida, de forma que todos foram distribuídos equitativamente nas posições mesiais, mediais e distais, tanto do lado direito, como do lado esquerdo. A fixação dos corpos de prova foi realizada com resina macia para reembasamento (Soft Confort[®], Dencril Comércio de Plásticos Ltda, Pirassununga, SP, Brasil) tomando-se o cuidado de vedar todos os outros lados dos discos, mantendo-se somente a face interessada exposta.

Após os discos serem fixados nos dispositivos bucais, os mesmos foram imersos em uma solução de álcool 70° GL durante 50 minutos, após o qual foram friccionados com gaze estéril por 1 minuto e, após evaporação do álcool, foram armazenados em caixas plásticas para aparelhos ortodônticos (Tecnident Equipamentos Ortodônticos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), que também passaram previamente por um processo de desinfecção por fricção com gaze estéril embebida

com álcool 70 durante 1 minuto (VENTURELLI et al., 2009). A figura 3 ilustra o processo de desinfecção dos dispositivos.



Figura 3 – Dispositivos bucais contendo os discos de titânio em processo de desinfecção em álcool 70 ° GL.

4.5 Experimento *in situ* adesão bacteriana nas superfícies de titânio

Dezoito participantes iniciaram o estudo apresentando-se com condições de saúde bucais semelhantes e padronização dos cuidados de higiene oral. Uma semana antes de iniciar o estudo, todos os participantes receberam tratamento de Oral raspagem supragengival para remoção de cálculo e biofilme. A rotina de instrução de higiene oral foi estabelecida e os participantes receberam um kit de higiene oral composto por escova de dente (B, Procter &Gamble do Brasil S.A. Manaus, AM, Brasil), fio dental (Hillo®, Hillo Ind. E Com.LTDA, Aperibê, R.J. Brasil), creme dental sem triclosan (Oral B, Procter & Gamble), um pacote com gaze estéril e duas embalagens de 10 ml cada contendo água destilada estéril (água para injeção, Samtec sorologia), para hidratar as gazes, além de serem instruídos a não utilizar nenhum tipo de enxaguatório bucal (Scarano et al., 2004). Os participantes utilizaram os DB com os discos de titânio durante 24 h, só removendo-as para as refeições e higiene dentária, devendo nessas ocasiões guardá-las nas caixas ortodônticas, as quais continham duas gazes estéreis que foram embebidas com

água destilada estéril para evitar a desidratação do biofilme. Durante o período de uso da moldeira os voluntários foram orientados a manter seus hábitos alimentares e de higienização bucal rotineiros, utilizando o material de higiene bucal fornecido pelos pesquisadores (GROSSNER-SCHREIBER et al., 2009). Além disso, foram instruídos a não escovar a região dos DB onde os discos estavam localizados (figura 4).



Figura 4 – Sujeito da pesquisa utilizando o dispositivo bucal contendo os discos de titânio.

Após 24 h de utilização dos DB, os participantes entregaram os dispositivos bucais aos pesquisadores. Os discos de titânio foram removidos das moldeiras de forma que não houvesse contato com a superfície onde o biofilme foi formado. Como cada participante utilizou a moldeira contendo dois discos de cada grupo, tivemos ao final do estudo 36 discos para cada grupo (ou seja, $n=36/\text{grupo}$, total de discos = 108). Desses 36 discos/grupo, 06 discos/grupo foram utilizados para a análise de MEV e outros 30 discos/grupo foram utilizados para as análises de cultura microbiológica.

Uma parte dos discos ($n=6/\text{grupo}$) foi colocada em um recipiente com gaze estéril umedecida para evitar a desidratação do biofilme e foram em seguida tratados para a análise de MEV. Os outros discos ($n=30/\text{grupo}$) foram colocados individualmente em tubos estéreis de poliestireno contendo 5 ml de solução de NaCl

0,9% estéril. Os discos de titânio foram removidos dos DB de forma que não houvesse contato com a superfície onde o biofilme foi formado, sendo ejetados diretamente nos tubos de poliestireno com a solução de NaCl 0,9% estéril. Esses discos foram submetidos à agitação em vórtex por 1 minuto, para o desprendimento total do biofilme e a suspensão dele na solução salina. Em sequência, uma alíquota foi utilizada para análise de cultivo microbiológico e o restante foi congelado à -80° C para futuras análises por qPCR.

4.6 Quantificação de microrganismos aderidos ao disco pela técnica de cultivo

Foi utilizada a técnica de cultivo bacteriano para a quantificação dos microrganismos viáveis (aeróbios e anaeróbios) aderidos aos discos de titânio num período de 24 h. Para isso, uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana formada a partir da dispersão dos biofilmes dos discos de titânio foi diluída 10, 100 e 1000 vezes em solução de NaCl 0,9% estéril. As diluições foram cultivadas em placas de Petri em dois meios de cultura:

- 1- Para cultivo de anaeróbios: Meio de cultura Schaedler Blood Agar – SBA (Difco®, Detroit, MI, EUA), acrescido de hemina 5µg/mL, menadiona 1 µg/mL e 5% de sangue de carneiro;
- 2- Para cultivo de aeróbios: Meio de cultura Tryptic Soy Agar – TSA (Difco), acrescido de 5% de sangue de carneiro.

As placas de SBA foram incubadas em jarras de anaerobiose contendo sistema de geração de atmosfera de anaerobiose Anaerobac (Probac do Brasil, São Paulo). As jarras foram colocadas em estufa comum com temperatura à 37°C, por 7 dias (figura 5).



Figura 5 - Preparação da jarra de anaerobiose previamente a incubação, com adição de água destilada ao gerador de anaerobiose.

