# **CAMILA BERNARDELI LANFREDI** Análise in vitro da ação antibacteriana de filme nanoestruturado contendo partículas de prata aplicado em superfície de titânio

São Paulo

2012

#### **CAMILA BERNARDELI LANFREDI**

# Análise *in vitro* da ação antibacteriana de filme nanoestruturado contendo partículas de prata aplicado em superfície de titânio

### Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof.Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo 2012 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 da Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lanfredi, Camila Bernardeli.

Análise *in vitro* da ação antibacteriana de filme nanoestruturado contendo partículas de prata aplicado em superfície de titânio / Camila Bernardeli Lanfredi ; orientador Rodney Garcia Rocha. -- São Paulo, 2012.

75 p.: fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

Implantes dentários - Lesões.
 Doença peri-implantar.
 Nanotecnologia - Odontologia 4. Infecções bacterianas
 Microscopia eletrônica de varredura I. Rocha, Rodney Garcia. II.
 Título.

Lanfredi CB. Análise *in vitro* da ação antibacteriana de filme nanoestruturado contendo partículas de prata aplicado em superfície de titânio. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

### **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a)	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof(a). Dr(a)	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	
Prof(a). Dr(a)	Instituição:	
Julgamento:	Assinatura:	

## À Deus.

por esta encarnação tão bela, repleta de saúde, felicidade, pessoas amadas e por me permitir permanecer sempre forte perante os desafios da vida.

#### Aos meus amados pais Wagner e Eliana,

por serem meus amigos eternos, sempre me apoiando e orientando, por todo amor incondicional e pelos valores éticos e morais que me passaram.

#### À minha amada irmã Fabíola,

por ser minha companheira de todos os momentos, por sempre acreditar em mim e me contagiar com seu amor e entusiasmo por nossa profissão.

#### Ao meu amor Silvio,

por todo seu amor e companheirismo, por sempre me alegrar mesmo nos momentos mais difíceis e por enriquecer meu trabalho com suas produções gráficas.

## Aos meus avós **Domingos**, **Dolores**, **Valdemar** e **Norma**,

por todo carinho e mimo que sempre me deram, por me ensinarem a ser humilde e perseverante e por sempre se orgulharem de mim.

# À minha eternamente amada prima Vanessa,

pelo seu exemplo de garra, força e coragem, por todo seu amor, todas as gargalhadas que demos juntas e por ter me ensinado o verdadeiro valor da vida.

#### Aos meus padrinhos, tios, tias, primos, primas e afilhados,

por serem os amores sempre presentes em minha vida, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

# As minhas amadas amigas Carolina, Fabiana, Maria Fernanda, Thaisa, Renata, Brigitte, Daiana e Ludmila,

por todo o carinho e bons momentos compartilhados na vida profissional e pessoal, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e pela amizade verdadeira.

#### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, por tornar possível a realização de mais esta conquista em minha vida. Por ser um excelente professor e diretor, sempre muito dedicado e competente, conquistando melhorias para nossa faculdade nos trazendo muito orgulho. Por ser sempre gentil e atencioso em todas as ocasiões em que precisei de sua ajuda. Muito obrigada por tudo!

Ao **Prof. Dr. Mario Sérgio Soares**, muito obrigada por esta oportunidade tão rica e engrandecedora, por todos os conhecimentos compartilhados, por ter confiado a mim a execução deste trabalho, pela paciência nos momentos difíceis e por me incentivar a querer sempre mais e melhor.

Ao **Prof. Dr. Mario Julio Avilla-Campos,** por todos os ensinamentos, me incluindo em um pequeno pedaço do maravilhoso mundo da microbiologia, pela confiança em meu trabalho, por me oferecer parte do seu precioso tempo, por todos os conselhos amigos, e acima de tudo, por todo carinho e profissionalismo que me ofereceu durante nossa convivência. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez**, agradeço pela acolhida em seu laboratório, sempre muito gentil e atencioso, muito obrigada por todos os ensinamentos e exemplo de humildade, pelas horas dedicadas a obtenção das eletromicrografias deste trabalho. Muito obrigada!

#### **AGRADECIMENTOS**

À **Profa. Dra. Viviane Nakano,** pelo seu exemplo de mulher forte, competente e profissional, mãe atenciosa e esposa exemplar, por toda a experiência e ensinamentos compartilhados e acima de tudo pela amizade. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Marcelo M. Romano**, por toda ajuda e incentivo desde o início desta pesquisa, por suas observações e correções, pela paciência e amizade. Muito obrigada!

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada, Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, Prof. Dr. Flávio Eduardo Guillin Perez, Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti, Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge, Prof. Dr. José Leonardo Simone, Profa. Dra. Isabel Peixoto, Profa. Dra. Sibele Sarti Penha, Profa. Dra. Inês A. Buscariollo e Profa. Dra. Carina Domaneschi, os quais sempre me orientaram com muito carinho e amizade, cada um de vocês contribuiu de um jeito especial para o meu crescimento e amadurecimento, muito obrigada, por todos os ensinamentos e por terem me recebido junto ao corpo discente deste Departamento.

À minha querida amiga **Roberta Moura Sampaio**, por sua amizade fiel e verdadeira, por sempre me incentivar a ir além, por acreditar em meu potencial, me ajudar e acompanhar desde o início deste mestrado.

À querida **Talita Girio Carnaval**, por seu exemplo de dedicação e competência, pela amizade, por me ajudar na estatística desta dissertação e por sempre me incentivar na vida acadêmica.

Ao amigo **Marco Aurélio Feitosa**, por ter sido mais do que um professor, mas um grande amigo e conselheiro na vida profissional e pessoal, por ter sempre palavras belas, simples e sempre muito acolhedoras, por ter compartilhado esta pesquisa comigo. Muito obrigada!

À querida amiga **Viviane Arenas**, por seu exemplo de bondade, simplicidade e competência. Por ter me ensinado tudo o que foi necessário para a realização desta pesquisa, por me ensinar a amar nossos queridos seres microscópicos e acima de tudo por ter se tornado uma grande amiga. Muito Obrigada!

À amiga **Sheila Belini**, por ter dedicado seu precioso tempo à leitura desta dissertação, por sempre me ajudar e ensinar no tempo em que estivemos juntas no laboratório, pela amizade e carinho. Muito obrigada!

Aos amigos do laboratório de anaeróbios, Aline, Márcia, Gisela, Naiane, Tania, Luis Antonio e Marília, por toda ajuda que sempre me deram com muita paciência, pela amizade e ensinamentos, foi muito bom aprender com todos vocês. Muito Obrigada.

Aos colegas **de pós-graduação e alunos de graduação da Clínica Integrada** que dividiram comigo momentos de ensinamentos e conquistas, permitindo-me ter mais forças para o desenvolvimento desta dissertação.

As secretárias da Pós-graduação **Alessandra Moreira de Lima e Cátia Tiezzi dos Santos**, por toda atenção e auxílio que me deram no decorrer de meu mestrado, sempre com muito carinho e paciência. Muito obrigada.

As secretárias da disciplina de Clínica integrada, **Vilma Vieira, Regina Santos**, por todo apoio, instrução e dedicação, pelo carinho e incentivo. Muito obrigada.

As secretárias da diretoria da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Vera Lucia dos Santos Cordeiro Almeida, Silvana Aparecida de Almeida Elsner e Raquel Mendonça da Silva, por serem sempre muito atenciosas e me auxiliarem.

Aos funcionários da clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de são Paulo, Silvia Regina dos Santos, Adauto Lopes de Menezes e Raquel Ferreira de Oliveira, por todo apoio e incentivo nas atividade clínicas, pela amizade e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado em caráter provisório.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, minha amada escola, onde iniciei meus primeiros passos como cirurgiã-dentista, onde encontrei não apenas sabedoria, mas também grandes mestres e amigos eternos.

"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e acima de tudo, importa o que fazemos de nós" Francisco Cândido Xavier

#### **RESUMO**

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 Versão Corrigida.

Apesar do alto e significativo índice de sucesso dos implantes osseointegráveis, fracassos podem ser acarretados por diversos fatores, tais como falhas cirúrgicas, protéticas, trauma oclusal e por infecções nos tecidos ao redor do implante. As lesões inflamatórias desenvolvidas ao redor de implantes são conhecidas coletivamente como doença peri-implantar, que possui um papel muito importante na falência de implantes, sendo considerada uma das principais causas. O objetivo deste trabalho foi analisar a ação antibacteriana de filme nanoestruturado com partículas de prata aplicado em superfície de titânio de componentes protéticos conectados a implantes, em relação às bactérias predominantes na infecção periimplantar. Para avaliar a ação antibacteriana do filme nanoestruturado com partículas de prata foi realizado teste microbiológico com cepas de Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43719), Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586) e Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277). Discos de titânio sem tratamento formaram o grupo controle (Ti) e discos com filme nanoestruturado com partículas de prata, o grupo teste (NT-Ag). Cada teste foi realizado em triplicata e repetido por três ocasiões separadas. Após 48 horas de incubação dos discos em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), previamente inoculado com as cepas, a 37 °C, em anaerobiose, os discos foram então retirados e colocados em um tubo contendo solução tampão fosfato-salina (PBS) e centrifugados por 1 minuto em aparelho tipo vortex. O PBS foi diluído em série até 1:100.000, distribuído em placas de ágar sangue e essas foram incubadas por 48 horas, a 37°C, em anaerobiose e então foi feita a contagem de colônias sobre as placas para posterior calculo das unidades formadoras de colônia (UFC). A análise da adesão bacteriana foi realizada com cepas de Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43719), Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586) e Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277), através da leitura dos discos em microscópio eletrônico de varredura Leo 43, após imersão dos

discos em BHI inoculado. 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 (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 (Ti) e teste (NT-Ag). As imagens obtidas, através do microscópio eletrônico de varredura (MEV), demonstraram uma notável redução da adesão bacteriana, nos discos com filme nanoestruturado com partículas de prata (NT-Ag), em comparação com as imagens do grupo controle (Ti), para todas as cepas, porém não são conclusivas. O filme nanoestruturado com redução partículas de prata não foi efetivo na da adesão de Α. actinomycetemcomitans.

