JÚLIA DE ALMEIDA SMANIO

Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise *in vitro*

São Paulo

2017

JÚLIA DE ALMEIDA SMANIO

Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise *in vitro*

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Smanio, Júlia de Almeida.
Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise in vitro / Júlia de Almeida Smanio ; orientador Rodney Garcia Rocha. -- São Paulo, 2017.

89 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Mucosite. 2. Periimplante. 3. Nanopartícula de prata. 4. Componentes protéticos. I. Rocha, Rodney Garcia.II. Título.

Smanio JA. Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise *in vitro.* Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / / 2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Aos meus pais **Henrique e Neila**,
pelo incansável amor, carinho, apoio e dedicação e por me contagiarem, dia a dia, com a paixão que sempre tiveram pela odontologia.

À minha irmã **Thaís**,
por ser minha melhor amiga e companheira desde sempre.

Ao meu marido **Adriano**,
por todo seu amor e parceria e por sempre dar mais leveza aos meus dias.

À minha filha **Cecília,**
por me mostrar a minha melhor parte.

À minha grande família **Almeida Smanio**,
por me ensinar a importância da união, do amor, da gratidão e da humildade para o crescimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha,** pela oportunidade, apoio e orientação.

Ao **Prof. Dr. Mario Sérgio Soares,** pela orientação e exemplo de professor e de pessoa que é para mim. O senhor é um dos maiores responsáveis por essa etapa na minha vida profissional. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar e por, mesmo com toda sua seriedade, sempre me oferecer uma palavra de carinho e incentivo. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano** pela ajuda e ensinamentos desde a graduação. Obrigada por ter me dado essa oportunidade e ter acreditado em mim. A maneira paciente e tranquila que você ensina seus alunos é inspiradora. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez,** pela atenção e pelas horas dedicadas a me ajudar, sempre muito atencioso.

Ao **Prof. Dr. Mario Julio Avilla-Campos,** por todos os ensinamentos e ajuda.

À **Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer,** por toda a dedicação, atenção e ajuda nessa jornada. Obrigada pela compreensão e apoio.

Aos colegas de laboratório, em especial ao **Prof. Dr. Bruno Bueno** que ajudou a esclarecer muitas dúvidas ao longo desse estudo.

Ao técnico Leo Cruz muito obrigada por me ajudar a entender melhor a rotina do laboratório.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada**, Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, Prof. Dr. Flávio Eduardo Guillin Perez, Prof. Dr. José Leonardo Simone, Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti, Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge, Profa. Dra. Isabel Peixoto, Profa. Dra. Sibele Sarti Penha, Profa. Dra. Inês A. Buscariollo e Profa. Dra. Carina Domaneschi** pela ajuda e por colaborarem com a minha formação acadêmica.

À querida **Viviane Arenas,** pela sua paciência e dedicação. Obrigada por me ensinar, passo a passo, tudo aquilo que eu precisava para realizar essa pesquisa. Seu dom para ensinar é algo muito natural e bonito.

Aos colegas **de pós-graduação e alunos de graduação da Clínica Integrada** que dividiram comigo momentos de aprendizagem e conquistas.

Aos amigos **José Luiz** e **Jussara Junqueira** pelo incentivo e apoio que sempre deram na minha formação.

Aos queridos **Laura, Leandro, Carla, Caio, Cynthia, Sandro** e **Bruna** pela amizade desde a graduação. É muito bom perceber como estamos amadurecendo e alcançando nossos objetivos sempre juntos, torcendo uns pelos outros. Amo vocês.

As secretárias da Pós-graduação **Alessandra Moreira de Lima e Cátia Tiezzi dos Santos** por toda atenção e ajuda.

A secretária da disciplina de Clínica integrada, **Regina Santos**, por todo carinho, dedicação e ajuda.

“Estude a si mesmo, observando que o autoconhecimento traz humildade e sem humildade é impossível ser feliz.”

Allan Kardec

RESUMO

Smanio JA. Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise *in vitro* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

Um dos maiores desafios da Implantodontia é manter a osseointegração e a saúde dos tecidos peri-implantares após a instalação da prótese. Para que uma reabilitação sobre implantes tenha longevidade é necessário que se realize a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares. Existe uma relação direta entre o acúmulo de biofilme e a presença da inflamação desses tecidos, denominada mucosite. Essa condição pode evoluir para uma peri-implantite. A proposta deste estudo foi encontrar uma solução preventiva às doenças peri-implantares, através do controle do biofilme. Avaliou-se a ação antibacteriana de três tipos de revestimentos nanoestruturados com prata aplicados à superfície de discos de titânio frente a cepas de microrganismos peri-implanto-patogênicos. Após determinado o melhor revestimento, analisou-se, também, se a quantidade de prata (3 ou 6 camadas) melhorava sua ação antimicrobiana. Foram confeccionados discos de titânio divididos em 4 grupos: titânio sem deposição (controle), titânio com deposição de solução coloidais de prata e sílica (Si02), titânio com deposição de solução coloidal hidrotermalizada de prata e dióxido de titânio (TiAg) e titânio com deposição de solução hidrotermalizada somente com dióxido de titânio (TiAa). Testou se a efetividade da atividade antimicrobiana dos revestimentos estudados por meio da contagem das colônias bacterianas, encontradas na superfície das placas de ágar sangue. Para permitir uma contagem correta do crescimento das colônias, realizou se diluição seriada e, após incubação a 37°C em anaerobiose, a contagem do número de colônias e, posteriormente, o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Após determinação do melhor revestimento, foram desenvolvidos biofilmes monoespécie sobre discos de titânio com 3 e 6 camadas do revestimento SiO2, além dos grupos controle positivo (C.positivo) e negativo (C.negativo), utilizando as cepas *Streptococcus gordonii*. A atividade microbiana nos biofilmes foi determinada pelo método de XTT. Utilizou-se três discos de cada grupo por teste (triplicata) e realizado a leitura em espectrofotômetro à 450 nm e 492 nm. Os resultados obtidos com cepa

de *A. actinomycetemcomitans*, apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,01$) entre o grupo controle (branco) e os grupos teste. Observou-se um maior número de bactérias *A.a* na superfície branca quando comparado com as superfícies nanoestruturadas com prata, sendo que o grupo SiO2 foi o que apresentou melhor resultado. Notou-se, também, que houve uma maior quantidade da bactéria *P.gingivalis* na superfície dos discos brancos quando comparado com os grupos com revestimentos nanoestruturados com prata. As bactérias *S.aureus e F.nucleatum* , porém, não apresentaram redução nos discos com filmes nanoestruturados quando comparados ao disco sem revestimento. Os discos com 6 camadas do revestimento SiO2 apresentaram eficiência semelhante a clorexidina 0,12%, na redução do biofilme da *S.gordonii*. Conclui-se que os revestimentos nanoestruturados com partículas de prata foram efetivos na redução de UFC/ml das bactérias *A. actinomycetemcomitans* e P*.gingivalis*, com o melhor resultado observado com revestimento SiO2. A concentração da prata interferiu positivamente nos resultados com a bactéria *S.gordonii.*

Palavras-chave: Mucosite. Peri-implantite. Nanopartícula de prata. Componentes protéticos.

ABSTRACT

SMANIO JA. Antibacterial coating silver particles with nanostructured titanium applied in titanium action against pathogenic peri-implant bacteria. In vitro analysis. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

One of implantology's major challenge is to maintain the osseointegration and health of the peri-implant tissues after the installation of the prosthesis. To ensure implant rehabilitation's longevity it is necessary to maintain the health of the peri-implant tissues. There is a direct relationship between the accumulation of biofilm and the presence of inflammation of these tissues, called mucositis. This condition can progress to peri-implantitis. The purpose of this study was to find a preventive solution to peri-implant diseases through biofilm control. For this, the antibacterial action against strains of peri-implant-pathogenic of three types of nanostructured coatings with silver applied to the surface of titanium discs microorganisms was evaluated. After determining the best coating, it was also analyzed whether the amount of silver (3 or 6 layers) improved its antimicrobial action. Titanium disks were divided into 4 groups: titanium without deposition (control), titanium with deposition of colloidal solution of silver and silica (SiO2), titanium with deposition of colloidal hydrothermalized solution of silver and titanium dioxide (TiAg) and titanium with deposition of a hydrothermal solution only with titanium dioxide (TiAa). The effectiveness of the coatings was tested by counting the bacterial colonies found on the surface of the blood agar plates. In order to allow a correct colony count, a serial dilution was performed and, after incubation at 37 ° C in anaerobiosis, counting the number of colonies and, later, calculating the colony forming units (CFU / mL). After determination of the best coating, monospecies biofilms were prepared on 3 and 6 layer titanium discs of the SiO2 coating, in addition to the positive control (C.positive) and negative (negative) groups, using *Streptococcus gordonii* strains. The microbial activity in biofilms was determined by the XTT method. Three disks of each group were used per test (triplicate) and the spectrophotometer read at 450 nm and 492 nm. The results obtained with *A. actinomycetemcomitans* strain presented a statistical difference ($p \leq 0.01$) between the control group (blank) and the test groups. A higher number of *A.a* bacteria was observed on the blank surface when compared to the

nanostructured surfaces with silver, and the SiO2 group showed the best results. It was also noted that there was a greater amount of *P.gingivalis* bacteria on the surface of the blank discs when compared to the groups with nanostructured coatings with silver. The bacteria *S. aureus* and *F. nucleatum*, however, did not present reduction in the discs with nanostructured films when compared to the disc without coating. The 6-layer discs of the SiO2 coating presented similar efficiency to 0.12% chlorhexidine in reducing the *S. gordonii* biofilm. We concluded that nanostructured coatings with silver particles were effective in reducing CFU/ml of *A. actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* bacteria and the best result was observed with SiO2 coating. The concentration of silver interfered positively decreasing S.gordonii bacteria number.

Keywords: Mucositis. Peri-implantite. Silver nanoparticle. Prosthetic components.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Discos esterilizados, com três em cada embalagem 50

Figura 4.2 – Esquema de deposição por dip-coating 53

Figura 4.3 – Imagem em MEV-FEG das superfícies: Substrato em titânio sem deposição (Ti) e com deposição das soluções coloidais SiO_2, TiAA e TiAg. Aumento original de 1.000X 54

Figura 4.4 – Teste antimicrobiano 56

Figura 4.5 – Escala *McFarland*.....57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Composição e concentração de Ativo, Prata (Ag) ou Dióxido de Titânio (TiO2) e o meio/solvente de cada solução utilizada para obtenção dos filmes bactericidas.....50

Tabela 4.2 – Preparo da padrão nefelométrico de *McFarland*.....58

.....

Tabela 5.1 – Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *S. aureus* 61

Tabela 5.2 – Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *P.gingivalis* 61

Tabela 5.3 – Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *A. Actinomycetemcomitans* 62

Tabela 5.4 – Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *F. Nucleatum* 62

Tabela 5.5 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *A.a* 65

Tabela 5.6 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *P.g.* 65

Tabela 5.7 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *S.aureus* 66

Tabela 5.8 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *F. nucleatum*.....66

Tabela 5.9 – Valores da leitura com espectrofotômetro à 450nm da bactéria *S.gordonii* 66

Tabela 5.10 – Valores da leitura com espectrofotômetro à 492nm da bactéria *S. gordonii* 67

Tabela 5.11 – Comparações entre os grupos do número de bactérias 68

Tabela 5.12 – Comparações múltiplas entre os grupos 68

Tabela 5.13 – Comparações entre os grupos do número de bactérias e leitura em diferentes comprimentos de onda 70

Tabela 5.14 – Comparações entre os grupos do número de bactérias 71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *A.a* 63

Gráfico 5.2 – Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *P.g* 63

Gráfico 5.3 – Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *S.aureus* .64

Gráfico 5.4 – Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *F. Nucleatum* 64

Gráfico 5.5 – Comparações entre os grupos do número de bactérias.....69

Gráfico 5.6 – Comparações entre os grupos do número de bactérias e leitura em diferentes comprimentos de onda.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	celsius
cm	centímetro
g	grama
L	litro
µL	microlitro
mg	miligrama
min	minuto
nm	nanômetro
PBS	Phosphate Buffer Saline
XTT	2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-5-[(phenylamino)carbonyl] -2H -tetrazolium-hydroxide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2 REVISÃO DE LITERATURA 27
2.1 DOENÇAS PERI-IMPLANTARES 27
2.1.1 Prevalência 27
2.1.2 Diagnóstico 28
2.1.3 Aspectos Microbiológicos 30
2.1.2 Tratamento e Prognóstico 33
2.2 PRATA E NANOTECNOLOGIA 38
3 PROPOSIÇÃO 47
4 MATERIAL E MÉTODOS 49
4.1 MATERIAL 49
4.1.1 Discos de Titânio 49
4.1.2 Material de consumo e permanente 51
4.1.2.1 Material de consumo – biossegurança 51
4.1.2.2 Material de consumo – Testes Antibacterianos 51
4.1.2.3 Material permanente 52
4.2 MÉTODOS 52
4.2.1 Síntese do filme nanoestruturado com prata 52
4.2.2 Teste Antibacteriano comparando os revestimentos SiO2, TiAa e TiAg 54
4.2.2.1 Escala de McFarland 57
4.2.3 Teste Antibacteriano comparando o revestimento SiO2 com 3 e 6 camadas 58
4.2.3.1 Teste XTT 60

5 RESULTADOS 61
5.1 TESTE ANTIBACTERIANO COMPARANDO OS REVESTIMENTOS SiO2, TIAa E TIAg... 61
5.1.1 Valores das unidades formadoras de colônia 61
5.1.1.2 Análise estatística 62
5.2 TESTE ANTIBACTERIANO COMPARANDO O REVESTIMENTO SiO2 COM 3 E 6 CAMADAS 66
5.2.1 Análise estatística 67
5.2.1.1 Comparações entre os grupos 67
5.2.1.2 Comparações entre os grupos e comprimentos de ondas 69
6 DISCUSSÃO 73
7 CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS 83

1 INTRODUÇÃO

O cuidado com a manutenção da osseiontegração após a instalação das próteses pode proporcionar maior longevidade e estabilidade à reabilitação. Este desafio será alcançado com a tentativa de preservação da integridade do epitélio juncional ao redor do sistema implanto-prótese, por se tratar da primeira e principal barreira de proteção frente às constantes agressões químicas e microbiológicas existentes no meio bucal.

Existe uma relação direta entre o acúmulo de biofilme e a presença da inflamação tecidual ao redor dos implantes. Estas alterações inflamatórias teciduais caracterizam a mucosite, uma condição reversível que, se não interrompida, pode evoluir para um processo com maior destruição do tecido ósseo de sustentação, que poderá levar a perda do implante, devido à instalação da peri-implantite.

As análises de amostras do biofilme da doença peri-implantar indicam que se trata de uma infecção anaeróbica mista (Mombelli; Décaillet, 2011). Na maioria dos casos, a composição da flora é semelhante à flora subgengival de periodontite crônica que é predominante de bactérias Gram negativas. Os efeitos benéficos das intervenções mecânicas e químicas para interromper a formação do biofilme peri-implantar demonstram que os microrganismos estão envolvidos diretamente no processo da doença, mesmo que eles não sejam sempre a origem da doença.

Os recentes avanços na qualidade da osseointegração, tanto por meio de alterações físicas macro e micro estruturais na superfície quanto à inclusão de propriedades químicas também contribuíram para elevar os riscos de adesão bacteriana e dificultarem a sua descontaminação durante o tratamento

Uma vez manifestada os sinais da doença peri-implantar, o tratamento pode requerer desde o controle do biofilme com clorexidina ao debridamento mecânico e polimento, antibioticoterapia sistêmica e local ou mesmo procedimentos regenerativos, nos casos avançados de peri-implantite. Observam-se evidências clínicas que a terapia não cirúrgica, como desinfecção e antibioticoterapia, pode ser mais eficaz no tratamento das mucosites, mas com grande dificuldade de resoluções das peri-implantites.