As placas de TSA foram incubadas em estufa de aerobiose, à 37° C, por 03 dias. Após os respectivos períodos, foi realizada a contagem de colônias para a determinação das unidades formadoras de colônias contidas em cada disco.

4.7 Análise qualitativa da adesão bacteriana por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após 24 horas os dispositivos bucais de 3 participantes foram removidos e seis discos de cada grupo foram analisados no microscópio eletrônico de varredura (MEV - modelo JSM 5600LV, Jeol, Tóquio, Japão) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, com o objetivo de avaliar qualitativamente a adesão microbiana sobre as superfícies de titânio.

Para a visualização no MEV, os discos foram metalizados. Para isso, as amostras foram inseridas em placas de 24 poços, e fixadas em solução de PBS pH 7,4 acrescido de glutaraldeído a 3% por 24 h em temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi removido, os discos desidratados em concentrações crescentes de etanol (60%, 70%, 80%, 90%, e álcool absoluto), permanecendo 5 minutos em cada concentração de etanol. Após a desidratação, os discos foram secos a temperatura ambiente. Após a secagem, os discos receberam 3 ciclos de cobertura ouro-paládio no metalizador com ouro a 50 mA por 3 minutos. Após a

metalização os discos foram analisados no MEV em aumentos de 1.200, 2.500 e 4.000 vezes.

4.8 Análise estatística

Os dados de contagem microbiana (unidades formadoras de colônia por disco - ufc/disco) foram transformados em logaritmo na base 10, obtendo-se valores de log de ufc/disco. Esses dados foram submetidos a análise de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade pelo teste de Levene. Como, após a transformação dos dados, os mesmos apresentaram-se com distribuição normal e com equivalência nas variâncias, o teste ANOVA foi utilizado para comparar as diferenças entre os grupos usinado, com microtopografia e com nanotopografia. Não foi necessário utilizar um pós teste, já que não houve diferenças entre os grupos. O valor de alfa foi estabelecido em 0,05 e o programa estatístico utilizado foi o Bioestat (versão 5.0, Instituto Mamirauá, Belém, Pará).

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação da adesão de microrganismos aeróbios e anaeróbios

A quantificação de microrganismos aeróbios e anaeróbios foi realizada através de contagem total de microrganismos por disco, após os voluntários utilizarem os discos por 24 horas. Os dados de logaritmo de unidades formadoras de colônia de aeróbios e anaeróbios estão representados nas figuras 6 e 7 respectivamente.

Os valores de média e desvio padrão do logaritmo da contagem de aeróbios para os discos usinados, micro e nanotopografia foram: usinados ($6,65 \pm 0,38$), micro ($6,72 \pm 0,32$) e nano ($6,70 \pm 0,44$). Em valores de ufc/disco, a contagem microbiana foi representada pela média de $6,86 \times 10^6$ para o grupo usinado, $7,33 \times 10^6$ para o grupo micro e $7,56 \times 10^6$ para o grupo nano.

Para a contagem de anaeróbios, os valores de logaritmo da média e desvio padrão foram: usinados ($6,86 \pm 0,27$), micro ($6,80 \pm 0,50$) e nano ($6,94 \pm 0,41$). Em valores de ufc/disco, a contagem microbiana foi representada pela média de $8,70 \times 10^6$ para o grupo usinado, $1,13 \times 10^7$ para o grupo micro e $1,27 \times 10^7$ para o grupo nano.

Tanto a quantificação de aeróbios ($p=0,848$) quanto para a quantificação total de anaeróbios ($p=0,6703$), não houve diferença entre os grupos usinado, microtopografia e nanotopografia, ou seja, não houve incremento na quantidade de bactérias em decorrência da topografia da superfície dos discos (ANOVA).

Ainda, de acordo com a caracterização prévia das superfícies dos discos (tabela-1 em anexo), a rugosidade também não interferiu na adesão microbiana nas 24 h de exposição dos discos à cavidade bucal. Através da avaliação dos valores de S_a (rugosidade média- μm), S_d (referente à densidade de picos - mm^2) e S_{dr} (% área de superfície) (tabela-1), os discos com micro e nanotopografia possuem uma maior rugosidade do que o disco usinado; fato que não interferiu de forma significativa na adesão microbiana.

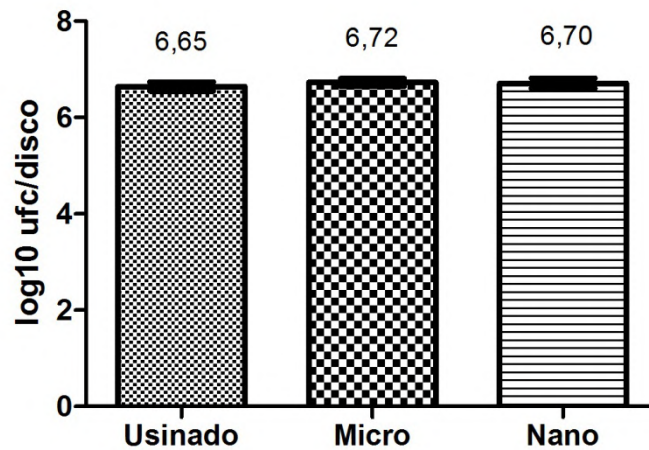


Figura 6 - Quantificação de microrganismos aeróbios por disco representados pelos valores de média e desvio padrão do logaritmo das unidades formadoras de colônia/ disco. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