Palavras-chave: Peri-implantite. Prata. Nanotecnologia. Bactérias Anaeróbias. Microscopia eletrônica de varredura.

#### **ABSTRACT**

Lanfredi CB. Analysis *in vitro* of antibacterial effect of nanostructured film with silver particles applied to titanium surface. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Despite the high and significant success rate of dental implants, failures can be posed by various factors such as surgical and prosthetic failures, oclusal trauma and infections in the tissues around the implant. The inflammatory lesions developed around implants are collectively known as peri-implant disease, which has a very important role in implant failure and is considered one of the main causes. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of nanostructured film with silver particles, applied on abutments connected to implants, in relation to the predominant bacteria in peri-implant infection. To evaluate the antibacterial activity of the nanostructured film, microbiological tests were performed with strains Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43719), Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586) and Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277). Untreated titanium discs were the control group (Ti) and discs with the nanostructured film with silver particles formed the test group (NT-Ag). Each test was run in triplicate and repeated on three separate occasions. After 48 hours of discs incubation in brain heart infusion broth (BHI), previously inoculated with the strains, at 37 °C, under anaerobic conditions, the discs were then removed and placed in a tube containing phosphate buffered saline solution (PBS) and vortexed for 1 minute. The PBS was serially diluted up to 1:100,000, distributed in blood agar plates and incubated for 48 hours, at 37 ° C in anaerobiosis and then colonies were counted for subsequent calculation of colony forming units (CFU). The analysis of bacterial adhesion was performed with strains of Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43719), Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586) and Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277) by reading the discs surface in a scanning electron microscope Leo 43, after immersion of the discs on inoculated BHI. The antibacterial test, performed with Aggregatibacter actinomycetemcomitans, obtained CFU/mL medium value from the test group (NT-Ag) similar to the obtained in the control group (Ti), showing no statistical difference (p <0.01) between them. The tests performed with Fusobacterium nucleatum and

Porphyromonas gingivalis showed no bacterial growth, in plates reading step, for both groups, control (Ti) and test (NT-Ag). The images obtained by scanning electron microscopy showed a remarkable reduction of bacterial adhesion, on discs with nanostructured film with silver particles (NT-Ag), when compared to the images of the control group (Ti), for all strains, but they were not conclusive. The nanostructured film with silver particles was not effective in reducing bacterial adhesion of *A. actinomycetemcomitans*.

Keywords: Peri-implantitis. Silver. Nanotechnology. Anaerobic Bacteria. Scanning electron microcopy.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 4.1 -	Placa de ágar sangue contendo crescimento em colônia de A.actinomycetemcomitans, na diluição de 10 <sup>-3</sup> , do grupo Ti (A) e do grupo NT-Ag (B)
Figura 4.2 -	Metodologia: teste antibacteriano
Figura 4.3 -	Contaminação dos discos com cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>F. nucleatum</i> e <i>P. gingivalis</i> , antes da análise da adesão por imagens do MEV
Figura 4.4 -	P. gingivalis em meio de ágar sangue, após 6 dias de incubação em anaerobiose (A). P. gingivalis, à esquerda e A. actinomycetemcomitans, à direita, inoculadas em meio líquido BHI (B)
Figura 5.1 -	Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h, em meio BHI contendo <i>A. actinomycetemcomitans</i> )
Figura 5.2 -	Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h, em meio BHI contendo <i>F. nucleatum</i> )
Figura 5.3 -	Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h, em meio BHI contendo <i>P. gingivalis</i> )
Figura 5.4 -	Eletromicrografias de NT-Ag, após imersão durante 48h em meio BHI contendo <i>P.gingivalis</i> (A), com regiões heterogêneas do filme

# **LISTA DE TABELAS**

Tabela 5.1-		absolutos			•		
Tabela 5.2-		solutos de UFC las de prata (N					
Tabela 5.3-		média aritmét				•	•
Tabela 5.4-	filme	média aritmét nanoestrutura	ado	com	partío	cuĺas	de
Tabela 5.5-		scritivas e p-va	•			• .	

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C antes de Cristo

ADP adenosina difosfato

ATCC American Type Culture Collection

ATP adenosina trifosfato

BHI Infusão de Cérebro e Coração

CDT Toxina Distensora Citoletal

DNA Ácido Desoxirribonucleico

FDA Food and Drug Administration

GSH glutationa reduzida

HMDS hexametildissilazano

IL interleucina

LPS lipopolissacarídeo

MMP matriz metaloproteinase

PBS Tampão Fosfato-Salino

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PEG polietilenoglicol

pH potencial hidrogeniônico

PMN polimorfonuclear

ppm partes por milhão

ROS espécies reativas de oxigênio

RTX repeat in toxin

Ti titânio

TNF fator de necrose tumoral

TSA ágar de soja tripsicaseína

UFC unidades formadoras de colônia

### **LISTA DE SÍMBOLOS**

% porcentagem

Mm milímetro

nm nanômetro

< menor
N Newton
> maior

μm micrometro
Ag<sup>+</sup> íon de prata

Ag prata

 $Cu_2O$  óxido cuproso CuO óxido cúprico ZnO óxido de zinco

TiO<sub>2</sub> dióxido de titânio

WO<sub>3</sub> óxido de tungstênio

TiO<sub>2</sub>/Ag dióxido de titânio e prata

NP-Ag nanopartícula de prata

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hidrogênio fosfato dissódico

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fosfato diácido de potássio

NaCl cloreto de sódio

N<sub>2</sub> nitrogênio

CO<sub>2</sub> dióxido de carbono

°C graus Celsius

≈ aproximadamente

mL mililitro n° número

cel/mL célula por mililitro

≤ menor ou igual

μl microlitro

g grama

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 MUCOSITE E PERI-IMPLANTITE	23
2.2 MICROBIOTA PERI-IMPLANTAR	26
2.2.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans	28
2.2.2 Fusobacterium nucleatum	30
2.2.3 Porphyromonas gingivalis	31
2.3 PRATA E NANOTECNOLOGIA	33
3 PROPOSIÇÃO	
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAL	40
4.1.1 Discos de Titânio	40
4.1.2 Material de consumo e permanente	40
4.1.2.1 Material de consumo - biossegurança	40
4.1.2.2 Material de consumo – Teste Antibacteriano	41
4.1.2.3 Material de consumo – Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.1.2.4 Material permanente	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Síntese do Filme Nanoestruturado com Partículas de Prata	42
4.2.2 Teste Antibacteriano	42
4.2.3 Análise da Adesão Bacteriana	45
4.2.4 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	47
5.1 TESTE ANTIBACTERIANO	47
5.1.1 A. actinomycetemcomitans	47
5.1.1.1 Valores das unidades formadoras de colônia	47
5.1.1.2 Análise estatística	51
5.1.2 F. nucleatum	52

5.1.3 <i>P. gingivalis</i>	52
5.2 IMAGENS MEV	52
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	71

# 1 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos longitudinais realizados nas últimas décadas e evidências clínicas comprovam o alto índice de sucesso da reabilitação através do uso de implantes osseointegráveis, atingindo índice de sobrevivência de 94,7%, após 10 anos do implante em função (Leonhardt et al., 1993; Jung et al., 2008 a; Simonis et al., 2010).

O sucesso da osseointegração e do tratamento com uso desses dispositivos, acarreta na necessidade de maior ênfase em estudos objetivando a manutenção e longevidade dos implantes. Apesar do índice de sucesso ser significativo, fracassos ainda ocorrem e podem ser acarretados por diversos fatores tais como, falhas cirúrgicas, protéticas, trauma oclusal e por infecções nos tecidos ao redor do implante (Quirynen et al., 2002; Sakka; Coulthard, 2011). Existem ainda condições relacionadas ao paciente que podem prejudicar o processo de cicatrização como o tabagismo, doenças sistêmicas, tratamento quimioterápico e uso de bisfosfonatos, visto que pacientes que fazem uso prolongado desse medicamento devem ser tratados com cautela (Wang et al., 2007; Sakka; Coulthard, 2011).

A contaminação bacteriana do sítio receptor pode ocorrer durante a cirurgia de instalação do implante e também poderá gerar falha ou insucesso no processo de osseointegração. As possíveis vias de contaminação durante a cirurgia são instrumentos cirúrgicos, luvas, ar da sala cirúrgica, ar expirado pelo paciente, saliva e pele peri-oral (Quirynen et al., 2002). A microbiota salivar presente na cavidade bucal, previamente à cirurgia pode ser eliminada em até 95%, através do enxágue pré-operatório com clorexidina 0,12%, durante 1 minuto e a redução microbiana da pele deve ser realizada com solução de clorexidina alcoólica (Quirynen et al., 2002).

O biofilme microbiano bucal está diretamente relacionado com a etiologia das peri-implantites, inicialmente desenvolve-se a mucosite, que é a inflamação da mucosa peri-implantar e sua evolução leva a perda de tecido ósseo ao redor de implantes em função o que é caracterizado como peri-implantite, se não for realizada a eliminação dos fatores etiológicos, ocorre a evolução do processo de reabsorção

óssea, podendo levar a perda do implante (Becker et al., 1990; Lee et al., 1999; Pfau; Avila-Campos, 2005).

Na doença peri-implantar estão envolvidas várias espécies de bactérias gramnegativas e anaeróbias, na maioria das vezes a composição da microbiota é similar
à presente na região subgengival da periodontite crônica (Mombelli; Décaillet, 2011).
As bactérias são o fator causal principal da doença periodontal e contribuem
também para sua evolução. Assim, a redução desses microrganismos é fundamental
para o combate ao quadro infeccioso, no tratamento da mucosite e peri-implantite e
na manutenção do estado de saúde (Mombelli et al., 1987; Apse et al., 1989; Becker
et al., 1990; Mombelli, 2002).