A utilização de partículas de prata tem sido pesquisada na implantodontia com o objetivo de evitar a resistência ao tratamento com antibióticos bem como determinar novas formulações e novos materiais com propriedades efetivas na redução bacteriana. Este metal possui característica antimicrobiana de amplo espectro capaz de promover o colapso da membrana plasmática levando ao esgotamento dos níveis de ATP intracelular. Essas partículas, quando organizadas em estruturas nanométricas, podem proporcionar alguns benefícios, como maior reatividade e durabilidade.

Neste sentido, estudos que investiguem a eficiência do controle do biofilme antes da instalação da doença pri-implantar é fundamental para diminuirmos sua incidência e as grandes dificuldades relativas ao seu tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS PERI-IMPLANTARES

2.1.1 Prevalência

Para avaliar o sucesso de um implante dentário, a estabilidade dos tecidos moles e ósseo é essencial. Esta estabilidade morfológica, entretanto, só poder ser avaliada por critérios clínicos ou por comparações radiográficas.

A sobrevida, à longo prazo, dos implantes dentários depende, em grande parte, do controle de infecções bacterianas na região peri-implantar; isto é, o resultado do equilíbrio entre as defesas do hospedeiro e os microrganismos patogênicos.

Em 1994, Albrektsson e Isidor definiram, dentre as doenças perimplantares, a mucosite como sendo uma inflamação dos tecidos marginais ao redor de implantes em função que, assim como a gengivite, é um processo reversível. Já o conceito de peri-implantite é descrito como um processo inflamatório que resulta em perda óssea ao redor de implantes osseointegrados em função.

Patógenos periodontais estão presentes nos tecidos inflamados ao redor dos implantes; a microbiota de implantes bem sucedidos é semelhante à de um periodonto saudável (Lee et al.,1999).

O Sixth European Workshop in Periodontics, realizado em 2008, definiu as doenças peri-implantares sendo a mucosite a presença de inflamação da mucosa peri-implantar sem sinais de perda de suporte ósseo que ocorre em 80% dos pacientes e em 50% dos implantes, enquanto a peri-implantite, além de inflamação da mucosa, caracteriza-se por uma perda de suporte ósseo e é observada em 28-56% dos pacientes e 12-43% dos implantes (Ziztmann; Berglundh, 2008).

Com o incremento do número de pacientes com implantes a taxa de doenças peri-implantares tem aumentado a uma incidência que varia de 0,5 a 3% ao ano. Entretanto, Heitz-Maiyfield (2008) observaram que em pacientes sem histórico de periodontite a taxa sobrevida do implante foi de 96,5%; nos pacientes com histórico prévio de periodontite essa taxa aproximou se de 90,5%.

Um estudo realizado em clínicas particulares com 245 pacientes e 964 implantes instalados mostrou, de acordo com um programa de manutenção periodontal, uma prevalência de cerca de 16% de peri-implantite e 39% de mucosite Além disso, demonstraram que apenas 11,1% dos pacientes com diagnóstico de peri-implantite e submetidos a um novo tratamento com implantes tiveram saúde peri-implantar na região da segunda implantação (Mir-Mari et al., 2012).

Dados epidemiológicos coletados na literatura por Derks e Tomasi (2015) mostraram uma média dos índices de prevalência para mucosite de 43%, com intervalo de confiança (IC) 32-54%, e 22% (IC: 14-30%) para peri-implantite.

2.1.2 Diagnóstico

A aderência e a colonização de bactérias presentes na microbiota oral em superfícies de biomateriais expostos, como o titânio, são os principais fatores etiológicos da periodontite e da peri-implantite. Essa aderência contribui para o desenvolvimento da infecção (Romeo et al., 2004).

Lindhe et al. (2008) revelaram que o processo infeccioso peri-implantar desencadeia, primeiramente, uma inflamação, com sangramento à sondagem e restrita aos tecidos moles adjacentes ao implante, denominada mucosite peri-implantar. A peri-implantite é a evolução desse quadro, em que a lesão da mucosa é frequentemente associada à supuração e profundidade à sondagem, sempre acompanhada por diminuição dos níveis ósseos resultante da reabsorção marginal peri-implantar.

Em revisão sistemática, Lang et al. (2011) compararam as diferenças no aspecto patogênico entre a mucosite peri-implantar e a gengivite. Segundo esses autores, a resposta do hospedeiro a biofilmes não difere substancialmente em dentes ou implantes. O sinal mais evidente clinicamente em ambos os casos é o desenvolvimento de uma lesão inflamatória, como resultado do acúmulo bacteriano. Tanto a gengivite como a mucosite são precursoras para lesões mais prejudiciais e, portanto, têm de ser diagnosticadas corretamente. Concluíram, então, que a gengivite e a mucosite não são fundamentalmente diferentes no ponto de vista patogênico e de diagnóstico.

Outra revisão sistemática realizada por Berglundh et al. (2011) analisou as características histopatológicas entre lesões peri-implantares e periodontais coletadas de humanos. Enquanto há na literatura muitas pesquisas sobre as características histopatológicas das lesões de periodontite em humanos, poucos estudos avaliam as lesões peri-implantares em material de biópsia humana. Nos materiais de biópsia humana avaliados, foi possível observar que a extensão apical do infiltrado de células inflamatórias (TIC) foi mais pronunciado na peri-implantite do que na periodontite. As células plasmáticas e linfócitos estavam presentes em ambos os tipos de lesões, ao passo que, os granulócitos, neutrófilos e macrófagos aparecem em proporção maior em sítios com peri-implantite. Os autores concluíram que, apesar das semelhanças quanto às características clínicas e etiologia da peri-implantite e periodontite, existem diferenças histopatológicas significativas entre as duas lesões.

Pacientes com histórico de periodontite generalizada agressiva são mais susceptíveis a mucosite e peri-implantite e também apresentam taxas inferiores de sobrevida do implante e sucesso, quando comparados a pacientes periodontalmente saudáveis (Swierkot et al., 2012).

Casado et al. (2013) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se pacientes com história de periodontite crônica são mais suscetíveis à doença peri-implantar do que aqueles sem história de periodontite crônica. Duzentos e quinze indivíduos em manutenção periodontal, apresentando 754 implantes osseointegrados, foram selecionados para este estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o "status" peri-implantar: grupo controle (pacientes

sem doença peri-implantar; n = 129) e grupo doença peri-implantar (pacientes com doença peri-implantar; n = 86). Todas as regiões peri-implantares foram avaliadas clinicamente, incluindo análises da inflamação da mucosa, edema e mobilidade do implante, além de radiografia periapical para avaliar a presença de perda óssea peri-implantar. De acordo com as características clínicas e radiográficas, os pacientes em grupos de controle e doença peri-implantar foram diagnosticados como tendo periodontite crônica ou não. Houve uma correlação altamente significativa entre a história periodontite crônica e doença peri-implantar ($p < 0,0001$). Os pacientes com periodontite crônica tinham 4 vezes mais chance de desenvolver doença peri-implantar do que pacientes com tecidos periodontais saudáveis. Revelaram, em sua conclusão, que o histórico de periodontite crônica é um fator de alto risco para o desenvolvimento de doença peri-implantar, independentemente do gênero ou da região de colocação do implante .

2.1.3 Aspectos Microbiológicos

Lee et al. (1999) realizaram estudos em humanos analisando fatores como a presença de restaurações com coroas; tipo do implante; tempo de carga no implante; histórico de infecções periodontais e, se as reabilitações eram unitárias ou múltiplas na microbiota peri-implantar. Destacaram-se as colonizações microbianas de *Estreptococos orais, Veillonella parvula, Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum*. As espécies periodontais, *Porphyromonas Gingivalis, Tannerella forsythia, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens e Campylobacter rectus* foram detectados em alguns pacientes. A microbiota em torno de reabilitações com coroas sobre implantes e sobre os dentes eram semelhantes; a colonização por patógenos periodontais foi maior nos indivíduos com doença periodontal anterior; não foram observadas diferenças na microbiota de restaurações simples ou múltiplas. Enquanto a presença de coroas teve apenas um impacto menor sobre a microbiota peri-implantar, mudanças foram observados no tempo em que os implantes estavam em função. Um histórico de periodontite prévio teve um maior impacto sobre a microbiota peri-implantar do que o tempo de carregamento do

implante. A maior influência sobre a microbiota peri-implantar foi, no entanto, sobre a microbiota dos dentes remanescentes. *P. gingivalis* e *T. forsythia* colonizaram a maioria dos implantes, mesmo os que estavam osseointegrados.

Segundo Loo et al. (2000) os *Estreptococos viridans*, que incluem *Streptococcus gordonii*, são bactérias pioneiras orais que iniciam a formação da placa dentária. Estes colonizadores iniciais constituem a maioria das bactérias cultiváveis encontradas na placa dental.

Ao analisar a capacidade de interação da *P. Gingivalis* com bactérias colonizadoras iniciais, médias e tardias do biofilme Periasamy e Kolenbrander (2009) observaram que a *P. gingivalis* não consegue crescer como uma única espécie, porém, possui crescimento mutualista quando emparelhado com dois colonizadores iniciais: *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces oris*.

Algumas espécies bacterianas específicas são de grande importância na etiologia das doenças peri-implantares, tanto na mucosite como na peri-implantite, dentre elas podem ser incluídas *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (Filoche et al., 2010).

Vargas-Reus et al. (2012), verificaram que, em condições normais, a população bacteriana que coloniza os dentes ou implantes saudáveis são semelhantes e são formadas principalmente de cocos Gram-positivos facultativos. Já a microbiota encontrada na periodontite e peri-implantite são semelhantes e predominantemente compostas de microrganismos Gram-negativos e anaeróbios obrigatórios, sugerindo que indivíduos com história de periodontite têm em um risco maior de desenvolver peri-implantite. Espécies mais comumente associadas a esta doença incluem *Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Micromonas micros* e Campylobacter *rectus*. Uma vez instalada uma lesão peri-implantar, microrganismos oportunistas que não estão diretamente relacionados com a doença, como *Staphylococcus* e *Candida spp*, podem também ser frequentemente encontrados.

Al Radha et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de identificar as bactérias associadas a doenças peri-implantar. Para isso, os autores colheram amostras de placa subgengival, juntamente com informações essenciais e índices clínicos de 22 indivíduos que apresentaram sinais de doenças peri-implantar. As bactérias foram detectadas a partir de DNA extraído. No total, cerca de 26 espécies diferentes foram encontradas como componentes de placa peri-implantar, incluindo bactérias não cultiváveis. Com base nos resultados, a espécie *Fusobacterium* e *Prevotella* foram mais prevalentes nos estágios iniciais da doença, enquanto um aumento da diversidade de espécies estava presente durante os estágios mais avançados.

Em 2012, Cortelli et al. em um estudo para testar a hipótese de que há maior frequência bacteriana em locais com peri-implantite/periodontite quando comparado com mucosite/gengivite e sítios com saúde peri-implantar/periodontal, concluíram que a frequência bacteriana aumentou em locais com saúde peri-implantar/periodontal para peri-implantite/periodontite. Não houve aumento quando comparados locais com mucosite/gengivite e peri-implantite/periodontite. A tendência de maior frequência bacteriana foi observada em dentes do que em implantes.

A peri-implantite é uma infecção polimicrobiana anaeróbia. No entanto, em contraste com periodontite, as lesões peri-implantares abrigam bactérias que não fazem parte da microbiota periodontopática típica. Em particular, *Staphylococcus aureus* parece desempenhar um papel predominante para o desenvolvimento da doença. Esta bactéria apresenta uma afinidade elevada para o titânio (Smeets et al., 2014).

Nas primeiras horas da formação do biofilme da cavidade oral ocorre a colonização por microrganismos pioneiros, principalmente representados por espécies de *Streptococcos*, além das *Actinomyces*, *Gemella*, *Neisseria* e *Veillonella*. A seguir, o equilíbrio entre estes colonizadores se altera, e os Streptococcus spp. se multiplicam mais rapidamente, resultando em declínio gradual na proporção de *Actinomyces spp*., mas a diversidade microbiana aumenta, com aumento do número e proporção de organismos dos gêneros *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* (Jakubovics et al., 2016). Isto ocorre, entre outros

fatores, porque os colonizadores iniciais propiciam sítios de coagregação para que os colonizadores tardios possam colonizar. O *Streptococcus gordonii* é um dos colonizadores que iniciam a formação de placas e a capacidade de *P. gingivalis* de reconhecer e interagir especificamente com *S. gordonii* é considerada importante para a colonização por *P. gingivalis* da bolsa periodontal (Periasamy & Kolenbrander, 2009).

Com o objetivo de avaliar a frequência de doenças peri-implantares e fatores associados a sua ocorrência, Gurgel et al. (2016) avaliaram cento e cinquenta e cinco pacientes com implantes dentários em um estudo transversal. Os implantes foram clinicamente e radiograficamente analisados para diagnosticar sua condição peri-implantar. As doenças peri-implantares foram diagnosticadas em 54% dos pacientes, sendo que um índice gengival maior que 10%, pacientes com mais de dois implantes e o uso de medicação estavam associados a maior frequência da doença peri-implantar.

2.1.4 Tratamento e Prognóstico

A condição fundamental para o sucesso no tratamento das peri-implantites é a descontaminação da superfície do implante de bactérias e toxinas. A realização dessa descontaminação, entretanto, tornou-se difícil devido ao aumento da rugosidade da superfície dos implantes como consequência das modificações da superfície para maior qualidade da osseointegração. A presença de fortes ligações proteicas e de amino ácidos dificulta a efetiva descontaminação das superfícies de titânio (Steinemann, 1998).

O debridamento mecânico, quando realizado isoladamente, não é efetivo para supressão da microflora patogênica associada a peri-implantite no tratamento de áreas infectadas, principalmente devido ao desenho dos implantes e suas diferentes superfícies que dificultam a remoção do biofilme microbiano (Charalampakis et al., 2011).

Após o agravamento da condição da mucosite com consequente instalação

da peri-implantite, não existem evidências que sugiram um tipo de tratamento mais eficaz. Estudos que acompanharam pacientes com peri-implantite por mais de um ano, detectaram recidivas após o tratamento em 100% dos casos, sugerindo que os procedimentos devem ser repetidos (Esposito et al., 2012).

Segundo Van Winkelhoff (2012), não há evidências científicas que recomendem o uso de antibióticos, sistêmicos ou em dispositivos de liberação local controlada, para o tratamento da doença peri-implantar, sendo apenas indicado como terapia adjunta ao tratamento clínico de debridamento mecânico e desinfecção química com agentes antimicrobianos, em bolsas peri-implantares de profundidade moderada.

Rams et al. (2014) realizaram uma pesquisa para determinar a ocorrência *in vitro* da resistência à antibióticos de bactérias responsáveis pela peri-implantite, visto que a terapia antimicrobiana é muitas vezes empregada no tratamento de complicações infecciosas em implantes dentários. Uma ou mais bactérias patogênicas, sendo as mais comuns a *Prevotella intermedia* e *nigrescens* ou *Streptococcus constellatus*, eram resistentes à clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou metronidazol em 46,7%, 39,2%, 25% e 21,7% dos indivíduos com peri-implantite, respectivamente. No geral, 71,7% dos 120 sujeitos com peri-implantite exibiram bactérias patogênicas resistentes *in vitro* para um ou mais dos antibióticos testados. Com isso os autores concluíram que pacientes com peri-implantite frequentemente apresentam bactérias patogênicas resistentes *in vitro* para concentrações terapêuticas de clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou metronidazol, o que dificulta ou até mesmo inviabiliza o tratamento desse tipo de doença com apenas antibioticoterapia.