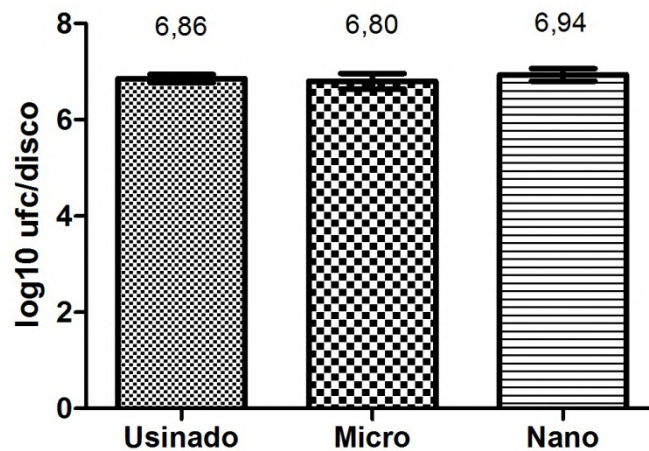


Figura 7 - Quantificação de microrganismos anaeróbios por disco representados pelos valores de média e desvio padrão do logaritmo das unidades formadoras de colônia/ disco. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Além da quantificação bacteriana por cultivo, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura para a visualização da aderência dos microrganismos na superfície dos discos. As imagens estão representadas em aumento de 2500 vezes,

para os discos usinado, com microtopografia e com nanotopografia (figura 8). Nessas imagens, foi possível observar a adesão de microrganismos de forma uniforme em toda a superfície dos 03 grupos experimentais. Houve a predominância de cocos, em sua grande maioria, com uma pequena representação de bacilos aderidos às superfícies. Ainda, corroborando os resultados encontrados na quantificação bacteriana, foi possível observar que a colonização bacteriana foi semelhante entre as superfícies lisa, com micro e nanotopografia.

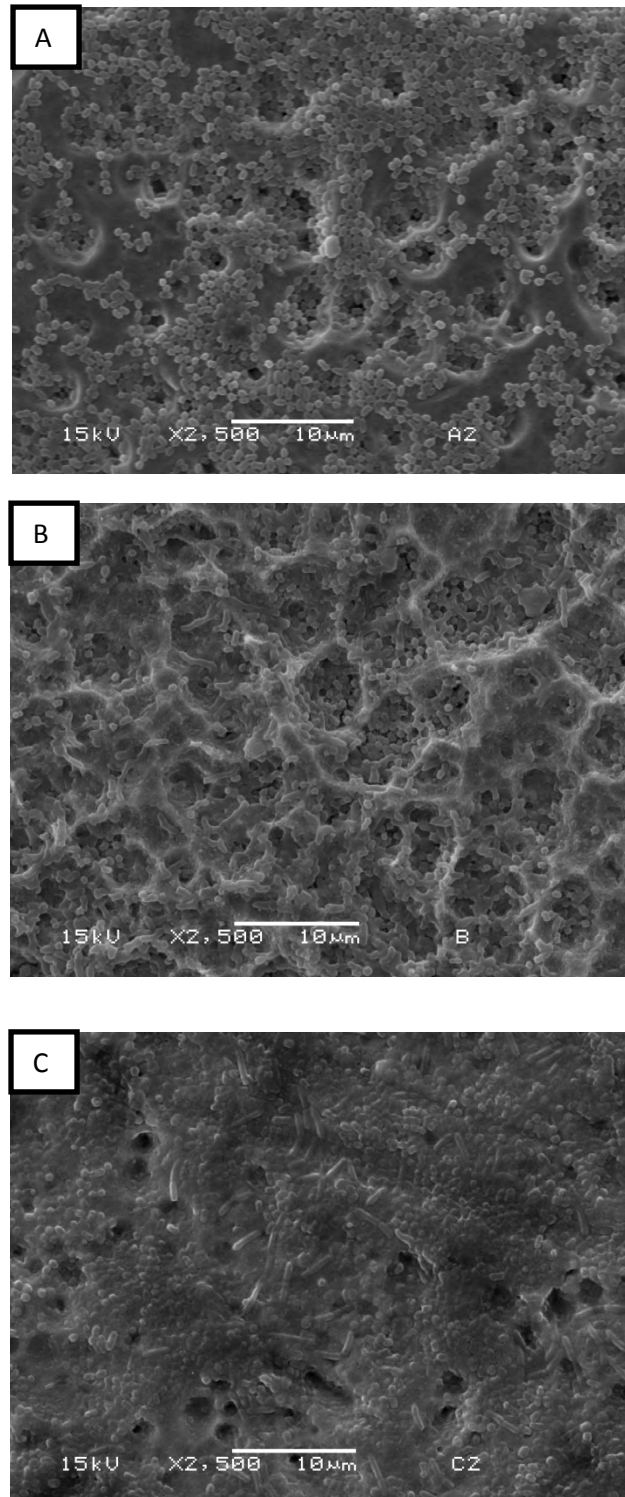


Figura 8 – Micrografias realizadas por MEV em aumento de 2500 vezes, representando a adesão bacteriana nos discos A (usinado), B (microtopografia) e C (nanotopografia).

6 DISCUSSÃO

As modificações nas superfícies dos implantes têm sido empregadas a fim de aumentar a área de contato com o osso (LAZARA et al., 1999; LANG JEPSEN, 2009), sendo que as superfícies rugosas e moderadamente rugosas normalmente aumentam a osseointegração quando comparadas com superfícies lisas (LANG e JEPSEN, 2009). Recentemente, uma superfície de titânio com nanotopografia caracterizada em escala nanométrica foi avaliada em relação aos parâmetros de osteogênese e de osseointegração, demonstrando bons resultados quanto a esses parâmetros (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011a). No entanto, apesar do aumento de rugosidade e a topografia favorecerem a osseointegração, ainda é desconhecido o quanto estes fatores estão relacionados ao aumento da colonização bacteriana na superfície dos implantes, em especial para essa superfície com nanotopografia. O presente mostrou que, as superfícies com nanotopografia são semelhantes em quantidade total de bactérias aderidas quando comparadas às superfícies com microtopografia e superfície lisa, o que indica que a topografia e a rugosidade nesse caso parecem não interferir na adesão bacteriana.