A alta incidência de infecções peri-implantares, evidencia a necessidade por melhorias na manutenção da saúde dos tecidos que circundam o implante. Através da literatura é possível estimar que a frequência de quadros de mucosite e peri-implantite acometendo implantes seja em torno de 64,6% para mucosite e 8,9% para peri-implantite (Ferreira et al., 2006; Simonis et al., 2010).

Com a intenção de alcançar a aceleração e o aprimoramento da osseointegração foram propostas mudanças na superfície dos implantes. Para isso foram desenvolvidos diversos tipos de tratamentos de superfície, o que torna a superfície do implante mais rugosa e porosa (Guéhennec et al., 2007), permitindo maior acúmulo de biofilme e também dificultando sua remoção.

O constante crescimento de resistência bacteriana a vários tipos de antibióticos é uma grande preocupação na área da saúde, pois causa dificuldades na resolução de doenças infecciosas de origem bacteriana. Alternativas viáveis, como o uso da prata, estão sendo pesquisadas, com o objetivo de evitar a resistência aos antibióticos e encontrar novas formulações e materiais que possuam propriedades efetivas na redução bacteriana (Ewald et al., 2006; Chopra, 2007; Akhavan, 2009).

A prata é um material amplamente utilizado na área médica devido a sua comprovada capacidade antimicrobiana e por sua propriedade biocompatível aos tecidos humanos, quando utilizada de forma adequada e com cautela, pois também pode produzir efeitos tóxicos e cumulativos, não apenas ao organismo humano, mas

também ao meio ambiente, dependendo da dosagem e concentração de sua formulação. O uso da prata na escala nanométrica pode proporcionar alguns benefícios, como maior reatividade e durabilidade (Ewald et al., 2006; Chopra, 2007; Akhavan, 2009; Liao et al., 2010; Martinez-Gutierrez et al., 2010; Xing et al., 2010).

A Nanopartícula é constituída por poucos átomos e possuí propriedades diferentes do mesmo material quando em moléculas maiores, o que pode gerar alguns benefícios. Devido a isso está ganhando espaço e atenção em pesquisas na área biológica, médica, farmacêutica e odontológica e já é utilizada como carreadora de agentes terapêuticos, diagnóstico de doenças crônicas, cateteres vasculares e urinários. A nanotecnologia compreende o desenvolvimento tecnológico dentro da escala entre 1 a 100 nm, materiais nessa escala possuem características físico-químicas únicas, como alta proporção de área de superfície para massa e alta reatividade, o que muitas vezes proporciona efeitos maiores e mais duradouros. Os benefícios dessa tecnologia inovadora não se limitam apenas à área da saúde, sendo amplamente explorada também em outras atividades como na indústria alimentícia e têxtil com a função de limitar o crescimento bacteriano (Martinez-Gutierrez et al., 2010).

O filme nanoestruturado com partículas de prata pode ser uma solução preventiva à doença peri-implantar, evitando ou diminuindo a capacidade de adesão de bactérias precursoras à mucosite e peri-implantite, aumentando o índice de sucesso e a longevidade dos implantes osseointegráveis.

#### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 MUCOSITE E PERI-IMPLANTITE

A mucosite é o estágio inicial da doença peri-implantar; pode ser reversível e caracterizada como uma inflamação local da mucosa ao redor do implante, sem apresentar perda óssea. Já a peri-implantite é definida como um processo inflamatório que resulta em perda óssea ao redor de implantes osseointegrados em função (Albrektsson; Isidor, 1994).

O diagnóstico precoce da peri-implantite é de extrema importância, para que se inicie o tratamento antes do aparecimento de danos irreversíveis ou mesmo a perda do implante. Para avaliar o estado de saúde dos tecidos peri-implantares alguns parâmetros são observados tais como: avaliação radiográfica, sondagem peri-implantar, supuração e sinais clínicos da mucosa ao redor do implante (Mombelli; Lang, 1998).

Alternativa recente no exame radiológico é representada pela tomografia computadorizada, oferecendo um resultado mais fiel por apresentar imagem em três dimensões das estruturas ósseas, não ocorre sobreposição de imagens ou distorção e a escala é de um para um. Em estudo experimental realizado em mandíbula de porco, a tomografia *cone beam* foi a ferramenta radiológica que apresentou melhor qualidade de imagem na detecção de defeito peri-implantar previamente preparado, sendo superior à radiografia intraoral, panorâmica e tomografia computadorizada (Mengel et al., 2006).

Outro recurso para investigar possível perda óssea é o exame de sondagem, este não fornece apenas a profundidade do sulco, mas permite também a visualização de outros sinais clínicos da doença como sangramento, exsudação, supuração e distância entre o tecido mole marginal a um ponto de referência no implante, para que se possa definir se está havendo hiperplasia ou recessão tecidual. Outros possíveis sinais de doença podem estar presentes como fístula, recessão gengival, ou hiperplasia gengival (Mombelli; Lang, 1998).

Implantes saudáveis permitem sondagem de aproximadamente três milímetros, quando a profundidade de sondagem não exceder essa profundidade, outros parâmetros devem ser observados como sinais iniciais da doença, tais como, a presença de biofilme e sangramento a sondagem (Mombelli; Lang, 1998; Schou et al., 2002). A sondagem ao redor de implantes deve ser feita sem utilizar força excessiva, o ideal seria uma aplicar força de penetração em torno de 0,2 – 0,3 N, para que danos ao selamento gengival sejam evitados. A cautela durante a sondagem de implantes é importante, pois é mais sensível a variações de força do que quando realizada em dentes naturais. A capacidade de penetração no sulco cresce na medida em que o grau de inflamação ao redor dos implantes aumenta (Schou et al., 2002).

Quando o implante apresenta mobilidade é uma evidência de que existe perda total da osseointegração e o implante deve ser removido. A avaliação da mobilidade não tem, portanto nenhuma função no diagnóstico da doença, pois uma vez observada significa falência do implante. Nem sempre implantes em estágio avançado da doença irão apresentar mobilidade, qualquer contato remanescente direto entre osso-implante pode camuflar perda óssea avançada (Mombelli; Lang, 1998; Heitz-Mayfield, 2008).

A sobrecarga oclusal após a instalação da prótese, que pode ser definida como, uma força funcional que quando ultrapassa a capacidade de resistência da interface osso-implante, pode gerar perda óssea progressiva e levar a perda do implante, quando não ajustada corretamente. (Quirynen et al., 2002). Os componentes protéticos conectados ao implante ficam expostos, localizando-se na maioria das vezes em regiões subgengivais. É importante, portanto, que seja efetuado um rigoroso controle do biofilme, reduzindo os riscos de uma possível perda de suporte ósseo e fibroso devido à infecção.

Testes bioquímicos e bacteriológicos através de cultura, sondas de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e testes de enzimas podem ser utilizados para validar o diagnóstico da peri-implantite, através da análise das bactérias presentes nos sulcos peri-implantares e fluídos orais. A identificação da espécie bacteriana possibilita uma escolha mais precisa do antibiótico a ser utilizado no

tratamento, possibilitando uma ação mais específica deste medicamento (Mombelli; Lang, 1998).

O sulco peri-implantar apresenta características similares ao periodontal, tanto em sua colonização bacteriana quanto ao fluído crevicular (Apse et al., 1989; Lee et al., 1999; Heitz-Mayfield; Lang, 2010), entretanto a mucosa peri-implantar possuí queratina em menor quantidade do que a periodontal, o que a torna mais frágil, sendo assim sulcos peri-implantares apresentam maior profundidade de sondagem (Apse et al., 1989).

A peri-implantite é uma infecção microbiana heterogênea com predominância de bactérias gram-negativas (Kumar et al., 2012). O biofilme consiste em grande parte de microrganismos e proteínas do hospedeiro, que aderem à superfície dental poucos minutos após a profilaxia dentária. Na saúde gengival, organismos grampositivos como *Actinomyces* e estreptococos predominam no biofilme. Nos estágios posteriores de formação da placa, dias a semanas de má higiene oral, ocorre um amadurecimento, resultando em uma mudança para anaeróbios gram-negativos e organismos com motilidade, como *Campylobacter rectus*, alguns dos mais comuns e associados à doença periodontal são *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bem como espécies de treponemas orais (Ezzo; Cutler, 2003).

Em estudo longitudinal foi realizado acompanhamento de 10 a 16 anos, após a instalação de implantes (*plasma-sprayed*, *Straumann*®) em pacientes da Universidade de Strasbourg. Foram encontrados índices de sobrevivência satisfatórios, 89,23% após 10 anos e 82,94% após 16 anos, porém, complicações técnicas e biológicas foram frequentes, 16,94% dos implantes foram afetados por peri-implantite (Simonis et al., 2010).

A prevalência da doença peri-implantar em pacientes brasileiros foi pesquisada através da avaliação da condição dos tecidos ao redor de implantes, em 212 pacientes parcialmente edêntulos, que haviam sido operados por estudantes de pós-graduação de faculdades de odontologia em Belo Horizonte. A prevalência de mucosite e peri-implantite foi de 64,6% e 8,9%, respectivamente (Ferreira et al., 2006).

O índice de prevalência de mucosite e peri-implantite em clínicas privadas é compatível com o encontrado em ambiente universitário. Para determinar a prevalência de doenças peri-implantares, em clínica privada, foi realizada uma pesquisa com pacientes inscritos em um programa de manutenção periodontal, com implantes em função há pelo menos um ano. A prevalência de peri-implantite foi estimada entre 12% e 22% e cerca de 40% dos pacientes tiveram mucosite. (Mir-Mari et al., 2012).

Em estudo clínico retrospectivo, com o objetivo de comparar pacientes periodontalmente comprometidos com pacientes saudáveis, através de acompanhamento por um período mínimo de cinco anos, os implantes, de pacientes comprometidos e com presença de bolsa periodontal residual, apresentaram maior profundidade a sondagem e perda óssea, do que os instalados em pacientes saudáveis e em pacientes comprometidos sem bolsa residual. Portanto, é a manutenção da saúde periodontal que é determinantemente crítica para o aumento do risco de peri-implantite e não apenas a história prévia da doença, destacando a importância da manutenção efetiva e terapia periodontal, principalmente em pacientes com histórico de periodontite (Cho-Yan et al., 2012).