Em revisão de literatura, Mahato et al. (2016) explicam que ainda não há nenhuma recomendação específica para o tratamento da peri-implantite, porém, a terapia cirúrgica em combinação com ressecção ou regeneração óssea mostrou resultados positivos.

Segundo Verdugo et al. (2016) o risco de superinfecções em peri-implantites decorre principalmente pela crescente proliferação de resistência antimicrobiana e pelo uso indiscriminado e empírico de antibióticos que poderão promover agravamento das doenças peri-implantares nos anos seguintes.

Kadkhoda et al. (2016) analisaram o efeito antimicrobiano da clorexidina em cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolados do biofilme subgengival de lesões peri-implantares. Para isso, treze pacientes que necessitavam de tratamento contra a doença peri-implantar foram selecionados e os seus biofilmes subgengivais foram coletados através da inserção de papel estéril em bolsas peri-implantes pelo período de 15 segundos. *A. actinomycetemcomitans* foi isolada do biofilme subgengival e cultivado. A cepa padrão de *A. actinomycetemcomitans* serviu como grupo controle positivo e um disco em branco impregnado com água serviu como controle negativo. Foram cultivados 0,1 mL da suspensão bacteriana em meio de cultura específico e discos em branco foram impregnados com enxaguatório bucal CHX a 0,12%. Discos de controle negativo foram colocados em dois lados da placa de cultura bacteriana. O tamanho da zona de inibição de crescimento foi medido. De acordo com os resultados do ensaio de difusão em disco, o diâmetro médio da zona de inibição do crescimento de *A. actinomycetemcomitans* em torno dos discos impregnados com CHX foi maior em amostras padrão (controlo positivo) como também em biofilmes de *A. actimoycetemcomitans* quando comparado com o controle negativo (disco em branco) ($P < 0,001$). Concluíram que o uso de enxaguatório bucal 0,2% CHX teve efeitos antibacterianos sobre espécies de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de sítios peri-implantite.

Em revisão sistemática da literatura, baseada em duas bases de dados, MEDLINE (Pub Med) e EMBASE, entre os anos de 2011 e 2016 , Suárez-López et al. (2016a) analisaram a eficácia da terapia não-cirúrgica no tratamento de doenças peri-implantares, incluindo lesões de mucosite e peri-implantite. Consideraram estudos em humanos que relataram tratamento não cirúrgico da mucosite peri-implantar e peri-implantite com mais ou pelo menos 10 implantes. Foram identificados vinte artigos; 14 avaliados e incluídos na análise. As investigações incluídas relataram o uso de diferentes métodos de descontaminação de implantes como: técnicas de limpeza realizadas pelo paciente, laser, terapia fotodinâmica, debridamento mecânico supra/sub-mucoso e dispositivos de ar-abrasivo. Os períodos de seguimento variaram de 6 a 60 meses. Os autores concluíram que o tratamento não-cirúrgico da mucosite parece ser efetivo, enquanto esperam-se resultados modestos e não previsíveis para as lesões peri-implantites.

Ramanauskaite et al. (2016), em outra revisão sistemática da literatura, procuraram analisar os tratamentos cirúrgicos não regenerativos para peri-implantite e a possibilidade de determinar uma opção terapêutica previsível para o manejo clínico das lesões peri-implantares. A pesquisa foi realizada no banco de dados MEDLINE e EMBASE de 2005 a 2016. Foram incluídos estudos clínicos em humanos em que relatavam alterações na profundidade de sondagem e/ou sangramento à sondagem e/ou alterações radiológicas do nível ósseo marginal após o tratamento não-cirúrgico da peri-implantite, com acompanhamento de 6 meses ou mais. A primeira pesquisa eletrônica e manual resultou em 765 citações. De 16 artigos em texto completo revisados, 6 foram incluídos nesta revisão. Métodos não-regenerativos cirúrgicos foram eficientes na redução dos parâmetros clínicos. Os valores de sangramento à sondagem e profundidade de sondagem foram significantemente diminuídos após a implantoplastia e a administração sistemática de antibacterianos, mas não após a aplicação local de compostos químicos ou laser de diodo. Da mesma forma, melhora significativa nos parâmetros clínicos e radiográficos foi encontrada após a implantoplastia quando comparada com a cirurgia isoladamente. O tratamento cirúrgico não-regenerativo da peri-implantite mostrou-se efetivo para reduzir a inflamação em tecido mole e diminuir a profundidade de sondagem.

Uma outra revisão sistemática da literatura, sobre o tratamento cirúrgico regenerativo da peri-implantite, foi realizada para determinar uma opção terapêutica e previsível para seu manejo clínico. Nesses estudos clínicos em humanos, alterações na profundidade de sondagem e/ou sangramento à sondagem e/ou alterações radiológicas do nível ósseo marginal com acompanhamento após o tratamento de 12 meses ou mais foram incluídos. A pesquisa inicial obteve 883 citações. Após triagem e determinação de elegibilidade, 18 artigos foram incluídos. Houve alta heterogeneidade entre os estudos quanto à morfologia de defeitos, protocolos cirúrgicos e seleção de biomateriais. Todos os estudos incluídos ressaltaram a melhora das condições clínicas após o tratamento cirúrgico regenerativo da peri-implantite, porém, na literatura, ainda, faltam evidências científicas quanto à superioridade do tratamento cirúrgico regenerativo quando comparado com o não regenerativo. A presença de uma membrana de barreira no procedimento regenerativo não parece ser fundamental para se obter sucesso

clínico da cirurgia (Daugela et al., 2016).

A Academia de Osseointegração dos Paises Bálticos e a Conferência de Consenso da Universidade Lituana de Ciências da Saúde de 2016 publicou um artigo com o objetivo de revisar e atualizar os dados existentes referentes ao tratamento não-cirúrgico, cirúrgico não-regenerativo e cirúrgico regenerativo da peri-implantite. Segundo os autores, o tratamento não cirúrgico parece ser mais efetivo para o tratamento da mucosite peri-implantar do que para a peri-implantite, sendo que a peri-implantite tratada com terapia não-cirúrgica resulta principalmente na diminuição do sangramento na sondagem e profundidade de sondagem (geralmente menos de 1 mm). Os cuidados de higiene pessoal ou o programa de manutenção profissional têm efeito positivo na prevenção da mucosite que se inicia na peri-implantite. Os autores concluíram que procedimentos regenerativos, com a aplicação de materiais de enxerto ósseo em combinação ou não com membranas de barreira parecem dar resultados consistentes na cura de tecidos duros e moles do defeito decorrente da peri-implantite. Não se pode concluir sobre a superioridade entre o tratamento cirúrgico regenerativo ou o não regenerativo, devido à falta de evidência científica na literatura (Suárez-López et al., 2016b).

Outra possibilidade de tratamento das doenças peri-implantares amplamente utilizado e estudado é a terapia a laser. Em uma revisão de literatura realizada por Alshehri (2016), sobre a eficácia da terapia a laser no tratamento da peri-implantite, foram analisados 28 estudos que descreveram o papel dos lasers no tratamento dessa doença. Segundo estes estudos, o laser érbio (alumínio-ítrio-alumínio) pode ser usado para esterilizar superfícies de implante sem danificá-las. Ainda, o laser de dióxido de carbono pode desinfetar superfícies de implantes e melhorar o contato osso-implante em torno de sítios previamente infectados. A terapia fotodinâmica apresenta alta especificidade de alvo e pode destruir patógenos associados à etiologia das doenças peri-implantares podendo reduzir significativamente os níveis de marcadores clínicos de inflamação do tecido peri-implantar (isto é, sangramento após sondagem e perda de inserção clínica), sem comprometer a integridade do implante ou do osso alveolar. Os autores concluíram que a terapia com laser como adjuvante da terapia de debridamento mecânico convencional pode ser utilizada eficazmente para o tratamento das doenças peri-implantares.

2.2 PRATA E NANOTECNOLOGIA

É esperado que a nanotecnologia possibilite novos caminhos para combater e prevenir doenças utilizando recursos da escala atômica dos materiais. Entre os nanomateriais mais promissores com propriedades antibacterianas estão as nanopartículas metálicas, que apresentam melhora na atividade química devido ao aumento de sua superfície e estrutura cristalográfica. O estudo de nanomateriais bactericidas é particularmente oportuna, considerando o recente aumento de novas tipos de bactérias resistentes aos antibióticos mais potentes (Morones et al., 2005).

O tamanho das partículas de prata é um fator que pode influenciar na eficácia de sua atividade antimicrobiana. De acordo com Baker et al. (2005) partículas menores, com uma superfície de contato mais disponível para interação, possui um maior efeito bactericida quando comparado às partículas maiores.

O formato das partículas pode também ter influência da atividade antimicrobiana da prata. Pal et al. (2007) constataram que nanopartículas de prata de formato triangular tiveram uma maior ação biocida contra *E. coli* quando comparado com as de formato esférico. Carlson et al. (2008) avaliaram os efeitos tóxicos em macrófagos, pois são as primeiras células de defesa, e, possuem um importante papel na iniciação do estresse oxidativo. Observou-se que o efeito tóxico, foi causado principalmente pela geração de estresse oxidativo.

O efeito antibacteriano e mecanismo de ação de uma solução de íons de prata gerada eletricamente foram investigadas para cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por Jung et al. (2008) por meio da análise do crescimento, morfologia e ultra-estrutura das células bacterianas após o tratamento com a solução de íons de prata. As bactérias foram expostas à solução durante vários períodos de tempo e o efeito antibacteriano da solução foi testada usando o método de contagem em placa convencional e análise por citometria de fluxo (FC). As reduções de mais de 5 $\log_{10}$ UFC / ml de ambas as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram confirmados após 90 min de tratamento com a solução de íons de prata. Redução significativa de *Staphylococcus* aureus e células de

Escherichia coli também foi observada por análise de FC; no entanto, a taxa de redução determinada por análise de FC foi menor do que a determinada pelo método de contagem em placa convencional. Microscopia eletrônica de transmissão mostraram mudanças consideráveis nas membranas celulares de bactérias após o tratamento de íons de prata, que pode ser a causa ou consequência da morte celular. Em conclusão, os resultados deste estudo sugeriram que os íons de prata podem causar danos nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* resultando em uma eventual morte.

Segundo Rai et al. (2009), a prata tem sido extensivamente estudada e utilizada desde os tempos mais remotos para combater infecções e evitar deteriorações. A ação antibacteriana, antifúngica e antiviral dos íons de prata, compostos de prata e nanopartículas de prata têm sido extensivamente estudadas. A prata é considerada não-tóxico para os seres humanos em concentrações pequenas. É pouco provável que os microrganismos desenvolvam resistência contra a prata, em comparação com os antibióticos, pois esta ataca uma ampla gama de alvos nos micróbios. As nanopartículas de prata, com as suas propriedades químicas e físicas únicas, estão se revelando uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. A vantagem da utilização de nanopartículas de prata para a impregnação em superfícies é que não há libertação contínua de íons de prata e os dispositivos podem ser revestidos por ambos os lados exterior e interior aumentando, portanto, a sua eficácia antimicrobiana.

De acordo com Monteiro et al. (2009), bactérias Gram-negativas e Gram-positivas se diferem entre si devido a espessura da camada de peptideoglicano. As bactérias Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano de 3 a 20 vezes mais espessa do que as Gram negativas. Os íons de prata possuem maior ação em bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas. A razão pela qual as bactérias Gram-positivas geralmente são menos susceptíveis à agentes antibacterianos que contêm íons de prata pode ser devido ao fato de que a camada de peptideoglicano carregada negativamente liga-se a alguns íons de prata. Os autores observaram que existe atração eletrostática entre microrganismos com membrana celular carregada negativamente e microrganismos carregados positivamente, e por isso, a carga positiva do íon Ag+ parece ser crucial para a sua atividade antimicrobiana.

Su et al. (2009) prepararam uma combinação de dióxido de titânio e prata (TiO_2/Ag), em baixa temperatura, utilizando polietilenoglicol (PEG-600) como agente redutor e estabilizador. O tamanho médio das partículas de prata era de 20 nm e a ação antibacteriana foi testada para *Escherichia coli* e *Streptomyces*, atingindo índice de inibição de crescimento de 99,9% para *E. coli*, quando a concentração de TiO_2/Ag em meio aquoso era de 10 ppm, porém, esses valores foram significantemente menores em concentrações reduzidas (1, 4 e 7 ppm); já para *Streptomyces* o índice de redução foi de 97.9% a 10 ppm, mas em concentrações menores a redução não foi significativa.

Já Juan et al. (2010) utilizando o método por silanização prepararam uma superfície de titânio modificada por nanopartículas de prata. A morfologia dessa superfície e de seus componentes químicos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Duas espécies de bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foram utilizados para testar o efeito antibacteriano do Ti-Nag com superfície tratada. A análise revelou que uma pequena quantidade de nanopartículas de prata foi depositado sobre a superfície de titânio e que o diâmetro destas nanopartículas variou de dez a algumas centenas de nanometros. Após uma incubação de 24 horas, 94% dos *Staphylococcus aureus* e mais de 95% de *Escherichia coli* havia sido morta na superfície do titânio modificado por nanopartículas, e o exame de microscopia do teste de eficácia anti-adesiva mostrou que havia menos bactérias associadas à superfície de titânio modificada por nanopartículas do que à superfície de titânio do grupo controle não tratado. Segundo os autores, estes dados sugerem que o titânio modificado com nanopartículas de prata é um material promissor com propriedade antibacteriana, que pode ser usado como um biomaterial em implantes.

Em um novo estudo, Juan et al. (2010) testaram o desempenho biológico do titânio com nanopartículas de prata. No estudo anterior, os autores demonstraram que nanopartículas de prata depositadas em placas de titânio apresentaram atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus e Escherichia coli*. Enquanto a atividade antibacteriana é importante, superfícies de biomateriais devem ser modificados para alcançar compatibilidade celular excelente. Ainda, utilizando ensaio de MTT, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura, foi avaliada a viabilidade celular, a arquitetura do citoesqueleto e fixação das células,

respectivamente, no titânio modificado com nanopartículas de prata. Os resultados demonstraram que o titânio modificado com nanopartículas de prata não apresenta qualquer citotoxicidade para os fibroblastos gengivais humanos.

Em relação aos possíveis efeitos tóxicos da prata, Stander et al. (2011), em estudo in vitro, analisaram a toxicidade em relação aos tamanhos de 40 e 80 nm. Os resultados revelaram diminuição estatisticamente significante do potencial de membrana mitocondrial, despolarização induzida por ADP e índice de controle respiratório, com indicações de que as nanoparticulas de prata podem comprometer o funcionamento de mitocôndrias do fígado de ratos.

Na comparação do efeito de nanopartículas de prata de diferentes tamanhos (20, 80, 113 nm), o tamanho de 20 nm apresentou maior toxicidade em relação à citotoxicidade, inflamação, genotoxicidade e desenvolvimento de toxicidade, porém, os efeitos na atividade metabólica celular e comprometimento da membrana celular foram os mais pronunciados (Park et al., 2011).