No presente estudo, a formação de biofilme em discos de titânio instalados em dispositivos orais usados por 18 voluntários no período de 24 horas foi analisada. Embora os trabalhos de Nascimento et al. (2014) tenham evidenciado que a posição dos discos na placa não influencia na quantidade de bactérias aderidas, optamos por uma distribuição das mesmas toda biomassa bacteriana à superfície, ou seja, em combinação de modo que todas se localizassem equitativamente nas posições mesiais, mediais e distais, tanto do lado direito, como do lado esquerdo pela facilidade proporcionada pelo número de sujeitos (n=18). A distribuição equitativa dos discos foi feita a fim de reduzir a interferência de parâmetros como a secreção salivar mais abundante próximo à região do segundo molar, que é secretada pelo ducto parotídeo, assim como uma possível desidratação dos discos localizados nas regiões mesiais de alguns voluntários que eram respiradores bucais (n=2).

O período de 24 horas para avaliação da adesão bacteriana foi escolhido com o intuito de avaliar a formação inicial de um biofilme, já que são os colonizadores iniciais os primeiros microrganismos a entrar em contato e interagir

com a superfície de titânio. Portanto, modificações nas superfícies, em princípio, poderiam interferir na adesão desses microrganismos que iniciam a adesão à película adquirida, ou seja, das bactérias que irão interagir mais diretamente com as proteínas da saliva aderidas em toda a superfície do material. Ainda, sabe-se que o perfil de colonização inicial pode determinar a força de adesão de toda biomassa bacteriana à superfície, ou seja, na constituição de todo o biofilme maduro (Rimondini et al., 1997). Além disso, a escolha de um período que caracteriza a formação inicial do biofilme foi feita levando em consideração algumas conclusões de estudos que relataram uma menor influência da rugosidade superficial considerando períodos superiores a 24 horas, ou seja, em períodos onde já existe a formação de um biofilme mais maduro (AL-AHMAD et al., 2010; NAKAZATO et al., 1997).

Sabemos que a adesão precoce de bactérias é influenciada majoritariamente pela rugosidade superficial do material (Nyvad e Fejerskov, 1987) e em segundo plano pela energia livre de superfície e composição química do material (QUIRYNEN e BOLLEN, 1996; SUBRAMANI et al., 2009; TELGHEUS et al., 2006). Em nosso estudo, os resultados não mostraram uma proporcionalidade entre grau de rugosidade e quantidade de microrganismos, discordando em parte com a grande maioria dos trabalhos presentes na literatura, que estabelece uma relação direta entre grau de rugosidade e formação precoce de biofilme (AL-AHMAD et al., 2013; BURGERS et al., 2009; DORKHAN et al., 2011; FRÖJD et al., 2011; NAKAZATO et al., 1997; QÜYRINEN e BOLLEN, 1995; RIMONDINI et al., 1997; SUBRAMANI et al., 2009; TELGHEUS et al., 2006)

Como já mencionado, o presente estudo avaliou a colonização bacteriana inicial em modelo *in situ* e mostrou que as superfícies com nanotopografia são semelhantes em quantidade total de bactérias aderidas quando comparadas às superfícies com microtopografia e superfície lisa, o que indica que a topografia e a rugosidade nesse caso não interferiram na adesão bacteriana.

Na busca de uma explicação para esse fato, analisamos que dentro da classificação de Albrektsson e Wennerberg (2004), dois dos três grupos de pastilhas usadas no nosso experimento seriam classificadas como superfície lisa, com valor de rugosidade média (S_a) de 0,28 μm e 0,27 μm respectivamente para superfície usinada e superfície com nanotopografia, ficando o terceiro grupo classificado como superfície minimamente rugosa, com S_a de 0,57 μm . Ainda, levando em

consideração os parâmetros como *Sds* e *Sdr*, os discos com micro e nanotopografia possuíam uma quantidade maior de picos por área do que o disco usinado. No entanto, essas diferenças nos parâmetros que definem a rugosidade não influenciaram as colonizações bacterianas totais de aeróbios e anaeróbios. Ou seja, talvez seja necessária uma maior diferença de rugosidade entre as superfícies para que haja diferenças na quantidade de microrganismos que iniciam a colonização. Também é digno de nota que a maior rugosidade média (*Sa*) das superfícies avaliadas é de 0,57 μm (microtopografia) e que todas as superfícies estão relativamente próximas aos valores de 200 nanômetros, valor de rugosidade média sugerida como limiar de valor de rugosidade média abaixo do qual a adesão de bactérias não pode mais ser reduzida, diminuindo-se a rugosidade do substrato (BOLLEN et al., 1996; QÜYRINEN et al., 1996; TELGHELS et al., 2006)

As superfícies avaliadas no presente estudo possuem diferentes topografias, o que as classificamos como superfícies lisas (usinadas), com microtopografia e com nanotopografia. Como já mencionado, essa caracterização das superfícies foi feita num estudo anterior (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011a) com análises em nível nanométrico. Apesar de já ter sido levantada a hipótese de que a topografia com picos e vales proporciona às bactérias proteção contra remoção das mesmas por forças de cisalhamento (NYVAD e FEJERSKOV, 1987; QÜYRINEN e BOLLEN, 1995) e que superfícies com nanotopografia possam proporcionar uma maior área de superfície para a adesão bacteriana, nosso estudo mostrou que a nanotopografia, não causou incremento na adesão bacteriana às suas superfícies, sendo semelhantes à superfície usinada e com microtopografia.