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

#### 2.2 MICROBIOTA PERI-IMPLANTAR

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

Sulcos peri-implantares saudáveis costumam apresentar pouca quantidade de bactéria, o morfotipo predominante são células cocóides e espiroquetas. Bactérias fusiformes e móveis raramente são isoladas. Já em bolsas periodontais com profundidade > 6 mm, sinais de supuração e perda de osso alveolar visível ao redor do implante, geralmente abrigam uma microbiota complexa, com grande proporção de grupos gram-negativos e anaeróbios. Espécies de *Fusobacterium* spp e bactérias produtoras de pigmento negro são encontradas com regularidade (Mombelli et al., 1987).

As espécies bacterianas dominantes em amostras de implantes bem sucedidos em estudo realizado por Lee et al. (1999) foram: *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Veillonella parvula*, *F. nucleatum e P. gingivalis*. Neste estudo foram observadas proporções mais altas de espécies gram-negativas colonizando implantes de pacientes com histórico de doença periodontal, em comparação com pacientes sem história previa da doença.

Em tecidos ao redor de implantes, que apresentam sinais de inflamação, ou quadro instalado de peri-implantite, algumas bactérias podem ser encontradas tais como: *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *Campylobacter rectus* e em bolsas profundas, acima de seis mm, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Becker et al., 1990; Leonhardt et al., 2002; Mombelli, 2002; Quirynen et al., 2002; Pfau; Avila-Campos, 2005). Bactérias periodontais são encontradas com maior frequência em pacientes implantados parcialmente edêntulos do que em pacientes implantados edêntulos (Apse et al., 1989). Além disso, pacientes com histórico de doença periodontal quando comparados com pacientes edêntulos ou periodontalmente saudáveis apresentam alta prevalência de microbiota anaeróbia, três a seis meses após a exposição do implante (Mombelli et al., 1995).

Leonhardt et al. (1999) examinaram a microbiota presente ao redor de implantes saudáveis e em implantes com presença de inflamação gengival e processo de perda óssea além da terceira espira, nesses últimos foram isoladas com frequência as espécies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Socransky et al. (1998) e Socransky e Haffajee (2002) descreveram cinco complexos microbianos, de acordo com sua instalação sequencial no biofilme subgengival. Os complexos: amarelo, azul, verde (*Capnocytophaga ochraceae*, *C. sputigena*, *C. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) e violeta são formados por grupamentos de bactérias que são consideradas colonizadoras iniciais, que fornecem receptores e criam condições ecológicas para a implantação dos microrganismos do complexo laranja (*F. nucleatum*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *C. showae*, *C. gracilis*, *E. nodattum* e *S. constellatus*), relacionados com a patogênese da doença periodontal. O complexo laranja cria condições para a formação do complexo vermelho formado por bactérias aceitas como agentes etiológicos da periodontite crônica e relacionadas com o aumento da profundidade de bolsa e presença de sangramento à sondagem (*T. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. denticola*). *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não foi encontrada agrupada a outras espécies.

#### 2.2.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Aggregatibacter actinomycetemcomitans foi descrita como membro da microbiota oral indígena em humanos, está envolvida na patologia da periodontite e outras infecções extraorais. Seu formato microscópico é de cocobacilo, é uma bactéria de tamanho pequeno, em média 0,4-0,5 μm x 1,0-1,5 μm, não apresenta motilidade e é gram-negativa, capnofílica, não formadora de esporos (Fine et al., 2006; Henderson et al., 2010). *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b é um microrganismo bastante característico da periodontite agressiva localizada e possui uma pequena correlação com a periodontite crônica (Jain; Darveau, 2010).

A espécie *A. actinomycetemcomitans* pode estar associada a doenças bucais e sistêmicas. Dados clínicos e microbiológicos a relacionam com o início, a progressão e recorrência da doença, na periodontite agressiva localizada; dados genéticos e experimentais correlacionam fatores de virulência possuídos por ela, com eventos patogênicos conhecidos, da periodontite agressiva localizada; relatórios indicam organismos do grupo HACEK (*Haemophilus parainfluenzae*,

Haemophilus aphrophilus, A. actinomycetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens e Kingella kingae), gram-negativos de origem primariamente bucal, como causa de endocardite infecciosa (Das et al., 1997; Fine et al., 2006).

A distribuição de sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em categorias de doenças podem ser mais específicos. Cepas sorotipo c são mais comumente encontradas em infecções extra-orais e na saúde periodontal. Além disso, muitas cepas do sorotipo b, como JP-2, produzem quantidades maiores de leucotoxina, um importante fator de virulência, e são encontradas mais frequentemente associadas com a doença periodontal, pricipalmente na periodontite agressiva localizada (Ezzo; Cutler, 2003).

O antígeno imunodominante de *A. actinomycetemcomitans* é um Oligopolissacarídeo, de alto peso molecular e já foram reconhecidos seis sorotipos (a-f), sendo o sorotipo b, mais frequentemente encontrado nas infecções periodontais e endocardite bacteriana em humanos (Henderson et al., 2010).

Muitas das interações entre as bactérias e o hospedeiro fazem parte de seus fatores de virulência, *A. actinomycetemcomitans* expressa a leucotoxina *repeat in toxin* (RTX), e a toxina distensora citoletal (CDT), apresenta também outros fatores como, produção de catalase e proteínas de superfície ligantes ao ferro. Existe uma terceira e potente toxina, que é a citotoxina associada ao gene E (CagE) (Henderson et al., 2010). A leucotoxina RTX é capaz de destruir neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e monócitos humanos, essa ação pode se dar tanto pela ativação de uma nuclease capaz de clivar o DNA das células alvo, quanto produzindo poros na membrana plasmática, o que leva a rápida formação de canais iônicos, aumentando a condução iônica, resultando na despolarização da membrana, perda de potássio intracelular, turgescência e consequentemente a morte celular (Brogan et al., 1994). A proteína distensora citoletal é capaz de promover alteração morfológica nas células hospedeiras e inibir o crescimento das células epiteliais, endoteliais, fibroblásticas e dos linfócitos T e B, levando a um comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro (Belibasakis et al., 2004).

Um importante mecanismo de sobrevivência bacteriano é a adesão, as bactérias desenvolvem uma variedade de adesinas, essas podem proporcionar adesão e consequentemente a invasão das bactérias nas células do hospedeiro e

também podem ser usadas para ligar espécies entre si como também entre espécies diferentes. *A. actinomycetemcomitans* possui fímbrias, possibilitando a aderência não específica e a autoagregação. Outro mecanismo é a aquisição de ferro, *A. actinomycetemcomitans* possui lipopolissacarídeo que se liga a hemoglobina possibilitando a aquisição de ferro, a hemoglobina é utilizada como fonte de ferro, mas para que a bactéria consiga se ligar a ela, é necessária a presença de proteínas de superfície específicas (Henderson et al., 2010).

#### 2.2.2 Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium nucleatum é um dos anaeróbios gram-negativos mais abundantes no biofilme subgengival. Embora seja uma bactéria indígena, é considerado, um patógeno oportunista nas doenças periodontais, uma vez que pode ser isolado a partir de sítios periodontais saudáveis, mas também é encontrada em números crescentes em bolsas periodontais e lesões periapicais (Avila-Campos; Nakano, 2006; Dabija-Wolter et al., 2012).

A espécie *F. nucleatum* não possuí a capacidade de formar esporos e também não apresenta motilidade. É uma bactéria anaeróbia, porém consegue sobreviver na presença de até 6% de oxigênio (Avila-Campos; Nakano, 2006). *F. nucleatum*, faz parte do complexo laranja bacteriano e possuí o papel de fazer ponte entre bactérias indígenas e colonizadores patogênicos (Socransky et al., 1998; Jain; Darveau, 2010).

*F. nucleatum* pode invadir, sobreviver e se multiplicar em células epiteliais e estimular a produção de citocinas variadas, moléculas anti-inflamatórias e matriz metaloproteinases (MMPs), que possuí participação muito importante na destruição periodontal. A metaloproteinase-13 tem uma especificidade de substrato ampla e pode contribuir para a destruição do tecido conjuntivo na periodontite (Dabija-Wolter et al., 2012).

Outro aspecto importante de *F. nucleatum* é o fato de ser uma das primeiras espécies gram-negativas a se estabelecer no biofilme dental, é uma espécie central nas interações físicas entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, que são importantes para a colonização e contribuem para as condições de redução de oxigênio, necessária para o aparecimento de anaeróbios estritos, por essa razão é considerado um colonizador intermediário. Na doença periodontal, pode estar envolvida na patogênese, ativando múltiplos sistemas de sinalização celulares, que estimulam a expressão da colagenase 3 e o aumento da migração e sobrevivência das células epiteliais infectadas (Signat et al., 2011).

#### 2.2.3 Porphyromonas gingivalis

Membros da espécie bacteriana *P. gingivalis*, são cocobacilos, anaeróbios obrigatórios, sem motilidade, assacarolíticos. No crescimento em superfície de ágar sangue, as colônias apresentam coloração branca a creme, dentro de um período de 4-8 dias, essas colônias começam a enegrecer a partir da sua extremidade em direção ao centro (Holt et al., 1999).

P. gingivalis é a espécie mais associada à forma crônica da periodontite e pode ser detectada em até 85% dos sítios com doença. Sua presença em sítios saudáveis é rara e quando encontrada é numericamente baixa, ou seja, sua presença em bolsas periodontais pode ser considerada um alerta para doença preeminente ou em progresso. Essa espécie possui numerosos e potenciais fatores de virulência, tais como, cisteína, proteinases, lipopolissacarídeos (LPS), cápsula e fímbrias. Devido a esses inúmeros fatores, é considerada um patógeno oportunista. (Bostanci; Belibasakis, 2012).