Lin et al (2012) relatou os diversos mecanismos de toxicidade de nanopartículas de prata. A depleção de glutationa, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica. A deposição de nanoparticulas de prata na mitocôndria causa produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, o que gera uma quebra na cadeia respiratória mitocondrial. O aumento da óxido redução também pode induzir respostas inflamatórias. A disfunção mitocondrial interrompe a síntese de ATP e induz danos ao DNA, podendo ocorrer apoptose e morte celular programada.

Lanfredi (2012), em análise da atividade antibacteriana de filme nanoestruturado com partículas de prata, aplicado na superfície de componentes protéticos de titânio, com o objetivo de reduzir a adesão de bactérias patogênicas ao tecido peri-implantar, com cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis,* por meio da leitura dos discos em microscópio eletrônico de varredura após imersão dos discos em BHI inoculado verificou que o teste antibacteriano, realizado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, apresentou valor médio de UFC/mL do grupo teste semelhante ao obtido do grupo controle, não havendo diferença estatística ($p<0,01$)

entre eles. Os testes realizados com *Fusobacterium nucleatum e Porphyromonas gingivalis* não apresentaram crescimento bacteriano, na etapa de leitura das placas, para os dois grupos, controle e teste; entretanto, as imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura demonstraram uma notável redução da adesão bacteriana nos discos com filme nanoestruturado com partículas de prata em comparação com as imagens do grupo controle para todas as cepas.

De acordo com Seil e Webster (2012), a necessidade de novos antibióticos vem da elevada incidência de infecção bacteriana e a crescente resistência das bactérias aos antibióticos convencionais. Por isso, novos métodos para reduzir a atividade de bactérias (e as infecções associadas) são extremamente necessários. A nanotecnologia, uso de materiais com dimensões na escala atómica ou molecular, tem se tornado cada vez mais utilizada para aplicações médicas e é de grande interesse como uma abordagem para reduzir a atividade de numerosos microrganismos. Alguns materiais antibacterianos naturais, tais como o zinco e prata, possuem maiores propriedades antibacterianas, quando o tamanho da partícula é reduzido para o regime de nanómetro (devido ao aumento da superfície em relação ao volume de uma dada massa de partículas).

Sivolella et al. (2012) relataram em trabalho, cujo objetivo foi mostrar as propriedades antibacterianas, biocompatibilidade óssea e toxicidade das nanopartículas de prata incorporadas a dispositivos usados para regeneração óssea alveolar e em implantes dentários que a redução da adesão bacteriana é um dos principais interesses na implantodontia e, por isso, nanopartículas (NP) de prata (Ag) são frequentemente estudadas, pois podem inibir a formação de biofilme sobre o implante e evitar os insucessos. Relataram que várias bactérias patogênicas tornaram- se resistentes à antibióticos e, desta maneira, a utilização de NPs de Ag tornou-se de grande interesse na medicina. O mecanismo de como a prata age nos microrganismos ainda é bastante incerto, porém, sabe se que a prata pode interagir com grupos sulfidrila de proteínas e DNA alterando a ligação de hidrogênio, processos respiratórios, desenrolamento do DNA, síntese da parede celular e divisão celular. Pode também causar a morte celular bacteriana devido à desnaturação e oxidação da parede celular. Além disso, as nanopartículas de prata podem criar fendas na parede das bactérias gram-negativas causando uma alteração da permeabilidade da membrana.

Vargas-Reus et al. (2012) avaliaram a atividade de nanopartículas de prata (Ag), óxido cuproso (Cu^2O), óxido cúprico (CuO), óxido de zinco (ZnO), dióxido de titânio (TiO^2), óxido de tungsténio (WO^3), compósitos de Ag com CuO e Ag com ZnO. Os critérios avaliados foram a concentração mínima para haver ação bacteriostática (CIM) e a bactericida (MBC) para cepas de *Prevotella intermedia, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum e Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. A atividade das nanopartículas testadas em ordem decrescente foi Ag> Ag + CuO> Cu2O> CuO> Ag + ZnO> ZnO> TiO2> WO3. Concluíram que superfícies com nanopartículas antimicrobianas revestindo o titânio de implantes dentários e ortopédicos pode determinar um aumento da taxa de sucesso do implante.

Preparos de titânio com uma superfície nanoestruturada de prata por meio do tratamento hidrotérmico com H_2O_2, seguido pela implantação de plasma com íons Ag imersos, foram estudados por Zheng et al. (2012). *Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis e Candida albicans* foram escolhidos para os testes antimicrobianos. Genes relacionados com a estrutura microbiana ou adesão foram examinados. Também, foram avaliados a fixação do osteoblasto, viabilidade e análise quantitativa da expressão gênica osteogênico sobre superfícies de titânio. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) revelou que as nanopartículas de Ag de cerca de 10 nm foram incorporados na superfície nanoestruturada de titânio após a implantação iônica por imersão em plasma. Ensaios mostraram que 93,99% dos *Streptococcus mutans*, 93,57% de *Porphyromonas gingivalis*, e 89,78% de *Candida albicans* foram inativados. A expressão dos genes dos três microrganismos confirmou as atividades antimicrobianas do titânio com superfície nanoestruturada de prata. Além disso, as imagens adesivas e os ensaios de viabilidade indicaram que o titânio com superfície nanoestruturada de prata não prejudicou osteoblastos. Os resultados deste estudo sugeriram que o titânio com superfície nanoestruturada com prata exibe boas propriedades antimicrobianas, reduz a expressão dos genes de microrganismos e possui excelente adesão celular e efeitos osteogênicos.

Rani et al. (2015), em estudo *in vitro,* puderam observar a colonização de bactérias específicas em membranas utilizadas para regeneração tecidual guiada com nanopartículas de prata na sua composição compararam três grupos de membranas: membranas sem partículas de prata (grupo controle), membranas

impregnadas com nanopartículas de prata (grupo teste) e membranas impregnadas com cloridrato de doxiciclina (controle positivo). O estudo analisou a presença dos seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis.* Através da contagem das unidades formadoras de colonia, os autores concluíram que a adição de nanopartículas de prata na membrana de colágeno diminuiu o número de bactérias, podendo ser uma boa alternativa para o controle da infecção associada a esse tipo de membrana.

Para verificar a presença de toxicidade de nanoestruturas associadas à prata aplicadas à superfície de titânio frente a cultura de osteoblastos, visando desenvolver um material biocompatível e promissor pela prevenção da colonização bacteriana dos implantes, Kassab (2015), expos , em um estudo, amostras a culturas de linhagens imortalizadas de osteoblastos e submetidas a ensaios de toxicidade direta (MTT), após 24h, 48h e 72h de incubação, com a finalidade de determinar a taxa de proliferação e a redução da viabilidade celular. Além disso, para verificar adesão e morfologia celular, foi realizada Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV), após 24h de incubação. No ensaio de toxicidade celular MTT, após 48h de incubação, as superfícies nanoestruturadas, nomeadas TiAg, TiAA e SiO_2, comportaram-se de maneira muito similar ao grupo controle de titânio puro (Ti) ($p<0,05$). O grupo SiO_2 registrou maior absorbância em 24h, com diferença relevante em relação a todos os outros grupos (testes e controles). Em MEV foram verificadas uma morfologia celular compatível com viabilidade e presença de adesão dos osteoblastos em todas as superfícies testadas, similar aos grupos controles. Dessa forma, verificou-se que os três filmes nanoestruturados demonstraram biocompatibilidade a osteoblastos.

Em 2016, Farhadian et al. compararam contenções ortodônticas removíveis convencionais com contenções removíveis contendo nanopartículas de prata (na concentração de 500 ppm e cerca de 40nm de tamanho). Coletaram amostras na região palatina da maxila uma semana após a remoção do aparelho ortodôntico fixo (no momento da colocação da contenção) e após sete semanas. Comparando o número de *Streptococcus mutans,* concluíram que a adição de nanopartículas de

prata no acrílico das contenções removíveis mostrou ter uma grande efetividade antimicrobiana contra essa bactéria.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana de três tipos diferentes de revestimentos nanoestruturados com prata aplicados à superfície de discos de titânio frente a cepas de microrganismos peri -implanto-patogênicos. Após determinado o melhor revestimento, foi avaliado se a quantidade de prata (3 ou 6 camadas) interfere na formação de biofilmes monoespécie de *S. gordonii*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Discos de Titânio

Foram confeccionados discos de 5,9 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, com a mesma barra de titânio utilizada para confecção de componentes protéticos fornecidos pela empresa Dabi Atlante®, fabricante dos implantes PROSS®.

Os discos passaram por um polimento industrial com rodas de granulação decrescente realizado em três etapas: roda de feltro com esmeril 220 usando massa marrom para polimento (nicrotex), roda dura ventilada e roda amarela para brilho usando massa pratalux.

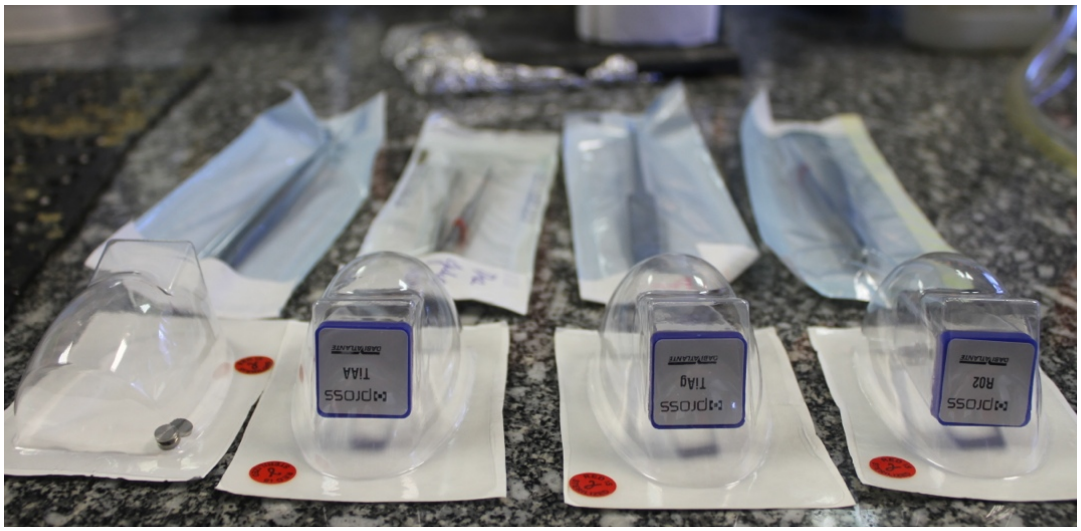
Para a realização do primeiro experimento, os discos de titânio foram divididos em 4 grupos, como mostra a figura 4.1: titânio sem deposição (branco), titânio metálico com deposição de solução coloidais de prata e sílica (Si02), titânio metálico com deposição de solução coloidal hidrotermalizada de prata e dióxido de titânio (TiAg) e titânio metálico com deposição de solução hidrotermalizada somente com dióxido de titânio (TiAa). A tabela 4.1 mostra a composição química das soluções coloidais e concentrações dos materiais em seus respectivos meios.

Para este teste foram utilizados, para cada bactéria testada, 3 discos do grupo controle (Branco) e 3 discos de cada grupo teste, totalizando doze discos de cada grupo bactéria testada, 3 discos do grupo controle (Branco) e 3 discos de cada grupo teste, totalizando doze discos de cada grupo.

Tabela 4.1 - Composição e concentração de Ativo, Prata (Ag) ou Dióxido de Titânio (TiO_2) e o meio/solvente de cada solução utilizada para obtenção dos filmes bactericidas

Solução Coloidal	Sistema (químico)	Concentração do ativo (ppm)	Tamanho médio do ativo	Meio/Solvente
SiO_2	Ag SiO_2	108 ppm (Ag)	200 nm	Água
TiAg	Ag TiO_2	540ppm(TiO_2) 38 ppm(Ag)	1m(TiO_2) 7 nm (Ag)	Etanol
TiAa	TiO_2	81 ppm	1 μm	Metanol e Acetilacetona

Figura 4.1 - Discos esterilizados, com três em cada embalagem



Para o teste antimicrobiano específico do revestimento SiO2, os discos de titânio foram divididas também em 4 grupos: grupo teste com 3 camadas de revestimento SiO2, grupo teste com 6 camadas de revestimento SiO2, controle positivo e controle negativo (discos sem revestimento).

4.1.2 Material de consumo e permanente

4.1.2.1 Material de consumo – biossegurança

Avental descartável, luvas de látex para procedimento, óculos de proteção, papel absorvente, campo cirúrgico para forramento da bancada, gaze estéril, seringas hipodérmicas descartáveis (5 mL), caneta retroprojetora para identificação das cepas e grupos e cronômetro.

4.1.2.2 Material de consumo – Testes Antibacterianos

Infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, MD, USA), extrato de levedura (Difco, Sparks, MD, USA), hemina, menadiona, ágar de soja tripsicaseína (TSA, Difco, Sparks, MD, USA), sangue de cavalo, água destilada, hidrogênio fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), nitrogênio (N_2), gás carbônico (CO_2), placa de *Petri,* cepas de Staphylococcus *aureus* (ATCC 29213), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Porhyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Streptococcus gordonii* (ATCC 33277).

4.1.2.3 Material permanente

Autoclave, tubos de ensaio, eppendorfs, dessecador de vidro tipo *Pyrex*, placas de *Petri*, alça de *Drigalski*, aparelho SCD 050 (Bal-Tec AG, Principality of Liechtenstein) e estufa 002 CB (Fanem).

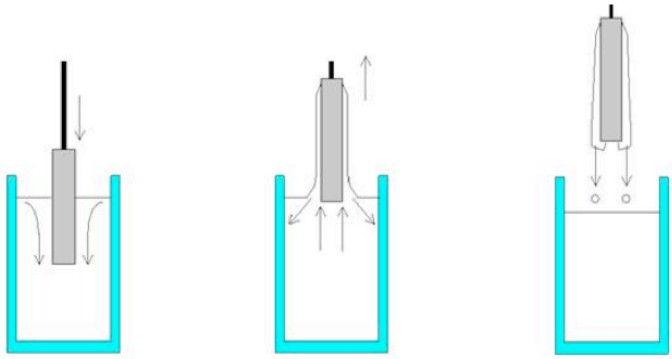
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese do Revestimento Nanoestruturado com Prata

Os aditivos antimicrobianos naturais à base de prata foram produzidos pela empresa Nanox Tecnologia S.A. A síntese de uma suspensão coloidal de sílica com prata foi realizada em um solvente aquoso a partir do método sol-gel.