Sendo assim, os achados do presente estudo corroboram com outros estudos com superfícies com rugosidades abaixo de 1,0 μm como os estudos de Größner-Schreiber et al. (2001) (estudo *in vitro* de 1 hora, com rugosidades variando de 0,14 -1,0 μm), Fröjd et al. (2011b) (estudo *in vitro* de 2 e 14 horas, com rugosidades abaixo de 0,5 μm), Al-Ahmad et al. (2010) (*in situ* de 03 e 05 dias com rugosidades de 14,3-544,2nm). Esses estudos não encontraram correlação direta entre rugosidade e quantidade de biofilme, assim como também com outros estudos com rugosidades abaixo e acima de 1,0 μm , como Lin et al. (2013) (estudo *in vitro* de 01 e 3 dias) e Ribeiro (2013) (estudo *in situ* de 24 horas), que também não encontraram proporção entre a quantidade de biofilme e grau de rugosidade.

Na visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), da mesma forma que na quantificação bacteriana por cultura, foi possível observar uma distribuição de bactérias aderidas às superfícies dos discos de forma bastante semelhante. Predominantemente, os cocos foram os principais colonizadores, com a presença de alguns bacilos, o que caracteriza uma formação típica de um biofilme em estágio inicial.

Apesar de a rugosidade ser um dos principais fatores que podem influenciara adesão inicial do biofilme, outros fatores como a energia livre de superfície e composição química também podem alterar essa colonização (QÜRYNEN e BOLLEN, 1995 SUBRAMANI et al.,2009;, 1996;TELGHELIS et al., 2006). No presente estudo, a energia livre de superfície não foi caracterizada nas amostras; no entanto as análises de composição química das superfícies mostraram que não houve diferença entre as superfícies.

Dentro das limitações do presente estudo, podemos sugerir que superfícies com rugosidade abaixo de 0,5 µm podem não apresentar diferenças em relação à colonização bacteriana inicial. Ainda, apesar de parte de nossa hipótese inicial não ter sido confirmada, ou seja, de que a superfície com nanotopografia teria menor adesão bacteriana do que a superfície com microtopografia em função da diferença de rugosidade entre elas, ficoudemonstrado que a nanotopografia foi semelhante à superfície usinada nesta questão

A superfícies com nanotopografia são bastante promissoras, pois estudos tem demonstrado um aumento da aderência de tecidos moles e uma possível redução de perda óssea (WENNERBERG et al., 2009), que melhoram a osteogênese e osseointegração (SCHWARTZ-FILHO et al., 2011a) e também que as nanotopografias não alteram sua biocompatibilidade (DE WILDE et al., 2013). Em adição à essas características, nossos resultados indicam que essas superfícies de titânio com nanotopografia, apesar de apresentarem maiores densidade de picos (Sds) e área de superfície (Sdr) que a superfície usinada ,além de contar também com a presença de nanoestruturas, que esses fatores não influenciam na quantidade inicial de bactérias aderidas à superfície do titânio. No entanto, estudos qualitativos avaliando as espécies bacterianas aderidas são necessários para conhecer o perfil qualitativo de adesão bacteriana nessas superfícies.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que a superfície com nanotopografia não altera a adesão bacteriana em relação à superfície usinada e com microtopografia, considerando um período inicial de formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

- AL-ALMAD, A. et al. ***In vivo* study of the initial bacterial adhesion on different implant materials**. Archives of Oral Biology, v. 58, n. 2, p.1139-1147, set.,2013.
- ALBREKTSSON T1, WENNERBERG A. ORAL IMPLANT SURFACES: PART 1-- REVIEW FOCUSING ON TOPOGRAPHIC AND CHEMICAL PROPERTIES OF DIFFERENT SURFACES AND IN VIVO RESPONSES TO THEM. INT J PROSTHODONT. 2004 SEP-OCT;17(5):536-43.
- AL-RADHA,AFYA S. D. et al.**Surface properties of titanium and dental implant materials and their effect on bacterial adhesion**. J Dent, v. 40, n.2, p. 146-153,fev., 2012.
- ASTRAND, P. et al. **Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up**. Clin Implant Dent Relat Res, Berlin, v. 10, n.4, p. 207-217,abr. 2008.
- BOLLEN, C. M. et al.**The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis**.Clin Oral Implants Res, Copenhagen, v. 7, n.3,p. 201-211,set.1996.
- BÜRGER R. et al. ***In vivo ad in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces**.Clin Oral Implant Res, Copenhagen, 21, n. 2, p.156-164,Fev, 2010.
- DE BRANDÃO, M. L. et al.**Superfície dos implantes osseointegrados x resposta biológica**.Revista Implant News, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 95-101, jan.2010.
- De Wilde, EA et al. **The soft tissue immunologic response to hidroxyapatite-coated transmucosal implant surface: A study in humans**. Clin implant Dent Relat Res, v. *, N. *,p. 1-10, ago. 2013
- DORKHAN, M. et al.**Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium**. Microbiology, v. 158, n. 2, p. 390-397,fev. 2012.
- FRANSSON, C. et al.**Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants**.Clinoral Implants Res, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 440-446,ago. 2005.
- FRÖJD, V. et al.**In situ analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces**. Mol Oral Microbiology, v. 26, n. 4, p. 241-252, ago. 2011.
- FRÖJD, V. et al. **Effect of nanoporus TiO₂ coating and anodized Ca₂ modification of titanium surfaces on early microbial biofilm formation**. BMC Oral Health, v. 11, n. 8,mar.2011.