As fímbrias são mediadores de adesão, se ligam a receptores específicos de células hospedeiras, como as epiteliais, podem induzir a penetração bacteriana ativando e mobilizando seu citoesqueleto. Também agem modulando a produção de

citocinas pró-inflamatórias, tais como: as interleucinas (IL), IL-1β, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNFα) (Ezzo; Cutler, 2003).

A cápsula de *P. gingivalis* é um importante fator de virulência anti-fagocitário, bactérias encapsuladas possuem uma menor tendência de serem fagocitadas, isso ocorre devido ao aumento de sua hidrofilicidade e por sua baixa capacidade de ativar a via alternativa do sistema complemento (Holt et al., 1999; Bostanci; Belibasakis, 2012).

O lipopolissacarídeo (LPS) é a principal macromolécula encontrada na superfície externa das bactérias gram-negativas. O envelope, que consiste de duas membranas, uma interna e outra externa e entre elas fica o espaço periplasmático, cada membrana é composta de dupla camada lipídica, formando dois folhetos. Os dois folhetos da membrana interna são compostos de fosfolipídeos. A membrana externa é uma bicamada assimétrica, que é composta de fosfolipídios no folheto interno e de ancoragem dominante de lipopolissacarídeos no folheto externo. LPS é essencial para que a bactéria mantenha a sua integridade estrutural e para o estabelecimento de uma barreira de permeabilidade seletiva, que limita a entrada de moléculas hidrofóbicas e de produtos químicos tóxicos, tais como os detergentes e os antibióticos. O LPS também é necessário para a inserção de muitas proteínas da membrana externa (Jain; Darveau, 2010). O LPS da P. gingivalis é um estimulador de respostas pró-inflamatórias e de reabsorção óssea. São compostos de lipídio A, curto e ligado a um oligossacarídeo central e de antígeno-O, que é um longo polissacarídeo. A P. gingivalis tem a capacidade de sintetizar uma variadas formas estruturais de lípideos-A, em resposta a condições específicas apresentadas pelo ambiente (Jain; Darveau, 2010; Bostanci; Belibasakis, 2012).

As gingipaínas são um grupo de proteases de cisteína, presentes na superfície de *P. gingivalis*, também podem estar presentes na forma de solução secretada. Correspondem por 85% do total da atividade proteolítica de *P. gingivalis*, a principal função dessa proteinase é a aquisição de nutrientes através da degradação de proteínas em peptídeos (Ezzo; Cutler, 2003; Bostanci; Belibasakis, 2012).

#### 2.3 PRATA E NANOTECNOLOGIA

Devido ao surto de doenças infecciosas causadas por diferentes bactérias patogênicas e ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos, a comunidade científica está voltada à procura por novos agentes antibacterianos (Rai et al., 2009). Alguns metais são utilizados como alternativa aos antimicrobianos, através da liberação e dissolução de íons metálicos (Pfau; Avila-Campos, 2005).

Há séculos a prata tem sido usada para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas. Já em 1000 a.C a prata era utilizada para tornar a água potável (Rai et al., 2009). O uso da prata na manutenção de feridas teve início no século XVIII, quando o nitrato de prata era utilizado no tratamento de úlceras. Em 1881, Carl S.F. Crede curou a oftalmia neonatal, pingando gotas de nitrato de prata no olho de neonatos. A atividade antimicrobiana da prata foi primariamente identificada no século XIX e a prata coloidal foi aceita pela *US Food and Drug Administration* (FDA), como sendo efetiva na manutenção de feridas em 1920. Entretanto, após a introdução da penicilina em 1940, os antibióticos tornaram-se o tratamento padrão para infecções bacterianas e a prata praticamente caiu em desuso (Chopra, 2007; Rai et al., 2009).

A prata voltou a ser utilizada como agente terapêutico em 1960, na manutenção de feridas em pacientes queimados, desta vez na forma de solução de nitrato de prata 0,5%, formulada por Moyer (Chopra, 2007; Rai et al., 2009). Em 1968, o nitrato de prata foi combinado com sulfonamida para sintetizar uma formulação em creme, que serve como um agente antibacteriano de largo espectro e foi utilizado para o tratamento de queimaduras, sendo eficaz contra bactérias como a *E. coli, S. aureus, Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. (Rai et al., 2009). Atualmente a prata é muito utilizada na área da saúde, não apenas em feridas como também em cateteres vasculares e urinários, osteomielites crônicas severas e em próteses ortopédicas (Silver et al., 2006).

Na odontologia, íons de prata foram inseridos na composição de resinas compostas (Yoshida et al., 1999) por apresentar redução microbiana. O uso da prata também foi proposto através da incorporação de nanopartículas de prata juntamente

com nanofilamentos de sílica em sistema adesivo para fixação de *brackets* ortodônticos (Ahn et al., 2009). Com o objetivo de prevenir a recontaminação de condutos radiculares, foi realizada a incorporação de nanopartículas de prata em cimento obturador Kerr pulp Canal Sealer<sup>TM</sup> (Kreth et al., 2008).

Zheng et al. (2012) utilizaram implantes com superfície nanoestruturada e aplicaram prata através de tratamento hidrotérmico com peróxido de hidrogênio, seguido de imersão em plasma de prata para implantação dos íons. A ação antimicrobiana foi testada em cepas de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans*. Foram também realizados testes com osteoblastos para verificar o potencial osteogênico do material. Os testes mostraram que 93.99% de *S. mutans*, 93.57% de *P. gingivalis* e 89.78% de *C. albicans* foram eliminados da superfície nanoestruturada com prata. As imagens adesivas e os testes de viabilidade sugerem que a superfície não prejudicou os osteoblastos.

A propriedade antimicrobiana da prata está relacionada com a sua quantidade na superfície e a taxa em que é liberada. Em seu estado metálico é inerte, porém quando exposta à ambiente aquoso ou fluídos, passa a liberar íons de prata (Ag<sup>+</sup>), que são altamente reativos. O nitrato de prata é um sal, que apresenta grande hidrossolubilidade e tem sido muito explorado por seus efeitos antimicrobianos (Liau et al., 1997; Rai et al., 2009).

Apesar de ser bem estabelecido o efeito antimicrobiano dos derivados da prata, o seu mecanismo de ação ainda não é completamente conhecido (Rai et al., 2009; Martinez-Gutierrez et al., 2010).O efeito bactericida de nanopartículas de prata é relacionado com a presença de efeitos eletrônicos (Thiel et al., 2007), quando íons de prata interagem com o grupo tiol, presente em algumas proteínas celulares, ocorre a inativação de enzimas respiratórias vitais da célula bacteriana (Liau et al., 1997; Rai et al., 2009). A prata pode também se ligar a parede e membrana celular bacteriana, inibindo o processo respiratório (Rai et al., 2009). Alguns trabalhos sugerem a formação e deposição de grânulos de sulfeto de prata na parede da célula microbiana, o que pode causar danos estruturais (Feng et al., 2000). Os íons (Ag<sup>+</sup>) de prata podem se difundir pelo fósforo presente nas moléculas do DNA bacteriano, impedindo sua replicação e inativando proteínas (Feng et al., 2000).

Metais pesados são elementos de transição, com preenchimento incompleto das orbitas d, que proporcionam cátions com a habilidade de formar componentes complexos que podem ou não ser oxido redutores ativos. Em altas concentrações íons de metais pesados, como a prata (Ag<sup>+</sup>), formam fortes complexos tóxicos, o que os torna perigosos para funções fisiológicas (Nies, 1999). Outro ponto importante são trabalhos reportando resistência de algumas bactérias a metais pesados como a prata, sendo que os mecanismos mais conhecidos de resistência são a aquisição de plasmídio e mutação genética para diminuir a entrada de Ag<sup>+</sup> ou promover seu efluxo (Chopra, 2007).

São variados os mecanismos de toxicidade de nanopartículas de prata (NP-Ag), como depleção de glutationa (GSH), aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como a peroxidação lipídica. A deposição de NP-Ags na mitocôndria causa produção de ROS 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 (Lin et al., 2012).

Neste estudo *in vitro*, realizado com mitocôndrias do fígado de ratos *Wistar*, foi avaliada a toxicidade de NP-Ags com tamanhos de 40 e 80 nm. Após exposição à prata, ocorreu diminuição estatisticamente significante do potencial de membrana mitocondrial, despolarização induzida por ADP e índice de controle respiratório (RCR). Esses resultados indicam que NP-Ags podem comprometer o funcionamento de mitocôndrias do fígado de ratos (Teodoro et al., 2011).

Foi realizado teste *in vitro*, comparando o efeito de nanopartículas de prata de diferentes tamanhos (20, 80, 113 nm), em relação à citotoxicidade, inflamação, genotoxicidade e desenvolvimento de toxicidade. Houve indução de todos os parâmetros avaliados, porém os efeitos na atividade metabólica celular e comprometimento da membrana celular foram os mais pronunciados. Em todos os aspectos avaliados, as nanopartículas de 20 nm demonstraram ser mais tóxicas do que as maiores (Park et al., 2011).

Zeólito é composto de cristais de alumino-silicatos com elementos da primeira e da segunda família de metais da tabela periódica como, sódio, potássio, magnésio

ou cálcio, nos quais uma porção dos íons sódio é substituída usualmente por íons prata, gerando zeólito de prata (Oliveira; Oliveira, 2004; Rai et al., 2009). O zeólito de prata, quando utilizado contra bactérias anaeróbias, gerou inibição em seu crescimento, demonstrando que esse pode ser um material com possibilidade de ação antibacteriana em regiões que apresentam pouca ou nenhuma taxa de oxigênio, como o sulco peri-implantar (Rai et al., 2009).

Jung et al. (2008b), criaram uma solução de íons de prata gerada eletricamente e testaram a sua atividade antibacteriana. Obtiveram melhores resultados com a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* do que com a gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Imagens realizadas com microscópio eletrônico de transmissão demonstraram alterações consideráveis na membrana celular bacteriana após interação com a solução de íons de prata, o que pode ter sido a causa ou consequência da morte celular.