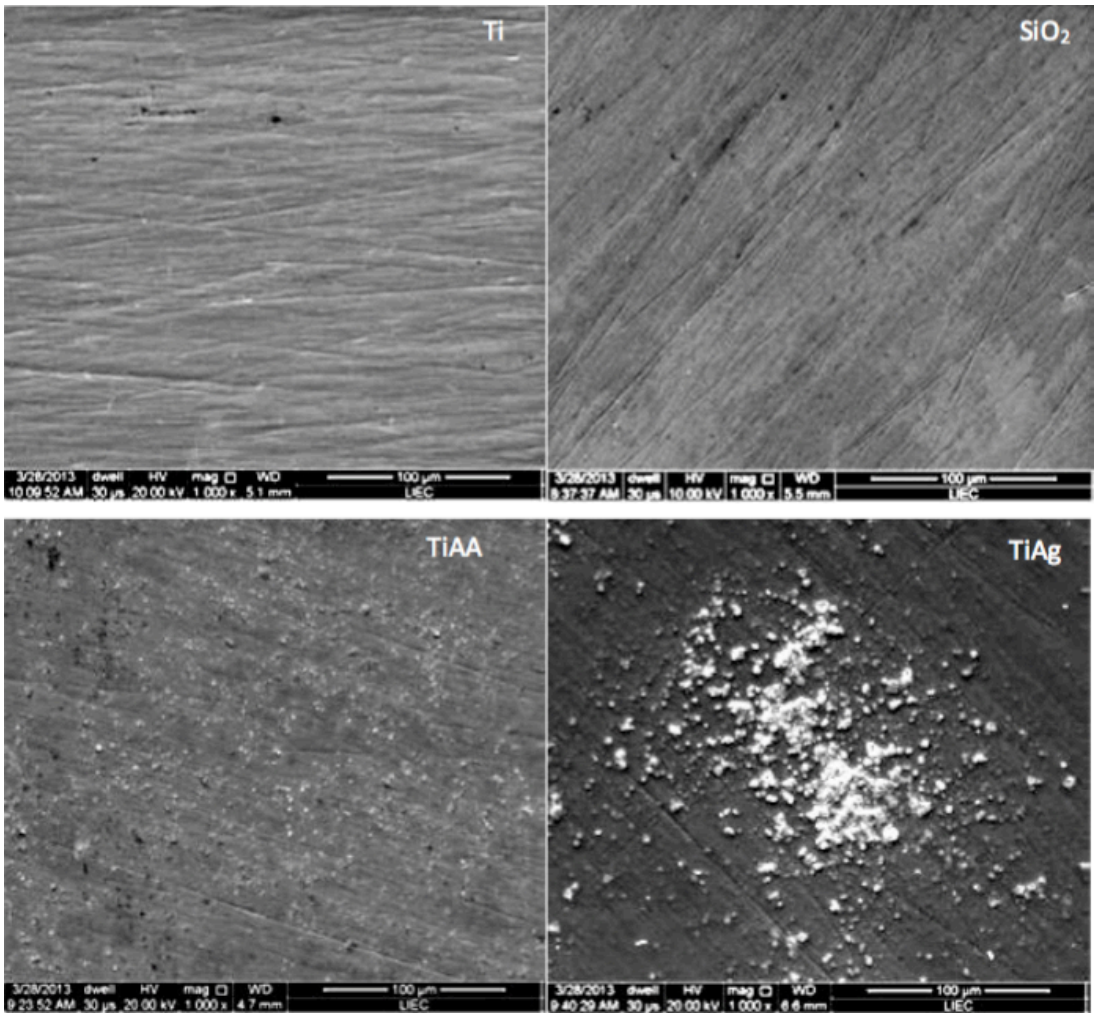
Para obter os revestimentos dos discos foi utilizado o método de dip-coating, como ilustrado na figura 4.2. Depois da deposição da suspensão coloidal, os discos foram tratados em um forno por uma hora em uma temperatura de 120 ° C para evaporar a água e permitir a formação do agente antimicrobiano nas ilhas. A quantidade de prata no filme após este tratamento foi de 0,0059 mg por disco teste, com tamanho médio de partícula de 200 nm.

Figura 4.2 – Esquema de deposição por dip-coating



Cada química utilizada gerou uma estrutura morfológica única para as deposições. Com a finalidade de caracterização microestrutural das superfícies, após a deposição de três camadas em substrato de titânio comercialmente puro, as amostras teste TiAg, TiAA e SiO_2 e o controle Ti foram analisadas por imagem em MEV – Microscópio MEV- FEG-VP Zeiss Supra 35 e DRX (figura 4.3).

Figura 4.3 - Imagem em MEV-FEG das superfícies: Substrato em titânio sem deposição (Ti) e com deposição das soluções coloidais SiO_2, TiAA e TiAg. Aumento original de 1.000X



Para o teste antimicrobiano específico do revestimento SiO2, os discos de titânio receberam 3 e 6 camadas com deposição por dip-coating.

4.2.2 Teste Antibacteriano comparando os revestimentos SiO2, TiAa e TiAg

O teste antimicrobiano inicial foi realizado no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, que cedeu as cepas utilizadas nesta pesquisa. Para o experimento foram utilizadas

cepas de Staphylococcus *aureus* (ATCC 29213), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Porhyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586).

Foram utilizados três discos de cada grupo para cada bactéria, totalizando 12 discos por teste, para que os resultados fossem posteriormente avaliados por métodos estatísticos. Inicialmente, foi realizada a coloração de Gram, para verificação a pureza das cepas.

O experimento foi realizado com uma bactéria por vez. As cepas dos microrganismos anaeróbios foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 5 mL de *Tryptose Soy Broth* (TSB), após a inoculação, os tubos com bactérias foram incubados em dessecadores de vidro *Pyrex* em condições de anaerobiose obtidas pelo sistema mecânico de gases (90% N_2 e 10% CO_2) e mantidos a 37°C, por 3 horas, até atingir a concentração de ≈ 10^8 bactérias/mL. Para confirmar a concentração do meio líquido foi utilizada a escala de *Mc Farland* n° 5 (1,5 x 10^8 cel/mL).

Em seguida, alíquotas de 0,1mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de TSB estéril, juntamente com os respectivos discos, sendo três do grupo controle (branco), três contendo filme SiO2, três com TiAa e três com TiAg (triplicata). Os tubos de bactérias anaeróbias foram incubados em jarras de anaerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Já os tubos com bactérias aeróbias foram incubados em estufa a 37°C pelo mesmo tempo.

Após 48 horas de crescimento bacteriano, o conteúdo de cada tubo foi despejado em uma placa estéril individual para que fosse realizada a lavagem dos discos. Com uma pinça estéril, o disco foi colocado em um tubo de ensaio contendo TSB estéril e colocado por 30 segundos para agitação em vortex. Depois disso, o conteúdo do tubo foi novamente despejado em uma nova placa estéril e o disco colocado em um novo tubo de ensaio com TSB estéril.

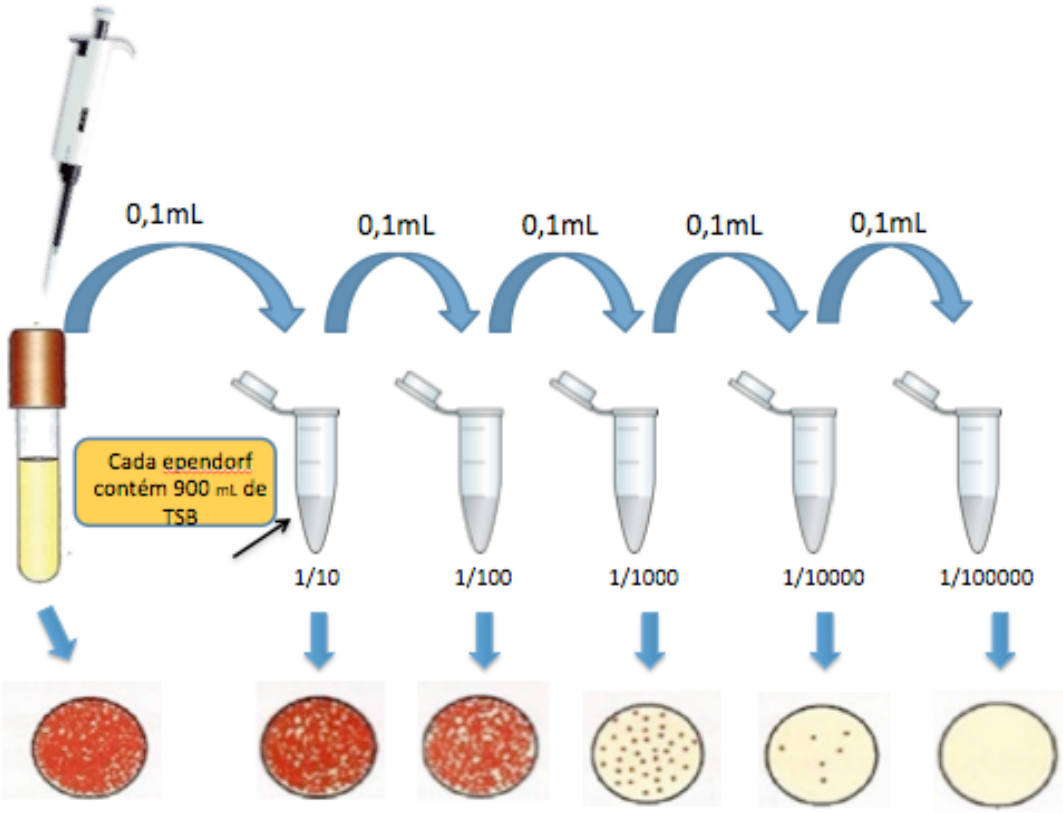
A partir dessa solução foram realizadas diluições seriadas, pré-estabelecidas (10^{-1} a 10^{-10}). Alíquotas de 0,1 mL de cada tubo foram transferidas para placas de *Petri* contendo ágar de soja *tripticaseína* (TSA). Em seguida, com o auxílio de alças

de *Drigalsky* previamente esterilizadas, o material foi espalhado pela superfície dos meios, como ilustrado na figura 4.477608-906-90607-7086-9707070.

As placas inoculadas com microrganismos anaeróbios, então, foram incubadas em dessecadores de vidro *Pyrex*, em condições de anaerobiose a 37°C, durante 48 horas.

Posteriormente foi realizada a contagem do número de colônias formadas na superfície das placas. Por fim, foi realizado o cálculo das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), determinado pela fórmula: **UFC = contagem do n° de colônias x inverso do fator de diluição x 10**.

Figura 4.4 – Teste antimicrobiano



4.2.2.1 Escala de McFarland

A Escala de *McFarland* (figura 4.5) é utilizada para preparos de inóculos para testes de susceptibilidade. A medida padrão de 0,5 na Escala de *McFarland* corresponde a, aproximadamente, $1.5x10^8$ CFU/mL, mas esse valor pode variar dependendo do tamanho dos diferentes microrganismos.

Figura 4.5 – Escala *McFarland*

Os ingredientes que compõem a escala são Cloreto de Bário 1,175% aquoso e Ácido Sulfúrico 1% aquoso e variam de acordo com a tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Preparo da padrão nefelométrico de *McFarland*

N° tubo	1,175%(mL) Cloreto de Bário	1%(mL) Ácido Sulfúrico	Densidade correspondente aproximada de bacteria/mL
01	0,1	9,9	$3x10^8$
02	0,2	9,8	$6\ x10^8$
03	0,3	9,7	$9\ x10^8$
04	0,4	9,6	$1,2\ x10^8$
05	0,5	9,5	$1,5\ x10^8$
06	0,6	9,4	$1,8\ x10^8$
07	0,7	9,3	$2,1\ x10^8$
08	0,8	9,2	$2,4\ x10^8$
09	0,9	9,1	$2,7\ x10^8$
10	1,0	9,0	$3\ x10^8$

4.2.3 Teste Antibacteriano comparando o revestimento SiO2 com 3 e 6 camadas

Este etapa foi realizada nos revestimentos que obtiveram melhores resultados no experimento anterior com o objetivo de verificar se o aumento da concentração de prata influencia nos resultados. O teste antibacteriano foi realizado no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcia Pinto Alves, que cedeu as cepas utilizadas nesta pesquisa. Foram desenvolvidos biofilmes monoespécie

sobre discos de titânio com 3 e 6 camadas de revestimento SiO2, além dos grupos controle positivo (C.positivo) e negativo (C.negativo), utilizando as cepas *Streptococcus gordonii*. A atividade microbiana nos biofilmes foi determinada pelo método de XTT. Foram utilizados três discos de cada grupo por teste (triplicata) e realizada a leitura em espectrofotômetro à 450 nm e 492 nm. Posteriormente, foi determinado o melhor teste estatístico para análise dos resultados.

As cepas de *Streptococcus gordonii* de referência ATCC 33277 (*fimA* I, fimbriada e não encapsulada) foram mantidas em caldo BHI contendo 20% de glicerol em freezer a -80°C.

Cultivou-se, então, amostras de *S. gordonii* em placas de BHI sob atmosfera de aerofilia, obtida em estufa de Co_2 a 10%, à 37ºC, por 48h e então foi feito o repic desta placa, que permaneceu por mais 48 h na estufa de Co_2 a 10%. A seguir, 12 colônias foram raspadas com alça Drigalski estéril e inoculadas em 8ml de caldo BHI suplementado com hemina a 5mg/ml e menadione a 1 mg/ml, sacarose 1% e extrato de levedura a 0,1% (Sigma Aldriech, St Louis, EUA). Após incubação em câmara de anaerobiose por 16 horas, as suspensões bacterianas foram ajustadas à DO 660nm~0,5 por mensuração em espectrofotômetro, que representa uma quantidade de bactérias de 10^8 (previamente mensuradas através da curva de crescimento) e, posteriormente, diluídas 1:20 no mesmo meio de cultura.

Alíquotas de 1,5ml da suspensão da amostra bacteriana ajustada a DO660nm~ 0,5 e diluída 1:20 (correspondente a $5X10^6$ UFC/ml para *S. gordonii*) foram adicionadas a poços de placas de 24 poços, contendo 2 discos de titânio cada poço e incubadas em anaerobiose, a 37°C, durante 48 horas para a formação do biofilme. Após 24 horas, 50% do da cultura planctônica foi removida e acrescido o mesmo volume de meio fresco. Após o período de incubação, com auxilio de pinça estéril, os discos foram removidos e lavados por três vezes, em poço contendo PBS (phosphate buffer saline) para que as células bacterianas não aderidas fossem removidas.

Após a lavagem de todos com PBS, distribuiu-se os discos em 4 grupos:

- grupo teste com 3 camadas de revestimento SiO2 - 3 camadas
- grupo teste com 6 camadas de revestimento SiO2 - 6 camadas
- controle negativo (discos sem revestimento) - C. negativo
- controle positivo (discos sem revestimento que posteriormente entraram em contato com gluconato de clorexidina 0,12%) - C. positivo

Alíquotas de 200 µl de solução de 2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide (XTT) e 16 µL de solução de menadione (1 mM em acetona; Sigma) foram adicionadas a cada poço da microplaca contendo os discos de titânio. As placas foram então incubadas a 37°C por 3 h, longe da luz ambiente, cobertas por papel alumínio. Os discos do grupo controle positivo foram lavados com gluconato de clorexidina 0,12% por 5 minutos antes de entrarem em contato com o XTT.

4.2.3.1 Teste XTT

A redução do XTT é um ensaio colorimétrico de redução do composto XTT que determina a atividade metabólica de bactérias. O sistema de transporte de elétrons na membrana celular das células bacterianas reduz o sal tetrazolio XTT em formazan XTT, resultando em alteração colorimétrica que é mensurada por leitura em espectrofotômetro à 492 nm. Os dados foram comparados entre os discos teste e os discos controle.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE ANTIBACTERIANO COMPARANDO OS REVESTIMENTOS SiO2, TIAa E TIAg

As placas que apresentaram mais de 300 colônias em sua superfície foram consideradas “incontáveis” para determinada diluição. Os valores das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foram obtidos pela fórmula: UFC = contagem do n° de colônias x inverso do fator de diluição x 10.

5.1.1 Valores das unidades formadoras de colônia

As tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 mostram os valores absolutos de UFC/mL obtidos para o grupo branco e os grupos testes nos experimentos com cepas de *Staphylococcus aureus, Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, respectivamente.