GROISMAN, M.; VIDIGAL JR, G. M. Tipos de superfície dos implantes dentários. In ALMEIDA, R. V. **Implantodontia**: Atualização clínica baseado em evidências científicas. São Paulo: Artes Médicas 2005. Cap. 1, p 01-14

GRÖSSNER-SCHREIBER, B. et al. **Plaque formation on surface dental implants**: an in vitro study. Clin Oral Implants Res, Copenhagen, v. 12, n. 6, p. 543-551, dez. 2001.

GRÖSSNER-SCHREIBER, B. et al. **Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions**. Clin Oral Implants Res, Copenhagen, v. 20, n. 8, p. 817-826, ago. 2009.

LANG, N. P.; JEPSEN, S. **Implant surface and design**. Clin Oral Implants Res, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 228-231, set. 2009.

LAZZARA, R. J. et al. **A human histologic analysis of Osteotite and machined surfaces using implants with two opposing surfaces**. Int J Period Rest Dent, v. 19, n. 2, p. 117-129, abr. 1999.

LEKHOLM, U.; GRÖNDAHL, K.; JEMT, T. **Outcome of oral implant treatment in partially edentulous jaws followed 20 years in clinical function**. Clin Implant Dent Relat Res, v. 8, n. 4, p. 178-186, abr. 2006.

LEKHOLM, U. et al. **Survival of the Branemark implant in the treatment of partially edentulous jaws**: a 10-year prospective multicenter study. Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v. 14, n. 5, p. 639-645, set./out. 1999.

LIN, H. Y. et al. **Effects of Oral Implant Surface Roughness on Bacterial Biofilm Formation and Treatment Efficacy**. Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v. 28, n. 5, p. 1226-1231, set./out. 2013.

LOPEZ, N.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. **Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease**. J Dent Res, v. 81, n. 1, p. 58-63, jan. 2002.

MOMBELI, A.; MÜLLER, N.; CIONCA, N. **The epidemiology of periodontitis**. Clin Oral Implants Res, Copenhagen, v. 23, n. 6, p. 67-76, out. 2012.

ATIEH, MA et al. **The frequency of Peri-Implant Diseases**: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Periodontol, Chicago, v. 84, n. 11, p. 1586-98, Nov. 2013

NAGEM FILHO, H. et al. **Influência da textura superficial dos implantes**. Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS, Porto Alegre, v. 22, n. 55, p. 82-86, jul. 2007.

NAKAZATO, G. et al. **In vivo plaque formation on implant materials**. Int J Maxillofac Implants, Lombard, v. 4, n. 4, p. 321-326, jul./ago. 1989.

NANCI, A. et al. **Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules.** J Biomed Mater Res, v. 40, n. 2, p. 324-335, mai. 1998.

NASCIMENTO, C. et al. **Bacterial adhesion on titanium and Zirconia abutment surfaces.** Clin Oral Impl Res Copenhagen, v.25, n.3,p.337-343, mar. 2014

NYVAD, N.; FEJERSKOV, O. **Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*.** Scand J Dent Res, v. 95, n. 4, p. 287-296, ago. 1987.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M. L. **The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: a review of the literature.** J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 22, n.1, p. 1-14, jan. 1995.

QÜYRINEN, M. et al. **The influence of titanium abutment surface roughness on plaque accumulation and gingivitis: short-term observation.** Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v. 11, n.2, p. 169-178, mar./abr. 1996.

RENVERT, S.; POLZOIS, I.; CLAFFEY, N. **How do implants surface characteristics influence peri-implant disease?** J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 38, n. 11, p. 214-222, mar. 2011.

RIBEIRO, C. F. **Formação e aderência do biofilme inicial em discos de titânio comercialmente puro com diferentes tratamentos de superfície: estudo in situ.** Universidade de Taubaté. Taubaté. 2013.

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

ROSS-JANSÄKER, A. M. et al. **Nine to fourteen-year follow-up of implant treatment: Part I: implant loss and associations to various factors.** J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 33, n. 4, p. 283-289, abr. 2006.

ROSS-JANSÄKER, A. M. et al. **Nine to fourteen-year follow-up of implant treatment: Part II: presence of peri-implant lesion.** J Clin Periodontol, Copenhagen, v. 33, n.4, p. 290-295, abr. 2006.

SCARANO, A. et al. **Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an *in vivo* human study.** J Periodontol, Chicago, v.75, n. 2, p. 292-296, fev. 2004.

SCHWARTZ-FILHO, H.O. **Osteogênese sobre titânio com nanotopografia.** 2011. 196fls. Tese (doutorado em odontologia) – Faculdade de odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2011(a)

SCHWARTZ-FILHO, H. O. et al. **Evolução dos implantes dentários.** In TUNES, U. R.; DOURADO, M.; BITTENCOURT, S. **Avanços em periodontia e implantodontia: paradigmas e desafios.** Nova Odessa: Editora Napoleão, 2011(b), cap. 11. p.272-305.

SCHWARTZ-FILHO, H. S. et al. **Titanium surfaces with micro and nanotopography modulate cytokine production in cultured human gingival fibroblast.** J Biomed Mater Res A, v. 100, n. 10, p. 2629-2636, out. 2012.

SCHWARZ, E. et al. **Effects of hydrophilicity and microtopography of titanium implant surfaces on initial supragingival plaque biofilm formation: A pilot study.** MundKieferGesichtsChir, Basel, v. 11, n. 6, p. 333-338, dez. 2007.

SEMENOFF, T. A. et al. **Effect of chronic stress in newborn rats on the progression of ligature-induced-periodontitis in adulthood.** Acta Cir Bras, São Paulo, v. 28, n. 9, p. 652-656, set. 2013.

SUBRAMANI, K. et al. **Biofilm on dental implants: a review of the literature.** Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v. 24, n. 4, p. 616-626, jul./ago. 2009.