Os íons de prata possuem maior ação em bactérias gram-negativas do que nas gram-positivas. A camada de peptídeoglicano possui carga negativa e provavelmente liga-se a alguns íons de prata que apresentam carga positiva (Ag<sup>+</sup>), como as bactérias gram-negativas possuem menor número de peptídeoglicano, do que as gram-positivas, as primeiras permitem mais facilmente que o Ag<sup>+</sup> chegue à membrana plasmática (Kawahara et al., 2000).

Necula et al. (2009) sintetizaram uma cobertura feita de compósito poroso contendo óxido de titânio e prata (TiO<sub>2</sub>-Ag) e testaram sua ação antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*, com poros de até 3µm de tamanho. Após 24 horas de incubação em meio de cultura, o compósito TiO<sub>2</sub>-Ag apresentou eliminação completa de *S. aureus*, enquanto que nas amostras do grupo contendo apenas titânio houve um aumento de 1000 vezes no número de bactérias e foi observada também uma oxidação das amostras na ausência das nanopartículas de prata.

A nanotecnologia é uma área em expansão constante e de crescimento rápido na área da ciência, podendo ser utilizada em diversas funções. A palavra nano é usada para indicar um bilionésimo de metro ou 10<sup>-9</sup>. Nanopartículas são aglomerados de átomos com tamanho variando na escala de 1-100 nm (Rai et al., 2009). Uma ampla gama de nanomateriais proporcionam propriedades elétricas, catalíticas, magnéticas, mecânicas, fotônicas e térmicas únicas, o que tem

colaborado muito para o crescimento e desenvolvimento da criação de novas aplicações comerciais (Carlson et al., 2008).

Alguns metais possuem propriedades antibacterianas em sua forma em massa, como a prata, porém outros materiais como, o óxido de ferro não apresentam em sua forma macrométrica, mas podem exibir na nanoparticulada. O mecanismo de ação das nanopartículas contra as bactérias não é totalmente compreendido. Algumas propostas estão relacionadas com a estrutura física das mesmas, como elevada abrasividade, que pode levar à lesão da membrana celular, outra proposta refere-se à liberação aumentada de íons metálicos (Seil; Webster, 2012).

A principal vantagem de um aditivo bactericida de base nanotecnológica é sua elevada área superficial, que permite uma área de contato maior entre o componente ativo do material bactericida e os microrganismos, aumentando seu poder bacteriostático.

Neste estudo, foi avaliado o efeito de nanopartículas de prata com tamanho de 1-100 nm, em bactérias gram-negativas. Os resultados apoiam que a ação bactericida é dependente do tamanho da nanopartícula, sendo que somente as partículas com diâmetros de aproximadamente 1-10 nm, possibilitaram interação direta com as bactérias. Foi possível identificar os mecanismos de ação, que as nanopartículas tiveram nas bactérias, sendo eles, a adesão à membrana celular, gerando alterações funcionais na permeabilidade e na respiração e penetração na célula, causando danos, possivelmente através da interação com componentes como o fósforo, presente no DNA bacteriano (Morones et al., 2005).

Uma combinação de dióxido de titânio e prata (TiO<sub>2</sub>/Ag), foi preparada 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<sub>2</sub>/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, porém em concentrações menores a redução não foi significativa (Su et al., 2009).

Juan et al. (2010) depositaram nanopartículas de prata em superfície de titânio e constataram que essa modificação gerou um material promissor com propriedade antibacteriana, que pode ser utilizado como biomaterial em implantes, umas vez que após 24 horas de exposição à cobertura, 94% de *S. aureus* e mais de 95% de *E. coli* sofreram morte celular. Posteriormente, em outro estudo, esse mesmo material foi testado com cepas de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, ambas apresentaram menor adesão em discos de titânio tratados com nanopartículas de prata do que em discos de titânio lisos. O tratamento com nanopartículas de prata também demonstrou ter citocompatibilidade em testes realizados com fibroblastos coletados de mucosa oral humana (Liao et al., 2010).

A atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (Ag), óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O), óxido cúprico (CuO), óxido de zinco (ZnO), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), óxido de tungstênio (WO<sub>3</sub>), compósito de Ag + CuO e Ag + ZnO, foi testada contra os agentes bacterianos associados a peri-implantite, como *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*, sob condições de anaerobiose. A atividade antibacteriana em ordem descendente foi, Ag > Ag + CuO > Cu<sub>2</sub>O > CuO > Ag + ZnO > ZnO > TiO<sub>2</sub> > WO<sub>3</sub>, sendo que as seis primeiras demonstraram ter propriedades antimicrobianas claras, porém TiO<sub>2</sub> e WO<sub>3</sub>, apresentaram pouca ou nenhuma atividade (Vargas- Reusa et al., 2012).

# 3 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo é avaliar a 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, tais como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Discos de Titânio

Foram confeccionados discos de 7 mm de diâmetro e 1,5 mm de largura, com o mesmo metal utilizado para confecção de componentes protéticos, esses foram fornecidos pela empresa Dabi Atlante<sup>®</sup>, fabricante dos implantes PROSS<sup>®</sup>. Para o teste antimicrobiano foram utilizados 27 discos de titânio polido, sem filme, grupo controle (Ti) e 27 discos com filme nanoestruturado com partículas de prata, grupo teste (NT-Ag). Para a análise da adesão bacteriana, através da visualização em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), foram utilizados 9 discos do grupo controle (Ti) e 9 discos do grupo teste (NT-Ag).

#### 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 – Teste Antibacteriano

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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato diácido de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloreto de sódio (NaCI), nitrogênio (N<sub>2</sub>), gás carbônico (CO<sub>2</sub>), placa de *Petri*, cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

### 4.1.2.3 Material de consumo – Microscopia eletrônica de varredura

Glutaraldeído 0,1%, formaldeído 4% de pH 7,4, cacodilato de sódio, tetróxido de ósmio 1%, etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), hexametildissilazano (HMDS), ouro e cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

## 4.1.2.4 Material permanente

Autoclave, tubos de ensaio, dessecador de vidro tipo *Pyrex*, placas de *Petri*, alça de *Drigalski*, aparelho SCD 050 (Bal-Tec AG, Principality of Liechtenstein), microscópio eletrônico de varredura (Leo 430, Cambridge, UK), estufa 002 CB (Fanem).

## 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Síntese do Filme Nanoestruturado com Partículas de Prata

O aditivo antimicrobiano natural à base de prata foi produzido pela empresa Nanox Tecnologia S.A, utilizando um filme nanoestruturado com partículas de prata pelo método de reação química em solução, reduzindo a prata a um colóide que foi ancorado em sílica, pelo método de impregnação de metal sobre suporte. As partículas de prata foram dispostas em uma rede de suporte de sílica amorfa homogeneamente distribuída em discos de titânio, aplicada por imersão e tratada termicamente em fornos com atmosfera ambiente.

#### 4.2.2 Teste Antibacteriano

O teste antimicrobiano 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 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).

Para cada cepa foram utilizados três discos de cada grupo, totalizando seis discos por teste e repetidos por três vezes independentes, para que os resultados fossem posteriormente avaliados por métodos estatísticos. (Juan et al., 2010). A cepa foi inicialmente inoculada em tubo de ensaio contendo 5 mL de infusão de cérebro e coração, BHI, esterilizado e suplementado com hemina e menadiona. Após a inoculação, os tubos 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 72 horas, até atingir a concentração de  $\approx 10^9$  bactérias/mL. Para confirmar a concentração do meio líquido foi utilizada escala de *Mc Farland* n° 3 (9 x 10 $^8$  cel/mL). Em seguida, alíquotas de 0,1mL, foram

transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI estéril, juntamente com os respectivos discos, sendo três do grupo controle (Ti) e três contendo filme nanoestruturado com partículas de prata, que foi o grupo teste (NT-Ag). Os tubos foram incubados em jarras de anaerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Após 48 horas, houve crescimento bacteriano e então os discos foram retirados, lavados com 4 mL de água destilada e secos em papel absorvente esterilizado, sendo em seguida depositados em tubos contendo 5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) e realizada agitação em vortex, durante 60 segundos, para dispersão das bactérias aderidas ao disco. A partir dessa solução inicial foram realizadas diluições seriadas, pré-estabelecidas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>), alíquotas de 0,1 mL foram transferidas, para placas de Petri contendo ágar de soja tripsicaseína (TSA), extrato de levedura, suplementado com hemina e menadiona e enriquecido com 5% de sangue de cavalo (Akhavan, 2009; Su et al., 2009; Juan et al., 2010; Liao et al., 2010; Zheng et al., 2012). Em seguida, com o auxílio de alças de *Drigalsky* previamente esterilizadas, espalhou-se o material pela superfície dos meios. As placas inoculadas foram incubadas em dessecadores de vidro Pyrex, em condições de anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>), a 37°C, durante 48 horas (Zheng et al., 2012). Posteriormente foi realizada a contagem do número de colônias formadas na superfície das placas e depois foi realizado o cálculo das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), determinado pela fórmula: UFC = contagem do nº de colônias x inverso do fator de diluição x 10 (Juan et al., 2010; Liao et al., 2010; Zheng et al., 2012).

A figura 4.1 ilustra duas placas de ágar sangue, com crescimento em colônia de *A. actinomycetemcomitans*, na concentração de 10<sup>-3</sup>, e a figura 4.2, apresenta um esquema da metodologia utilizada para o teste antibacteriano.