Tabela 5.1 - Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *S. aureus*

Diluição / Grupo	s/d	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Branco	Incontável	180×10^{-2}	20×10^{-3}	04×10^{-4}	0	0
TiAa	Incontável	274×10^{-2}	34×10^{-3}	03×10^{-4}	01×10^{-5}	0
TiAg	Incontável	235×10^{-2}	21×10^{-3}	02×10^{-4}	01×10^{-5}	0
SiO2	Incontável	Incontável	49×10^{-3}	06×10^{-4}	01×10^{-5}	0

Tabela 5.2 - Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *P. gingivalis*

Diluição / Grupo	s/d	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Branco	Incontável	Incontável	Incontável	184×10^{-4}	0
TiAa	Incontável	Incontável	03×10^{-3}	0	0
TiAg	Incontável	Incontável	205×10^{-3}	16×10^{-4}	0
SiO2	Incontável	Incontável	97×10^{-3}	09×10^{-4}	0

Tabela 5.3 – Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *A. Actinomycetemcomitans*

Diluição / Grupo	s/d	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Branco	Incontável	Incontável	Incontável	35×10^{-4}	07×10^{-5}	0
TiAa	Incontável	Incontável	142×10^{-3}	11×10^{-4}	01×10^{-5}	0
TiAg	Incontável	Incontável	199×10^{-3}	22×10^{-4}	0	0
SiO2	Incontável	160×10^{-2}	15×10^{-3}	02×10^{-4}	01×10^{-5}	0

Tabela 5.4 - Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para bactéria *F. Nucleatum*

Diluição / Grupo	s/d	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Branco	Incontável	53×10^{-2}	01×10^{-3}	0	0
TiAa	Incontável	5×10^{-2}	0	0	0
TiAg	Incontável	211×10^{-2}	23×10^{-3}	1×10^{-4}	0
SiO2	Incontável	30×10^{-2}	04×10^{-3}	0	0

5.1.1.2 Análise estatística

O intuito desta análise foi verificar em qual das quatro superfícies obteve menor número de bactérias aderidas e se há associação do número de UFC/ml encontrada em diferentes diluições e dos tipos de superfícies avaliadas (branco, TiAa, TiAg e SiO2).

Para as comparações do número médio de unidades formadoras de colônias entre as quatro superfícies, o teste utilizado foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%.

Desta forma, foi considerado haver diferença entre os grupos quando p-valor<0,05. Pelos resultados mostrados nos gráficos 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, pode-se observar que não houve diferença entre as superfícies.

Gráfico 5.1 - Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *A.a.* Valor de p=0,777

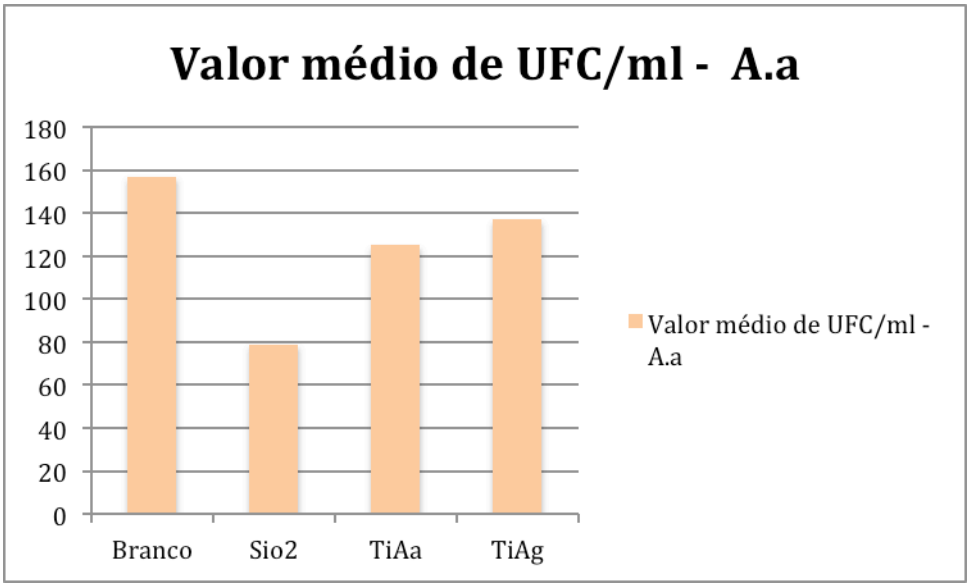
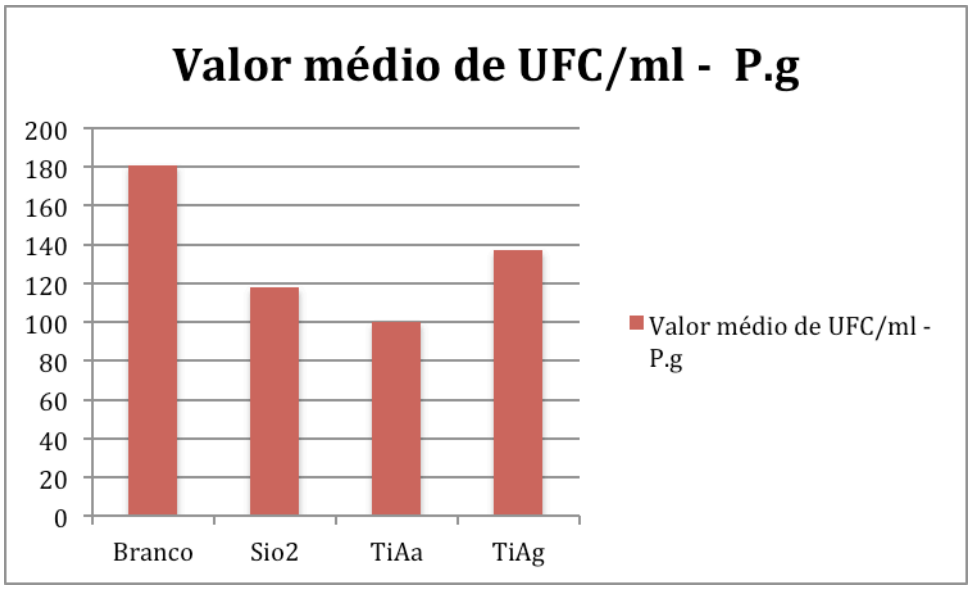


Gráfico 5.2 - Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *P.g.* Valor de p=0,875



Gáfico 5.3 - Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *S.aureus.* Valor de p=0,059

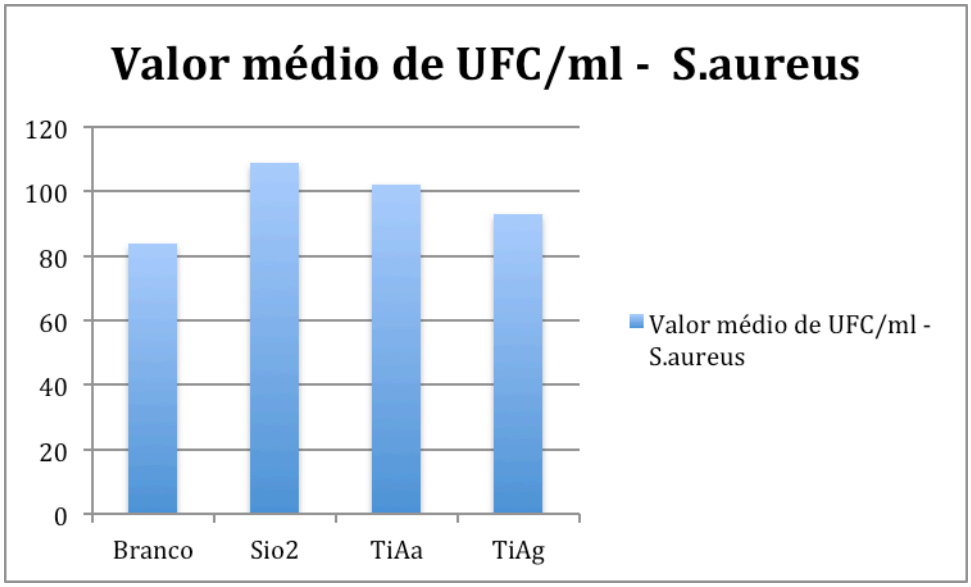
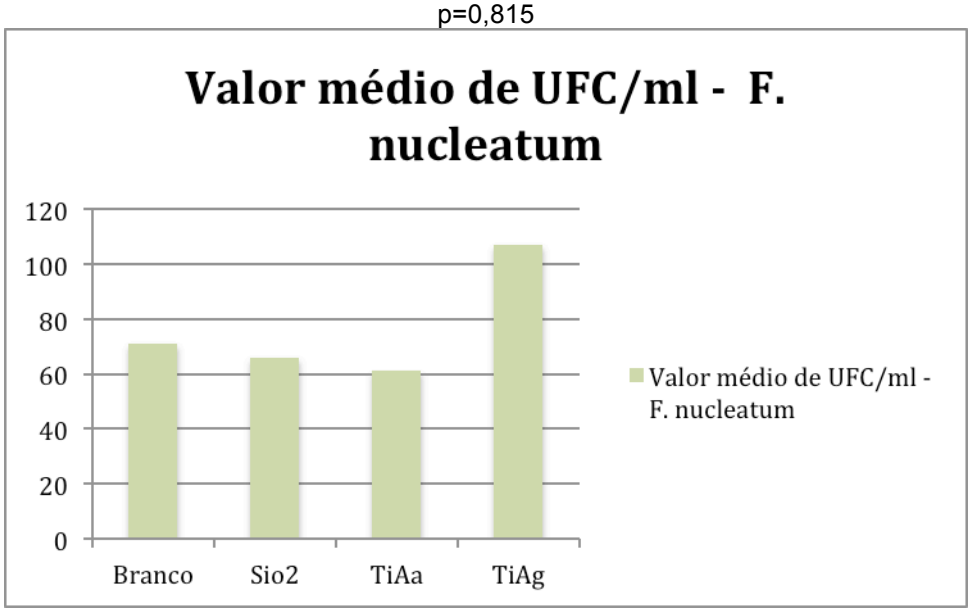


Gráfico 5.4 - Valores médios de UFC/mL, em cada grupo, para bactéria *F. Nucleatum.* Valor de p=0,815



Para as comparações da associação da contagem de bactérias encontradas em diferentes diluições e dos tipos de superfícies avaliadas foi utilizado o teste Qui-Quadrado, considerando um nível de significância de 5%. Nessas comparações, foi possível observar que há um maior percentual de bactérias A.a na diluição 10^{-2} na superfície branca quando comparado com as superfícies nanoestruturadas com prata, como mostrado nas tabelas 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8.

Tabela 5.5 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *A.a*

	Branco		TiAa		TiAg		SiO_2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
sem diluição	300	31,8%	300	39,8%	300	36,5%	300	62,8%
diluição a 10^{-1}	300	31,8%	300	39,8%	300	36,5%	160	33,5%
diluição a 10^{-2}	**300**	**31,8%**	**142**	**18,8%**	**199**	**24,2%**	**15**	**3,1%**
diluição a 10^{-3}	35	3,7%	11	1,5%	22	2,7%	2	0,4%
diluição a 10^{-4}	7	0,7%	1	0,1%	0	0,0%	1	0,2%
diluição a 10^{-5}	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Total	942	100,0%	754	100,0%	821	100,0%	478	100,0%

Valor de $p < 0,001$

Tabela 5.6 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *P.g*

	Branco		Tiaa		TiAg		RO2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
sem diluição	300	27,7%	300	49,8%	300	36,5%	300	42,5%
diluição a 10^{-1}	300	27,7%	300	49,8%	300	36,5%	300	42,5%
diluição a 10^{-2}	300	27,7%	3	0,5%	205	25,0%	97	13,7%
diluição a 10^{-3}	184	17,0%	0	0,0%	16	1,9%	9	1,3%
diluição a 10^{-4}	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
diluição a 10^{-5}	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Total	1084	100,0%	603	100,0%	821	100,0%	706	100,0%

Valor de $p < 0,001$

Tabela 5.7 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *S.aureus*

	Branco		Tiaa		TiAg		RO2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
sem diluição	300	59,5%	300	49,0%	300	53,7%	300	45,7%
diluição a 10^{-1}	180	35,7%	274	44,8%	235	42,0%	300	45,7%
diluição a 10^{-2}	20	4,0%	34	5,6%	21	3,8%	49	7,5%
diluição a 10^{-3}	4	0,8%	3	0,5%	2	0,4%	6	0,9%
diluição a 10^{-4}	0	0,0%	1	0,2%	1	0,2%	1	0,2%
diluição a 10^{-5}	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Total	504	100,0%	612	100,0%	559	100,0%	656	100,0%

Valor de $p < 0,001$

Tabela 5.8 – Análise estatística do UFC/mL, em cada diluição, para cada grupo para bactéria *F. nucleatum*

	Branco		Tiaa		TiAg		RO2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
sem diluição	300	84,7%	300	98,4%	300	56,1%	300	89,8%
diluição a 10^{-1}	53	15,0%	5	1,6%	211	39,4%	30	9,0%
diluição a 10^{-2}	1	0,3%	0	0,0%	23	4,3%	4	1,2%
diluição a 10^{-3}	0	0,0%	0	0,0%	1	0,2%	0	0,0%
diluição a 10^{-4}	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Total	354	100,0%	305	100,0%	535	100,0%	334	100,0%

Valor de $p < 0,001$

5.2 TESTE ANTIBACTERIANO COMPARANDO O REVESTIMENTO SiO2 COM 3 E 6 CAMADAS

Após a leitura em espectrofotômetro à 450nm e 492 nm foram obtidos os seguintes valores mostrados nas tabelas 5.9 e 5.10 para a bactéria *S. gordonii*:

Tabela 5.9 - Valores da leitura com espectrofotômetro à 450nm da bactéria *S.gordonii*

GRUPOS	LEITURA	LEITURA (duplicata)
C. positivo	0,124	0,159
C. negativo	0,273	0,394
3 camadas	0,299	0,236
6 camadas	0,186	0,185

Tabela 5.10 - Valores da leitura com espectrofotômetro à 492nm da bactéria *S.gordonii*

GRUPOS	LEITURA	LEITURA (duplicata)
C. positivo	0,088	0,116
C. negativo	0,258	0,375
3 camadas	0,264	0,221
6 camadas	0,168	0,150

5.2.1 Análise estatística

5.2.1.1 Comparações entre os grupos

Para a análise estatística entre os quatro grupos de interesse (3 camadas, 6 camadas, C. positivo e C.negativo) o teste utilizado foi a Análise de Variância (ANOVA). Para a utilização deste teste foi verificado se as variâncias eram homogêneas entre os grupos (suposição para a utilização). Como não foi verificado homogeneidade das variâncias, foi feito o ajuste através do teste de Brown-Forsythe (BF). Como houve diferença significante entre os grupos, para a identificação de quais grupos apresentam diferenças entre si foram feitas **comparações múltiplas** (comparações entre dois a dois grupos) através do teste de Dunnett.

Para todas as comparações foi considerado um nível de significância de 5%. Desta forma, foi considerado haver diferença entre os grupos quando p-valor<0,05. Para facilitar a interpretação e ilustrar os resultados dos testes que apresentaram diferenças entre os grupos, foram construídos gráficos.

Na tabela 5.11, pode-se observar que houve diferença entre os grupos em relação ao número de bactérias (p<0,05). Com o intuito de identificar quais grupos se diferenciavam entre si, foram realizadas as comparações múltiplas através do

teste de Dunnett. Pelos resultados das comparações múltiplas nota-se que houve diferença do grupo com 3 camadas de revestimento em relação aos grupos com 6 camadas e o controle positivo ($p<0,05$). Houve, também, diferença entre os dois controles ($p<0,05$) evidenciando que o controle negativo apresentou, em média, maior quantidade de bactéria do que o controle positivo.

Além disso, pela análise (tabela 5.12) observa-se que não houve diferença entre o grupo controle positivo (clorexidina) e o grupo com discos revestidos com 6 camadas de SiO_2. Evidenciando que ambos tiveram capacidade de diminuir o número de bactérias na superfície dos discos de titânio.