SVANBORG, L. M.; ANDERSSON, M.; WENNERBERG, A. **Surface characterization of commercial oral implants on the nanometer level.** J Biomed Mater Res B: Appl Biomaterial, v. 92B, n.2, p. 462-469, fev. 2010.

SYKARAS, N. et al. **Implant materials, design and surface topography: their effect on osseointegration. A literature review.** Int J Oral Maxillofac Implants, Lombard, v. 15, n. 5, p. 675-690, set./out. 2000.

TELGHELIS, W. et al. **Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development.** Clin Oral Impl Res, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 68-81, out. 2006.

VENTURELLI, A. C. et al. **Avaliação microbiológica da contaminação em diferentes tipos de alicates ortodônticos após desinfecção com residual álcool 70%.** R Dental Press OrtodonOrtop Facial, Maringá, v. 14, n. 4, p. 43-52, abr. 2009.

WENNERBERG, A. et al. **A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two roughnesses.** Clin Oral Implant Res, Copenhagen, v. 9, n. 1, p. 11-19, fev. 1998.

WENNERBERG, A. et al. **Nanoporous TiO₂ thin film on titanium oral implants for enhanced human soft tissue adhesion: A light and electron microscopy study.** Clin Implant Dent Relat Res, v. 13, n. 3, p. 184-96, set. 2011

ZARB, GA. **Proceedings of the Toronto Conference on Osseointegration in clinical Dentistry,** may 1982, Saint Louis- Ed mosby, 1983

ANEXOS

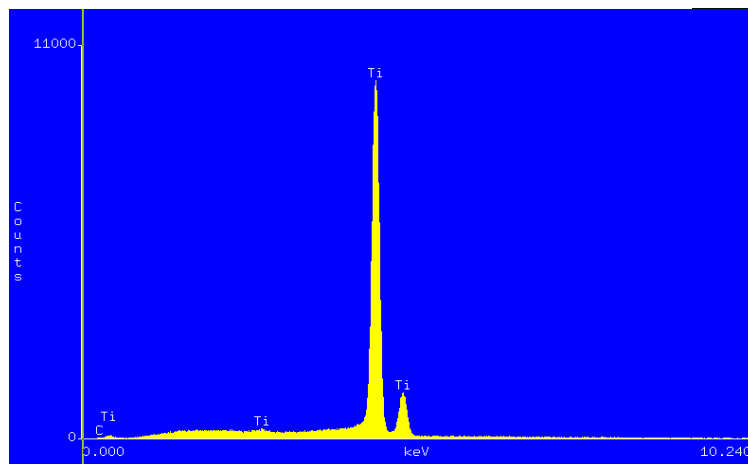
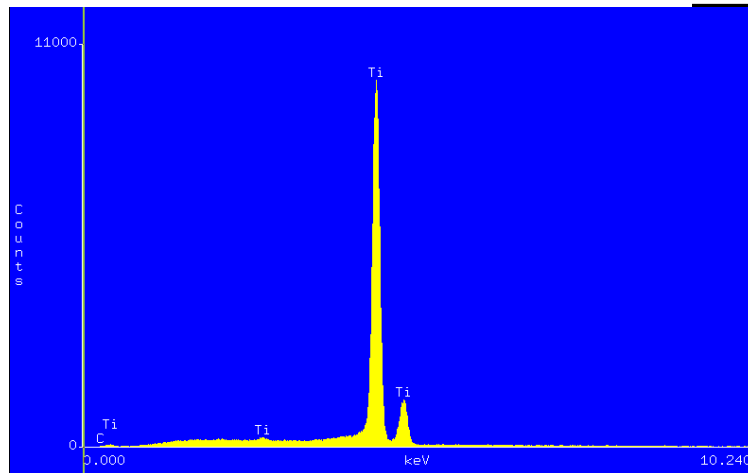
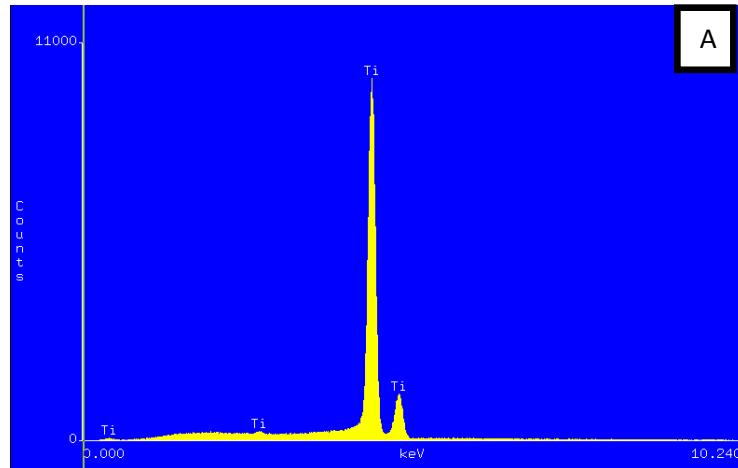


Figura 9: gráficos demonstrando a composição química das amostras analisadas por EDS (Espectroscopia por energia dispersiva de raio X). (A) usinada, (B) microtopografia e (C) nanotopografia. Fonte: Schwartz –Filho et al., 2012