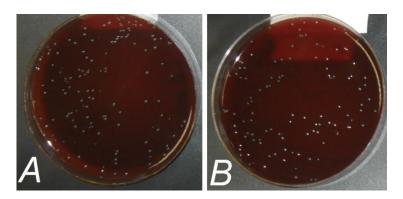


Figura 4.1 – Placa de ágar sangue contendo crescimento em colônia de *A.actinomycetemcomitans*, na diluição de 10<sup>-3</sup>, do grupo Ti (A) e do grupo NT-Ag (B)

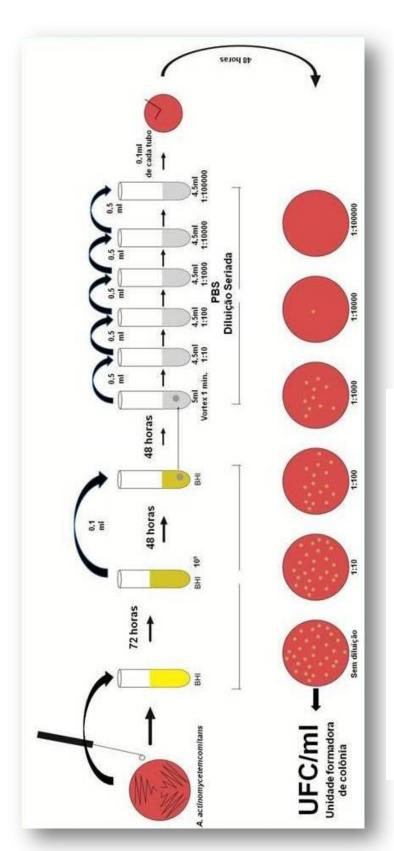


Figura 4.2 - Metodologia: teste antibacteriano

#### 4.2.3 Análise da Adesão Bacteriana

A análise da adesão bacteriana foi realizada no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, supervisionada pelo Prof. Dr. Victor E. Arana-Chavez. Foram utilizadas cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277). Foram utilizados 3 discos de cada grupo, para cada espécie bacteriana.

Foi adicionada alíquota de 0,1 mL, de solução BHI, contendo 109 bactérias/mL, em tubos de ensaio com 5 mL de BHI estéril suplementado com hemina e menadiona; logo em seguida foram adicionados os discos, os tubos foram então incubados a 37°C, em anaerobiose, durante 48 horas (Juan et al., 2010; Liao et al., 2010). Foi realizada a remoção dos discos, lavados com 4 mL de água destilada, o excesso de água foi seco em papel absorvente esterilizado e submersos em solução contendo glutaraldeído 0,1%, formaldeído 4% de pH 7,4, onde permaneceram por 40 minutos. Foram lavados em três trocas de 5 minutos de solução tampão contendo 0,05M de cacodilato de sódio e depois permaneceram por 20 minutos mergulhados em tetróxido de ósmio 1%. Foi realizada então a desidratação na sequencia de etanol, permanecendo por 3 minutos em cada concentração 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95% e no etanol absoluto foram feitas 2 trocas de 5 minutos. Finalizada a desidratação, os discos foram colocados em solução hexametildissilazano (HMDS) durante 5 minutos, sob capela de exaustão. Após secagem, os discos foram montados em suportes ("stubs") de alumínio, cobertos com camada de aproximadamente 25 nm de ouro em aparelho SCD 050 (Bal-Tec AG, Principality of Liechtenstein) e examinados em microscópio eletrônico de varredura (Leo 430, Zeiss-Leica, Cambridge, UK).

A figura 4.3, esquematiza a fase de contaminação dos discos com cepas de Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 43719), Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586) e Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277). E a figura 4.4 ilustra placa de ágar sangue com a cepa Porphyromonas gingivalis (A) e em (B) tubos de ensaio contendo BHI, inoculado com cepas de Porphyromonas gingivalis à esquerda e Aggregatibacter actinomycetemcomitans, à direita.

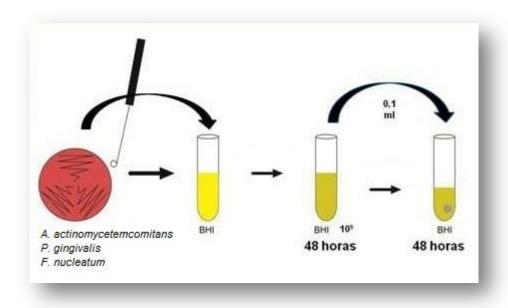


Figura 4.3 - Contaminação dos discos com cepas de *A. actinomycetemcomitans, F. nucleatum* e *P. gingivalis,* antes da análise da adesão por imagens do MEV

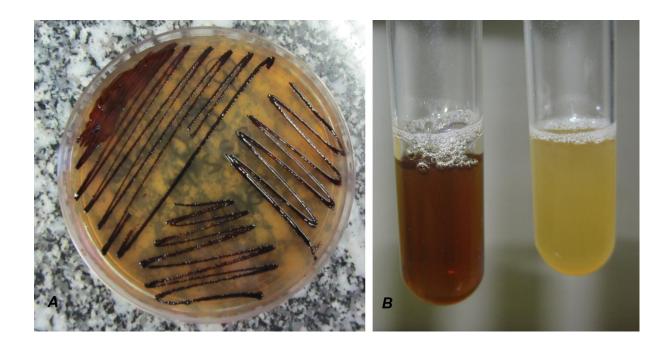


Figura 4.4 – *P. gingivalis* em meio de ágar sangue, após 6 dias de incubação em anaerobiose (A). *P. gingivalis*, à esquerda e *A. actinomycetemcomitans*, à direita, inoculadas em meio líquido BHI (B)

#### 4.2.4 Análise Estatística

Foi realizada a média aritmética de UFC/MI, obtidos na diluição de 10<sup>-2</sup>, que foi a diluição em que o crescimento em placa foi de 30-300 UFC. Então foi realizada a análise das medidas descritivas, média, desvio padrão, mínimo e máximo para cada grupo, controle (Ti) e teste (NT-Ag) e a comparação entre esses grupos, utilizando o teste de *Wilcoxon*, foi adotado nível de significância de 0,01.

#### **5 RESULTADOS**

#### **5.1 TESTE ANTIBACTERIANO**

### 5.1.1 A. actinomycetemcomitans

#### 5.1.1.1 Valores das unidades formadoras de colônia:

A tabela 5.1 mostra os valores absolutos de UFC/mL, obtidos nos testes com cepa de *A. actinomycetemcomitans*, do grupo controle (Ti) e a tabela 5.2, do grupo teste (NT-Ag), em cada diluição. Os resultados da diluição de 10<sup>-5</sup>, não puderam ser obtidos, pois não houve crescimento bacteriano nas placas de ágar sangue, para essa diluição. As placas sem diluição também não foram incluídas na avaliação estatística, pois a contagem do número de colônias em sua superfície foi inviável devido ao intenso crescimento bacteriano, para essa diluição. Os valores médios das UFC/mL, o desvio padrão e o erro padrão do grupo controle (Ti) estão representados na tabela 5.3 e do grupo teste (NT-Ag), na tabela 5.4.

Tabela 5.1- Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição para discos de titânio (Ti)

## UFC/mL

Diluição		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Disco	Grupo				
1	Titânio	1.92 x 10 <sup>5</sup>	1.68 x 10 <sup>5</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
2	Titânio	$0.77 \times 10^5$	$0.7 \times 10^5$	0.6 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
3	Titânio	0.50 x 10 <sup>5</sup>	$0.53 \times 10^5$	$0.6 \times 10^5$	1 x 10 <sup>5</sup>
4	Titânio	1.68 x 10 <sup>5</sup>	1.76 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>5</sup>
5	Titânio	1.9 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>5</sup>	2.1 x 10 <sup>5</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>
6	Titânio	2.77 x 10 <sup>5</sup>	2.5 x 10 <sup>5</sup>	$2.3 \times 10^5$	3 x 10 <sup>5</sup>
7	Titânio	1.67 x 10 <sup>5</sup>	1.78 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
8	Titânio	1.66 x 10 <sup>5</sup>	1.75 x 10 <sup>5</sup>	1.4 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
9	Titânio	1.1 x 10 <sup>5</sup>	0.87 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>

Tabela 5.2 - Valores absolutos de UFC/mL, em cada diluição, para discos com filme nanoestruturado com partículas de prata (NT-Ag)

### UFC/mL

Diluição		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Disco	Grupo				
1	NT-Ag	1.1 x 10 <sup>5</sup>	1.07 x 10 <sup>5</sup>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
2	NT-Ag	0.76 x 10 <sup>5</sup>	0.86 x 10 <sup>5</sup>	$0.7 \times 10^5$	0 x 10 <sup>5</sup>
3	NT-Ag	0.41 x 10 <sup>5</sup>	0.46 x 10 <sup>5</sup>	0.5 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
4	NT-Ag	1.62 x 10 <sup>5</sup>	1.75 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
5	NT-Ag	1.4 x 10 <sup>5</sup>	1.02 x 10 <sup>5</sup>	1.7 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>
6	NT-Ag	1.1 x 10 <sup>5</sup>	1.03 x 10 <sup>5</sup>	$2.1 \times 10^5$	2 x 10 <sup>5</sup>
7	NT-Ag	$0.89 \times 10^5$	1.26 x 10 <sup>5</sup>	$0.9 \times 10^5$	1 x 10 <sup>5</sup>
8	NT-Ag	$0.76 \times 10^5$	0.72 x 10 <sup>5</sup>	$0.8 \times 10^5$	1 x 10 <sup>5</sup>
9	NT-Ag	1.2 x 10 <sup>5</sup>	1.32 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>

Tabela 5.3 - Valores da média aritmética de UFC/mL, em cada diluição, do grupo titânio

	UFC/mL			
Diluição	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
UFC Média	1.55 x 10 <sup>5</sup>	1.46 x 10 <sup>5</sup>	1.53 x 10 <sup>5</sup>	1.56 x 10 <sup>5</sup>
Desvio padrão	0.68	0.63	0.67	0.8
Erro padrão	0.23	0.21	0.22	0.29

Tabela 5.4 - Valores da média aritmética das UFC/mL, em cada diluição, do grupo filme nanoestruturado com partículas de prata (NT-Ag)

	UFC /mL			
Diluição	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
UFC Média	1.02 x 10 <sup>5</sup>	1.05 x 10 <sup>5</sup>	1.20 x 10 <sup>5</sup>	1.00 x 10 <sup>5</sup>
Desvio padrão	0.36	0.37	0.53	0.50
Erro padrão	0.12	0.12	0.18	0.17

Os valores das médias de UFC/mL, do grupo titânio, obtidos em cada diluição estão representados no histograma (Gráfico 5.1) e do grupo NT-Ag no histograma (Gráfico 5.2), a comparação das médias de UFC/mL, entre os dois grupos para cada diluição, está representada no gráfico 5.3.