Tabela 5.11 – Comparações entre os grupos do número de bactérias

	Grupo			
	3 camadas	6 camadas	C.positivo	C.negativo
	média ± DP	média ± DP	média ± DP	média ± DP
medida	0,26 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,33 ± 0,07

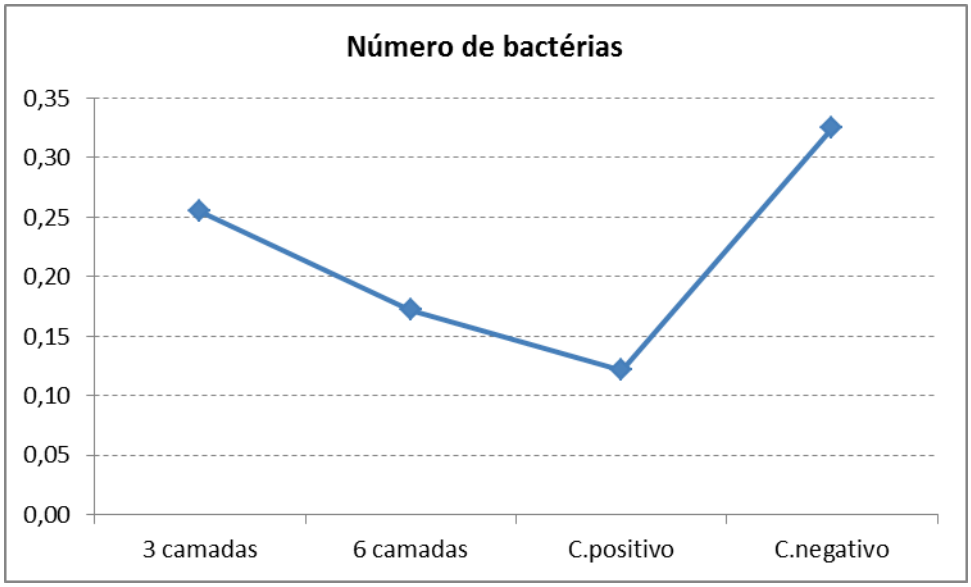
Valor de p = 0,002 (BF)

Tabela 5.12 Comparações múltiplas entre os grupos

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
3 camadas	x	6 camadas	0,044
3 camadas	x	C.positivo	0,006
3 camadas	x	C.negativo	0,472
6 camadas	x	C.positivo	0,135
6 camadas	x	C.negativo	0,071
C.positivo	x	C.negativo	0,024

Pelo gráfico 5.5 é possível observar que, como esperado, o grupo controle negativo obteve maior crescimento bacteriano e o controle positivo o menor. Sendo que o grupo teste com 6 camadas de revestimento se comportou de forma semelhante ao controle positivo.

Gráfico 5.5 Comparações entre os grupos do número de bactérias



5.2.1.2 Comparações entre os grupos e comprimentos de ondas

Na análise a seguir o interesse foi avaliar a diferença no número de bactérias entre os grupos e entre as leituras nos diferentes comprimentos de onda.

Foi, então, comparado o número médio de bactérias entre os grupos (denominado efeito de grupo) e, também, foi comparado o número médio de bactérias entre os diferentes comprimentos de ondas (efeito de onda). Desta forma, o teste estatístico utilizado para realizar as comparações, tanto entre os grupos como entre as ondas foi a Análise de Variância com dois fatores. Os resultados dos testes estão apresentados abaixo, indicando haver diferenças entre os grupos, ou entre as ondas quando $p<0,05$.

Foram verificadas também se houve existência de interação nos resultados, ou seja, comportamentos diferenciados em função de outra variável. Neste estudo não foi verificado efeito de interação ($p>0,05$). A interação poderia indicar que os

grupos se diferenciavam em apenas das ondas e/ou poderia indicar que houve diferenças entre ondas para um determinado grupo.

Para todas as comparações foram, também, considerados um nível de significância de 5%.

Pelos resultados da tabela 5.13, pode-se observar que não houve efeito de interação (p<0,05). Apenas diferença entre os grupos, independente da onda. Sendo assim, foram realizadas as comparações múltiplas entre os diferentes grupos, semelhante à análise anterior.

Tabela 5.13 – Comparações entre os grupos do número de bactérias e leitura em diferentes comprimentos de onda

	Grupo			
	3 camadas	6 camadas	C.positivo	C.negativo
	média ± DP	média ± DP	média ± DP	média ± DP
450 nm	0,27 ± 0,04	0,19 ± 0,001	0,14 ± 0,02	0,33 ± 0,09
492 nm	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,32 ± 0,08

Efeito de interação: p = 0,989

Efeito de grupo: p = 0,001

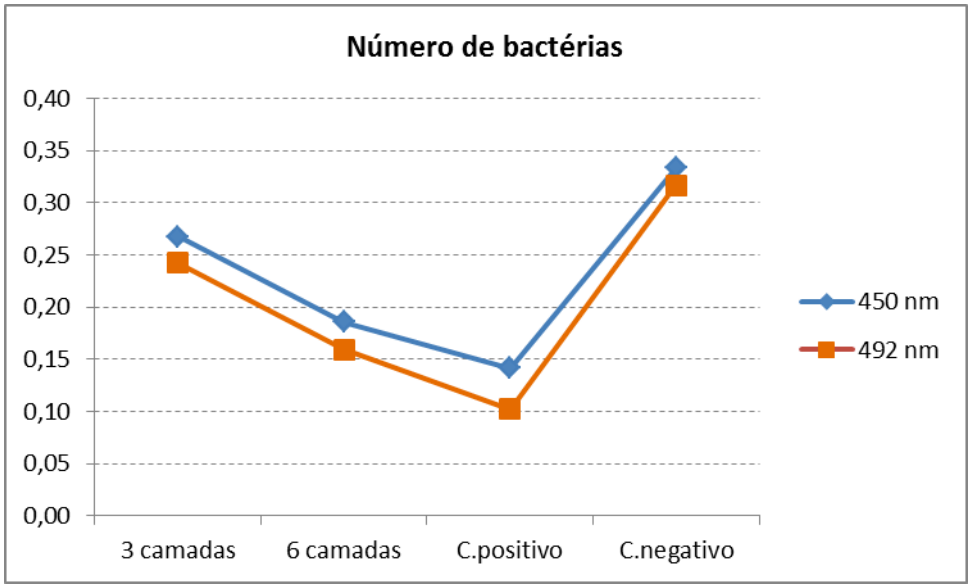
Efeito de onda: p = 0,291

Novamente, com o intuito de identificar quais grupos se diferenciavam entre si, foram realizadas as comparações múltiplas. Pelos resultados das comparações múltiplas da tabela 5.14, nota-se que houve diferença do grupo com 3 camadas em relação aos grupos com 6 camadas e o controle positivo (p<0,05), evidenciando que o grupo com 3 camadas apresentou, em média, maior quantidade de bactéria do que os outros dois grupos. Houve, também, diferença entre o controle negativo em relação aos grupos com 6 camadas e o controle positivo (p<0,05) evidenciando que o controle negativo apresentou, em média, maior quantidade de bactéria do que o controle positivo e o grupo com 6 camadas. Os grupos com 6 camadas e controle positivo (clorexidina), mais uma vez, não se diferenciaram entre si. Ao mesmo tempo, os grupos com 3 camadas e controle negativo também não se diferenciaram entre si (gráfico 5.6).

Tabela 5.14 – Comparações entre os grupos do número de bactérias

Grupo de referência		grupo de comparação	p-valor
3 camadas	x	6 camadas	0,040
3 camadas	x	C.positivo	0,002
3 camadas	x	C.negativo	0,072
6 camadas	x	C.positivo	0,173
6 camadas	x	C.negativo	<0,001
C.positivo	x	C.negativo	0,002

Gráfico 5.6 - Comparações entre os grupos do número de bactérias e leitura em diferentes comprimentos de onda



6 DISCUSSÃO

As doenças peri-implantares são complicações que podem culminar com a perda dos implantes dentais instalados, levando ao fracasso do tratamento proposto ao paciente. O principal fator etiológico das doenças peri-implantares são as bactérias da microbiota oral (Romeo et al., 2004), sendo que as infecções peri-implantares são consideradas uma das principais causas de perda de implantes (Mir-Mari et al., 2012).

O design dos implantes e as diferentes superfícies desenvolvidas atualmente para melhorar a qualidade de osseointegração não permitem a supressão da microflora patogênica a um nível compatível com saúde, apenas com debridamento mecânico, por isso o tratamento das infecções peri-implantares tornou-se um desafio significativo no prognóstico a longo prazo das reabilitações sobre implantes (Charalampakis et al., 2011).

Existe uma grande heterogeneidade de protocolos de tratamento para a peri-implantite. A ausência de padronização entre os estudos dificulta as comparações entre estes e impede a definição de um método que seja mais indicado, inclusive, em relação à antibioticoterapia. Poucos são os estudos que propões tratamentos preventivos às doenças peri-implantares, para impedir que haja a colonização inicial das bactérias relacionadas as doenças peri-implantares.

Estudos estão sendo propostos na área da saúde com a intenção de encontrar um biomaterial com características antibacterianas e biocompatíveis aos tecidos humanos, com o intuito de utilizá-lo na prevenção de infecções (Jung et al., 2008; Rai et al., 2009; Juan et al., 2010). Na área odontológica e, mais especificamente, na Implantodontia, já existem trabalhos científicos relatando a ação antimicrobiana da prata e sua possível utilização como fator de prevenção às doenças peri-implantares (Juan et al., 2010; Vargas – Reus et al., 2012; Sivolella et al., 2012).

Outros metais como o óxido cuproso (Cu^2O), óxido cúprico (CuO), óxido de zinco (ZnO), dióxido de titânio (TiO^2), óxido de tungsténio (WO^3), compósitos de Ag com CuO e Ag com ZnO têm sido testados como agentes antimicrobianos, porém a

prata tem se mostrado o metal mais eficaz em impedir o desenvolvimento de microrganismos (Vargas-Reus et al., 2012).

Revestimentos nanoestruturados são filmes finos, constituídos de camadas de material com espessura abaixo de 1 μm, suportadas por um substrato. Nesta pesquisa, foram confeccionados três filmes nanoestruturados com partículas de prata, que foram dispostas em uma rede de suporte de solução coloidal de sílica, prata e dióxido de titânio e somente dióxido de titânio. Esses revestimentos foram distribuídos homogeneamente em discos de titânio, gerando uma superfície nanométrica, com elevada área superficial.

Apesar do estudo ter sido realizado em discos de titânio, a proposta terapêutica analisará futuramente o revestimento de componentes do sistema de próteses implantares. Esta alternativa terapêutica encontra-se baseada na suposta ação preventiva do agente antimicrobiano, aprisionado nos revestimentos dos componentes protéticos, com ação direta no controle do biofilme próximo aos tecidos de proteção perio-implantares.

O potencial de controlar os biofilmes orais através da utilização de revestimentos nanoestruturados com prata tem recebido muita atenção com o intuito de diminuir as infecções da cavidade oral. A eficácia antibacteriana destas nanoestruturas metálicas tem sido relacionada justamente com o aumento da área superficial, como mostrado neste estudo nas imagens obtidas no MEV. Esta característica permite que as partículas de prata interajam de perto com a superfície bacteriana e seus componentes intracelulares.

Em outros estudos foi possível observar que os autores utilizaram as partículas de prata de tamanho nanométrico, aplicando-as na superfície de titânio (Morones et al., 2005; Juan et al., 2010), o que eleva o custo do material, dificultando seu acesso no mercado. Na presente pesquisa, apesar das partículas de prata não apresentarem tamanho nanométrico, a nanotecnologia foi aplicada ao próprio revestimento, tornando assim o custo do material mais baixo, ainda que possua tecnologia inovadora, por apresentar uma superfície final nanoestruturada, permitindo multiplicar o efeito antimicrobiano, com menor quantidade de prata, exposta em uma superfície de contato amplificada, como mostrado nas imagens do MEV na Figura 4.3 .

Diferente dos produtos que possuem ação antimicrobiana devido à liberação dos íons de prata, os revestimentos utilizados apresentam a prata aprisionada na sua estrutura nanométrica, promovendo melhor fixação e distribuição do material tratado, proporcionando maior segurança e menor toxicidade. Além disso, como não existe a migração do princípio ativo, sua eficiência permanece por mais tempo. Por outro lado, por manter a prata aprisionada, sem liberação, dificulta a interpretação do método utilizado, por não apresentar halo de inibição.

Nos revestimentos utilizados no presente estudo, as partículas de prata ficam ancoradas em suporte de sílica amorfa, não havendo liberação, o que deve diminuir seus efeitos tóxicos. Park et al. demonstraram em 2011, em uma comparação *in vitro,* os efeitos de partículas de prata, em diferentes tamanhos (20, 80, 113 nm), com relação à citotoxicidade, inflamação, genotoxicidade e desenvolvimento de toxicidade. Nanopartículas de prata induziram efeitos tóxicos em todos os parâmetros avaliados, entretanto os efeitos na atividade metabólica celular e dano da membrana celular foram os mais acentuados. As nanopartículas, na escala de 20 nm, apresentaram maiores efeitos tóxicos do que as partículas de 80 e 113 nm. Conclui-se que a capacidade da prata de agir de forma tóxica nas células, varia de acordo com o tamanho da partícula e que a exposição à nanopartículas de prata baseada em concentração em massa não é apropriada. Além desses autores, Carlson et al. (2008) avaliaram os efeitos tóxicos dependentes do tamanho das nanopartículas de prata. Os autores observaram um estresse oxidativo nos macrófagos, que são as primeiras células de defesa.

A proposta deste estudo foi encontrar uma solução preventiva à doença peri-implantar, através do controle do biofilme, para diminuir as bactérias precursoras à mucosite e peri-implantite na superfície do titânio. Para isso, foi testada inicialmente a ação antibacteriana de revestimentos que aliam a nanotecnologia e partículas de prata frente a cepas de Staphylococcus *aureus* (ATCC 29213), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Porhyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) . Posteriormente, foi testada a ação antimicrobiana do melhor revestimento sobre biofilme monoespécie de *S. Gordonii*, já que, segundo Loo et al. (2000) os *Streptococcus gordonii* são bactérias pioneiras orais que iniciam a formação da placa dentária e, sem essas bactérias de colonização inicial, as bactérias do biofilme não conseguem se estruturar.

A efetividade da atividade antimicrobiana dos revestimentos estudados foi avaliada inicialmente através da contagem das colônias bacterianas, encontradas na superfície das placas de ágar sangue.

As espécies *Fusobacterium* e *Prevotella* são mais prevalentes nos estágios iniciais da doença peri-implantar, enquanto um aumento da diversidade de espécies estava presente durante os estágios mais avançados (Al Radha et al., 2012). A espécie *A. actinomycetemcomitans* está diretamente relacionada com o início, a progressão e recorrência da periodontite agressiva localizada, infecção periodontal em que ocorre reabsorção óssea severa e de rápida progressão e também pode estar associada à quadros de peri-implantite (Filoche et al., 2010).

Os resultados obtidos com cepa de *A. actinomycetemcomitans*, apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,01$) entre o grupo controle (branco) e os grupos teste. Foi possível observar que houve um maior percentual de bactérias *A.a* na superfície branca quando comparado com as superfícies nanoestruturadas com prata, sendo que o grupo SiO2 foi o que apresentou melhor resultado. Apesar de não apresentar diferença estatística, pode-se notar através dos resultados que também houve um maior número da bactéria P. *gingivalis* na superfície dos discos brancos quando comparado com os grupos com revestimentos nanoestruturados com prata. Isso confirma a possibilidade de ação antibacteriana do revestimento nanoestruturado com partículas de prata.