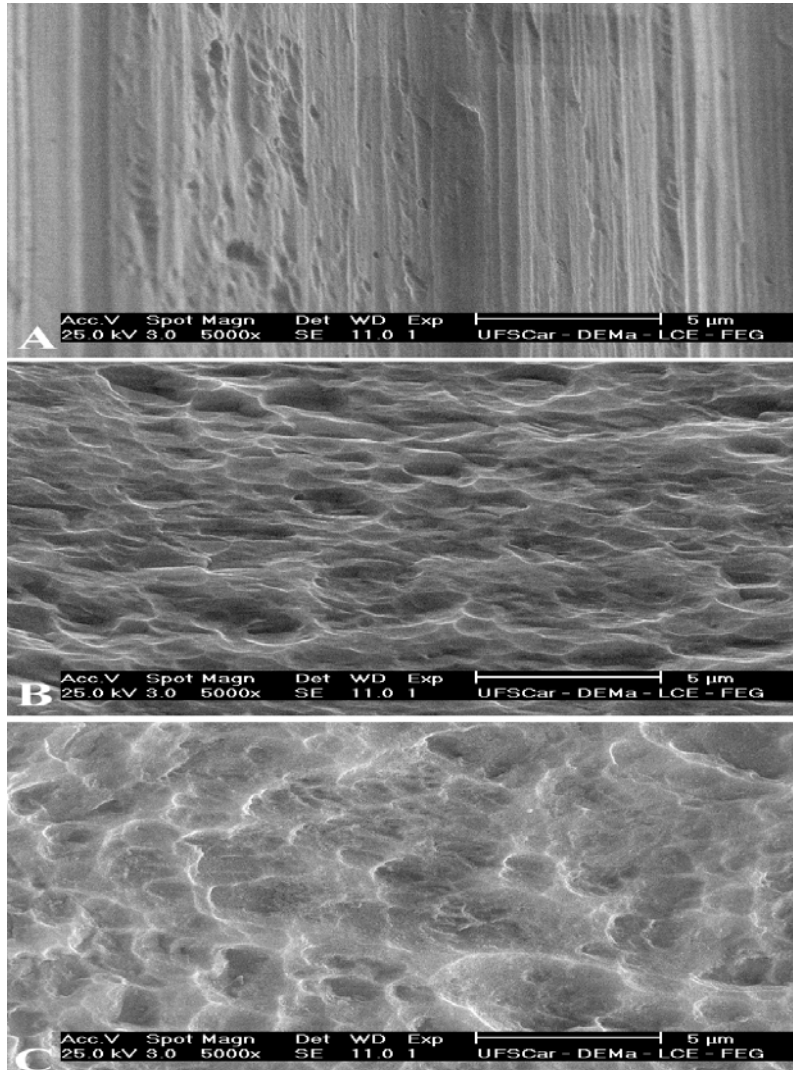


Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura dos 3 tipos de superfície estudadas: superfície usinada (A), superfície com microtopografia (B) e superfície com nanotopografia (C). Fonte: Schwartz Filho et al., 2012

Tabela 1 – Média e desvio padrão da rugosidade dos valores de rugosidade de superfície (S_a), densidade de picos (S_{ds}), razão de área de superfície (S_{dr}) por meio do interferômetro óptico na escala micrométrica ($n=3$).

	$S_a \mu\text{m}$	$S_{ds} \text{mm}^2$	$S_{dr} \%$
Usinado	$0,28 \pm 00,2$	148.322 ± 29.769	$3,40 \pm 1,47$
Micro	$0,57 \pm 00,5$	195.900 ± 9.838	$10,87 \pm 1,06$
Nano	$0,27 \pm 00,7$	195.203 ± 7.871	$8,15 \pm 0,53$

Fonte: Schwartz Filho et al., 2012

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da formação de biofilme em discos de titânio com micro e nanotopografia: estudo in situ e in vitro.

Pesquisador: Karina Cogo Müller

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 25698614.8.0000.0081

Instituição Proponente: Universidade de Santo Amaro - UNISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 544.111

Data da Relatoria: 27/02/2014

Apresentação do Projeto:

De acordo com os pesquisadores, alterações nas superfícies dos implantes têm sido realizadas com o intuito de melhorar a sua osseointegração e a integração com os tecidos moles; e essas alterações podem alterar características que influenciam tanto na adesão celular como na adesão bacteriana.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a formação de biofilme entre três superfícies de titânio: superfície lisa, superfície micrometricamente rugosa e superfície nanometricamente rugosa, em estudo in vitro e in situ em pacientes saudáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição não prevê riscos maiores que desconforto semelhante ao causado pelo uso de placas oclusais e oferece apoio dos profissionais nesse caso.

Os benefícios são indiretos por se tratar de estudo de interesse primeiro científico com repercussões práticas a depender de seus resultados.

Endereço: Rua Prof. Ezequias de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuías **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2141-6687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Programa 011.016-03

Continuação do Parecer: 544.111

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O recrutamento se dará entre alunos do Curso de Odontologia, graduação e pós-graduação, em intervalos de aulas. Os procedimentos serão realizados na Clínica de Odontologia da UNISA. Portanto, trata-se de intervenções que ocorrerão dentro do Curso cujo Coordenador assinou a Folha de Rosto, não restando solicitar mais autorizações.

De acordo com declaração da pesquisadora os discos são originários de material restante de outra pesquisa, doados pelo antigo pesquisador, Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho, pesquisador da UNISA e colaborador no presente estudo. Termo de doação foi anexado; assim também documentação que comprova essa utilização anterior. Não há contrapartida conforme afirmação da pesquisadora. Orçamento detalhado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de Esclarecimento e TCLE modificados conforme a solicitação deste CEP.

Recomendações:

Em próximas remessas incluir as alterações e as respostas de pendências no texto da Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram respondidas de forma considerada adequada para aprovação em revisão ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Prof. Emílio de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuías CEP: 02.450-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 E-mail: pesquisaurisa@unisa.br

Página 032 de 033



UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 544.111

SAO PAULO, 27 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Celso Ferreira Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. Ernés de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Irbuías CEP: 02.450-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8667 E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

Página 03 de 03