Por outro lado, os resultados referentes às bactérias S.*aureus* e F. *nucleatum* , porém, não demonstraram redução do número de microrganismos nos discos com filmes nanoestruturados quando comparados ao disco sem revestimento.

Desta forma, a partir destes resultados, decidimos verificar se o aumento da concentração de prata nos revestimentos, interferiria nos resultados. Assim, após a obtenção de melhores resultados antibacterianos do grupo SiO2, foi realizado um teste para avaliar se a mudança da quantidade de prata no disco de titânio poderia melhorar a capacidade do revestimento em matar bactérias precursoras das doenças peri-implantares. Para isso, foi aplicado na superfície dos discos de titânio 3 e 6 camadas do revestimento SiO2 e avaliada a sua capacidade de impedir o crescimento da bactéria *S. gordonii.*

O *Streptococcus gordonii* é um dos colonizadores que iniciam a formação de placas e a capacidade de *P.gingivalis* de reconhecer e interagir especificamente com *S.gordonii* é considerada importante para a colonização por *P.gingivalis* da bolsa periodontal (Ng et al., 2016).

Os revestimentos nanoestruturados com prata utilizados tem a capacidade de manter os íons aprisionados, sem liberação, o que promove melhor fixação e distribuição do material tratado, porém dificulta a interpretação do método utilizado inicialmente, que foi quantitativo, pois não apresenta halo de inibição. Tendo isto em vista, a nova metodologia adotada para esta etapa do estudo se baseou na avaliação da atividade metabólica das bactérias através do método já consagrado XTT.

Segundo Rai et al. (2009) a prata tem sido extensivamente estudada e utilizada para combater infecções. A ação antibacteriana, antifúngica e antiviral dos íons de prata, compostos de prata e nanopartículas de prata têm sido extensivamente estudadas. As nanopartículas de prata estão se revelando uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. A vantagem da utilização de nanopartículas de prata para a impregnação em superfícies é que não há libertação contínua de íons de prata. Su et al. (2009) demonstraram que em um preparo de TiO_2/Ag, contendo nanopartículas de prata, uma modificação na composição do filme nanoestruturado com relação ao tamanho das partículas de prata e também à sua concentração, pode proporcionar uma ação mais efetiva na diminuição das bactérias. Da mesma forma, o aumento de número de camadas dos revestimentos utilizados neste estudo influenciou positivamente nos resultados do teste antimicrobiano com o biofilme monoespécie de *S. gordonii*.

As bactérias *Streptococcus gordonii* são pioneiras orais que iniciam a formação da placa dentária. Estes colonizadores iniciais constituem a maioria das bactérias cultiváveis encontradas na placa dental (Loo et al., 2000), por isso é de extrema importância estudar seu comportamento e encontrar uma maneira de impedir que haja essa primeira colonização.

Como visto na tabela 5.12, o grupo controle negativo obteve maior crescimento bacteriano e o controle positivo, o menor. Sendo que o grupo teste com 6 camadas de revestimento se comportou de forma semelhante ao controle positivo.

Com base nos números apresentados nessa tabela, pôde-se observar que os discos com 6 camadas de revestimento SiO2 na superfície apresentaram uma grande capacidade antimicrobiana frente ao biofilme monoespécie da bactéria *S. Gordonii*, obtendo, inclusive, um resultado semelhante a clorexidina 0,12% (média dos revestimentos com 6 camadas foi de 0,17 e do controle positivo de 0,12), que é sabidamente um anti-séptico químico, com ação antifúngica e bactericida, capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Segundo Van Winkelhoff (2012), para o tratamento da doença peri-implantar é apenas indicado como terapia adjunta ao tratamento clínico de debridamento mecânico e desinfecção química com agentes antimicrobianos, como a clorexidina, em bolsas peri-implantares de profundidade moderada. Assim como este autor, Kadkhoda et al. (2016) analisaram o efeito antimicrobiano da clorexidina, porém, neste estudo, sobre espécies de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de sítios peri-implantite e concluíram também a eficácia do uso de enxaguatório bucal 0,2% CHX como agente antibacteriano.

Além da capacidade de prevenir a colonização bacteriana, é essencial que esses revestimentos estudados sejam biocompatíveis. Em estudo realizado por Kassab (2015) foi realizado um ensaio de toxicidade celular MTT e as superfícies nanoestruturadas, nomeadas TiAg, TiAA e SiO_2, comportaram-se de maneira muito similar ao grupo controle de titânio puro (Ti) ($p<0,05$), sendo que o grupo SiO_2 registrou maior absorbância em 24h, com diferença relevante em relação a todos os outros grupos (testes e controles). Dessa forma, verificou-se que os três filmes nanoestruturados demonstraram biocompatibilidade a osteoblastos, células essenciais no processo de osseointegração.

Destaca-se que, diferente dos resultados obtidos por Lanfredi em 2012, em que o teste antibacteriano realizado com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentou valor médio de UFC/mL do grupo teste (NT-Ag) semelhante ao obtido do grupo controle (Ti), não havendo diferença estatística entre eles, em nossa pesquisa os revestimentos nanoestruturados com prata utilizados obtiveram sucesso na diminuição do número de microrganismos peri -implanto- patogênicos, sendo que o revestimento SiO2 apresentou efetividade similar a clorexidina 0,12%. na diminuição da quantidade da bactéria *S.gordonii.*

A aplicação de revestimentos nanoestruturados em substrato de titânio com partículas de prata vem confirmando ser uma técnica promissora no desenvolvimento de biomateriais para a implantodontia, por demonstrar excelente desempenho na diminuição do número de microrganismos peri-implato-patogênicos e não apresentar citotoxicidade. Futuramente, em novos estudos com esse tipo de revestimento, podemos avaliar a associação de outros antibacterianos, permitindo contribuir não apenas para o controle da fixação do biofilme e colonização bacteriana, mas também para uma osseointegração mais eficiente.

A procura de soluções dos problemas encontrados nas diversas terapias odontológicas e, neste caso da Implantodontia, gera o conhecimento necessário para reforçar a escolha das condutas clínicas. As doenças peri-implantares apresentam alto índice de prevalência e uma grande dificuldade de resolução. A associação destes fatores indicam que, assim como outras doenças de maior morbidade, a prevenção é o melhor caminho. A utilização de biomateriais, como os implantes dentários, permite almejar melhorias que incluam propriedades terapêuticas amplificadas, diferente dos dentes naturais. Preferencialmente, estes benefícios devem apresentar também baixo custo, baixa toxicidade local, sistêmica e ambiental. O controle do biofilme poderá ser a base para a solução da prosperidade desta alternativa terapêutica.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- Os revestimentos nanoestruturados com partículas de prata foram efetivos na redução de UFC/ml das bactérias *A. actinomycetemcomitans* e P.*gingivalis*, sendo que o melhor resultado foi encontrado com revestimento SiO2.

- Os revestimentos nanoestruturados com partículas de prata não foram eficientes na diminuição das bactérias S. *aureus* e F. *nucleatum*, quando comparados com o disco sem revestimento.

- A concentração da prata interferiu positivamente no desempenho do revestimento SiO2 com maior redução da bactéria *S.gordonii,* obtendo resultados semelhantes a clorexidina 0,12%.

REFERÊNCIAS[1]

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. London: Quintessence.; 1994 p. 365-69.

Al-Radha AS, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. J Dent. 2012 Nov;40(11):989-98. doi: 10.1016/j.jdent.2012.08.006.

Alshehri FA. The role of lasers in the treatment of peri-implant diseases: A review. Saudi Dent J. 2016 Jul;28(3):103-8. doi: 10.1016/j.sdentj.2015.12.005.

Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2005 Feb;5(2):244-9.

Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. J Clin Periodontol. 2002; Suppl 3:197-212; discussion 232-193. doi:019 [pii]

Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:188-202. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01672.

Casado PL, Villas-Boas R, de Mello W, Duarte ME, Granjeiro JM. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? Int J Oral Maxillofac Implants. 2013 Jan-Feb;28(1):35-43. doi: 10.11607/jomi.2867.

Carlson C, Hussain M, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. J Phys Chem B. 2008 Oct 30;112(43):13608-19. Epub 2008 Oct 3.
Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt A, Dahlén G. A follow-up study of peri-implantitis cases after treatment. J Clin Periodontol. 2011 Sep;38(9):864-71. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01759.x.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PR, Araújo VC, Duarte PM. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. Arch Oral Biol. 2013 Jan;58(1):67-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.004.

Daugela P, Cicciù M, Saulacic N. Surgical regenerative treatments for peri-implantitis: meta-analysis of recent findings in a systematic literature review. J Oral Maxillofac Res. 2016 Sep 9;7(3):e15.

Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16:S158-71. doi: 10.1111/jcpe.12334.

Esposito M, Grusovin MG, Worthington HV. Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol. 2012;5 Suppl:S21-41.

Farhadian N, Usefi Mashoof R, Khanizadeh S, Ghaderi E, Farhadian M, Miresmaeili A. Streptococcus mutans counts in patients wearing removable retainers with silver nanoparticles vs those wearing conventional retainers: A randomized clinical trial. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2016 Feb;149(2):155-60. doi: 10.1016/j.ajodo.2015.07.031.

Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res. 2010 Jan;89(1):8-18. doi: 10.1177/0022034509351812.

Gurgel BC, Montenegro SC, Dantas PM, Pascoal AL, Lima KC, Calderon PD. Frequency of peri-implant diseases and associated factors. Clin Oral Implants Res. 2016 Aug 24. doi: 10.1111/clr.12944.

Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):292-304. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01275.x.

Jakubovics NS, Robinson JC, Samarian DS, Kolderman E, Yassin SA, Bettampadi Kadkhoda Z, Amarlu Z, Eshraghi S, Samiei N. Antimicrobial effect of chlorhexidine on Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilms associated with peri-implantitis. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2016;10(3):176-80. doi: 10.15171/joddd.2016.028.

Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. Int J Nanomed. 2010 Apr 15;5:261-7.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Sthaphylococcus aureus and Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2008 Apr;74(7):2171-8. Epub 2008 Feb 1.

Kadkhoda Z, Amarlu Z, Eshraghi S, Samiei N. Antimicrobial effect of chlorhexidine on Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilms associated with peri-implantitis. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2016;10(3):176-80. doi: 10.15171/joddd.2016.028.

Kassab CF. Citocompatibilidade de filmes nanoestruturados associados à prata aplicados sobre titânio: análise em cultura de osteoblastos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.

Lanfredi CB. Análise in vitro da ação antibacteriana de filme nanoestruturado contendo partículas de prata aplicado em superfície de titânio [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Lang NP, Bosshardt DD, Lulic M. Do mucositis lesions around implants differ from gingivitis lesions around teeth? J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:182-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01667.

Lee KH, Maiden MFJ, Tanner ACR, Weber HP. Microbiota of successful osseointegrated dental implants. J Periodontol. 1999 Feb;70(2):131-8.

Lin JJ, Lin WC, Dong RX, Hsu SH. The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. Nanotechnology. 2012 Feb 17;23(6):065102.

Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01283.

Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol. 2000 Mar;182(5):1374-82.

Mahato N, Wu X, Wang L. Management of peri-implantitis: a systematic review, 2010-2015. Springerplus. 2016 Feb 1;5:105. doi: 10.1186/s40064-016-1735-2.

Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castellón E, Gay-Escoda C. Prevalence of peri-implant diseases. A cross-sectional study based on a private practice environment. J Clin Periodontol. 2012 May;39(5):490-4. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01872.

Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:203-13. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01666.

Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. Int J Antimicrob Agents. 2009 Aug;34(2):103-10. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.01.017.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005;16:2346–53.
Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. Microb Pathog. 2016 May;94:60-9.

Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2007 Mar;73(6):1712-20.

Park MV, Neigh AM, Vermeulenb JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials. 2011 Dec;32(36):9810-7. Epub 2011 Sep 25.

Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with Porphyromonas gingivalis and initial, early, and late colonizers of enamel. J Bacteriol. 2009 Nov;191(22):6804-11. doi: 10.1128/JB.01006-09.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2009 Jan-Feb;27(1):76-83. Epub 2008 Sep 30.

Ramanauskaite A, Daugela P, Faria de Almeida R, Saulacic N. Surgical Non-Regenerative Treatments for Peri-Implantitis: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2016 Sep 9;7(3):e14.

Rani S, Chandra RV, Reddy AA, Reddy BH, Nagarajan S, Naveen A. Evaluation of the antibacterial effect of silver nanoparticles on guided tissue regeneration membrane colonization--an in vitro study. J Int Acad Periodontol. 2015 Jul;17(3):66-76.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. Clin Oral Implants Res. 2014 Jan;25(1):82-90. doi: 10.1111/clr.12160.

Romeo E, Ghisolfi M, Carmagnola D. Peri-implant diseases. A systematic review of the literature. Minerva Stomatol. 2004 May;53(5):215-30.

Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. Int J Nanomed. 2012;(7)2767–81.

Sivolella S, Stellini E, Brunello G. Silver nanoparticles in alveolar bone surgery devices. Journal of Nanomaterials, vol. 2012, Article ID 975842, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/975842.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. Head Face Med. 2014 Sep 3;10:34. doi: 10.1186/1746-160X-10-34.

Stander L, Theodore L. Environmental implications of nanotechnology--an update. Int J Environ Res Public Health. 2011 Feb;8(2):470-9. doi: 10.3390/ijerph8020470.

Steinemann SG. Titanium--the material of choice? Periodontol 2000. 1998 Jun;17:7-21. Review.

Su W, Wei SS, Hu SQ, Tang JX. Preparation of TiO(2)/Ag colloids with ultraviolet resistance and antibacterial property using short chain polyethylene glycol. J Hazard Mater. 2009 Dec 30;172(2-3):716-20. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.056.

Suárez-López Del Amo F, Faria E Almeida R, Cicciù M, Daugela P, Ramanauskaite A, Saulacic N, Tervonen T, Wang HL, Yu SH. The 1(st) Baltic Osseointegration Academy and Lithuanian University of Health Sciences Consensus Conference 2016. Summary and Consensus Statements: Group III - Peri-Implantitis Treatment. J Oral Maxillofac Res. 2016a Sep 9;7(3):e16.

Suárez-López Del Amo F, Yu SH, Wang HL. Non-Surgical Therapy for Peri-Implant Diseases: a Systematic Review. J Oral Maxillofac Res. 2016b Sep 9;7(3):e13.

Swierkot K, Lottholz P, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. Mucositis, peri-implantitis, implant success, and survival of implants in patients with treated generalized aggressive periodontitis: 3- to 16-year results of a prospective long-term cohort study. J Periodontol. 2012 Oct;83(10):1213-25.

Vargas-Reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG, Allaker RP. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. Int J Antimicrob Agents. 2012 Aug;40(2):135-9. Epub 2012 Jun 21.

Van Winkelhoff AJ. Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. Eur J Oral Implantol. 2012;5 Suppl:S43-50.

Verdugo F, Laksmana T, Uribarri A. Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis. Arch Oral Biol. 2016 Apr;64:39-50. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.12.007.

Zheng Y, Li J, Liu X, Sun J. Antimicrobial and osteogenic effect of Ag-implanted titanium with a nanostructured surface. Int J Nanomed. 2012;7:875-84. Epub 2012 Feb 21.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. J Clin Periodontol. 2008;35(8 Suppl):286-91. doi:CPE1274 [pii].