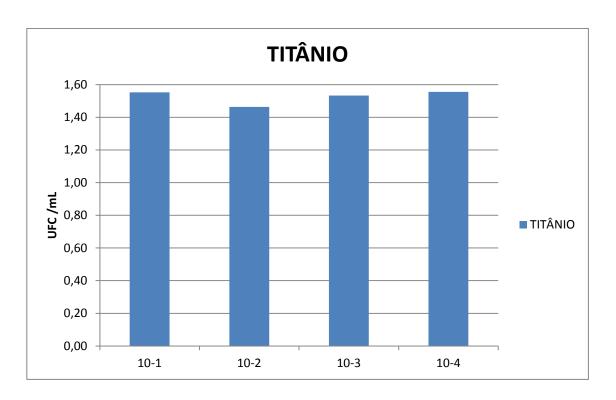


Gráfico 5.1 - Valores médios de UFC/mL do grupo titânio, para cada diluição

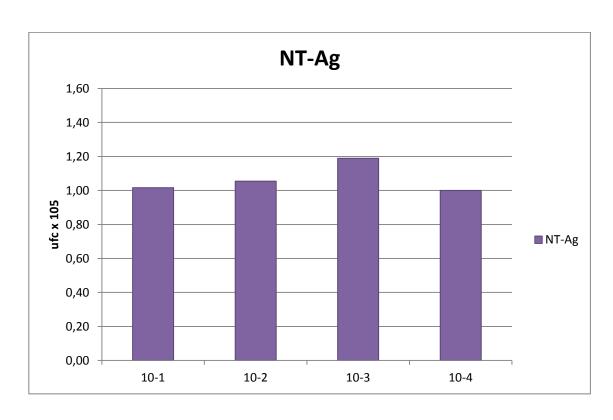


Gráfico 5.2 - Valores médios de UFC/mL do grupo NT-Ag, para cada diluição

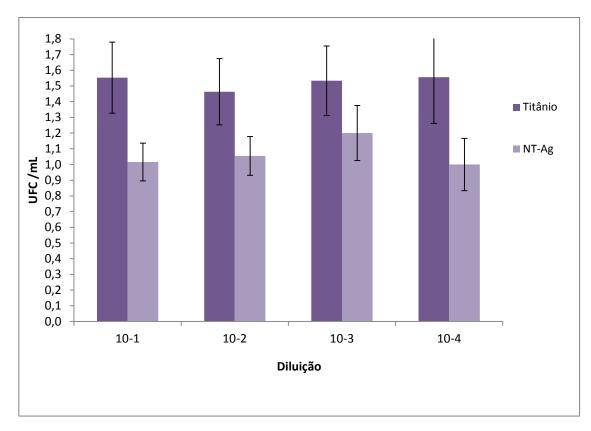


Gráfico 5.3 - Valores médios de UFC/mL do grupo titânio e do grupo NT-Ag, para cada diluição

### 5.1.1.2 Análise estatística

Não houve diferença estatística entre os grupos, para p<0,01. As medidas descritivas e p-valor, encontrados para o teste de *Wilcoxon* do grupo controle (Ti) e grupo teste (NT-Ag), estão descritas na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Medidas descritivas e p-valor para o teste de Wilcoxon

Grupo	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	p-valor
Titânio	1,46	0,63	0,53	2,50	0,1709
NT-Ag	1,05	0,37	0,46	1,75	

#### 5.1.2 F. nucleatum

Os testes realizados com *F. nucleatum* não apresentaram crescimento em colônia na etapa de leitura das placas de ágar sangue, após 48 horas de incubação em anaerobiose, a 37 °C, embora tenha sido constatado crescimento bacteriano no meio líquido BHI, onde os discos ficaram previamente imersos.

### 5.1.3 P. gingivalis

Os testes realizados com *P. gingivalis*, não apresentaram crescimento em colônia na etapa de leitura das placas de ágar sangue, após 48 horas de incubação em anaerobiose, a 37 °C, embora tenha sido constatado crescimento bacteriano no meio líquido BHI, onde os discos ficaram previamente imersos.

## 5.2 Imagens MEV

As imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura demonstram uma diminuição notável da adesão bacteriana nos discos com filme nanoestruturado com partículas de prata (NT-Ag), quando comparadas com as imagens obtidas do grupo titânio (Ti), porém não são suficientes para concluir a eficácia da ação antimicrobiana de NT-Ag, pois para isso devem ser feitos testes comparativos com maior número de amostras.

As eletromicrografias de Ti e NT-Ag, após imersão durante 48h em meio BHI contendo *A. actinomycetemcomitans* estão apresentadas na Figura 5.1; contendo *F. nucleatum* na Figura 5.2; e *P. gingivalis* na Figura 5.3.

A figura 5.4, ilustra as falhas na aplicação do filme nanoestruturado com partículas de prata na superfície dos discos de titânio. É possível observar heterogeneidade e também irregularidades, o que demonstra a necessidade de melhorias na aplicação e confecção do filme.

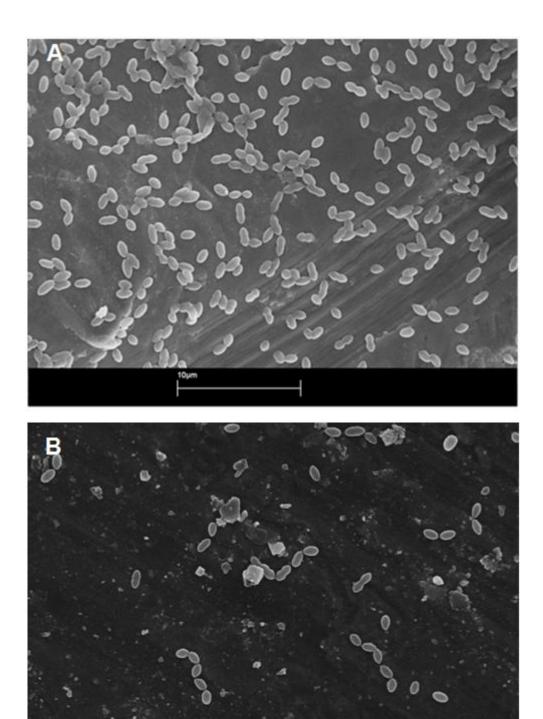
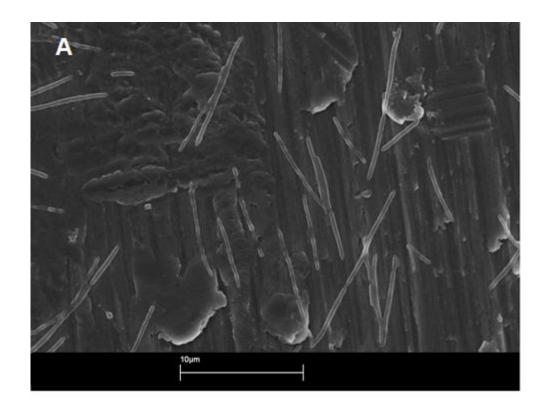


Figura 5.1 – Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h em meio BHI contendo *A. actinomycetemcomitans*. A superfície dos discos do grupo Ti apresentam número maior de bactérias aderidas sobre sua superfície em comparação à superfície dos discos do grupo NT-Ag



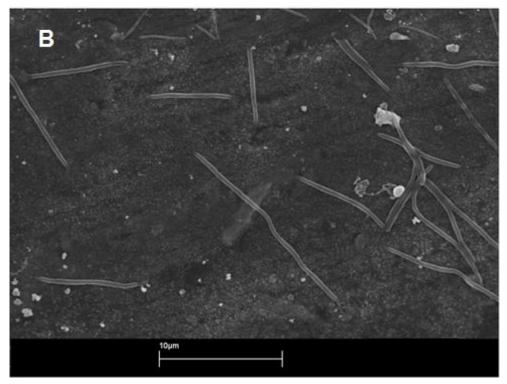


Figura 5.2 – Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h em meio BHI contendo *F. nucleatum.* A superfície dos discos do grupo Ti apresentam número maior de bactérias aderidas sobre sua superfície em comparação à superfície dos discos do grupo NT-Ag

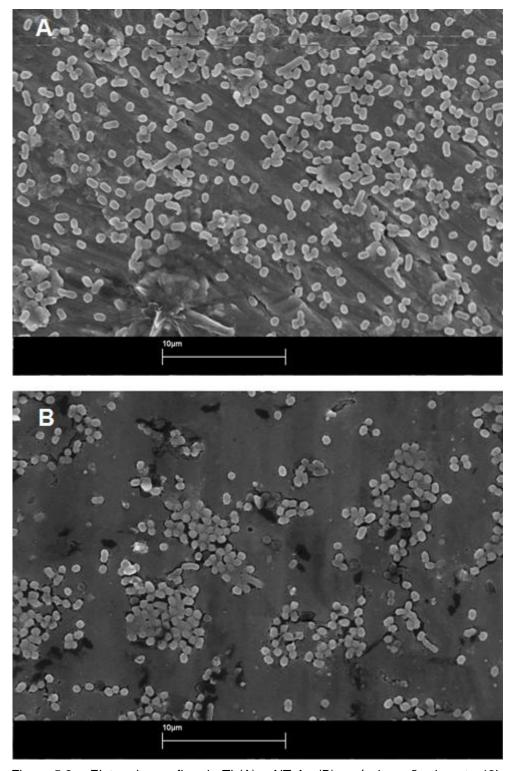


Figura 5.3 – Eletromicrografias de Ti (A) e NT-Ag (B), após imersão durante 48h em meio BHI contendo *P. gingivalis*. A superfície dos discos do grupo Ti apresentam número maior de bactérias aderidas sobre sua superfície em comparação à superfície dos discos do grupo NT-Ag

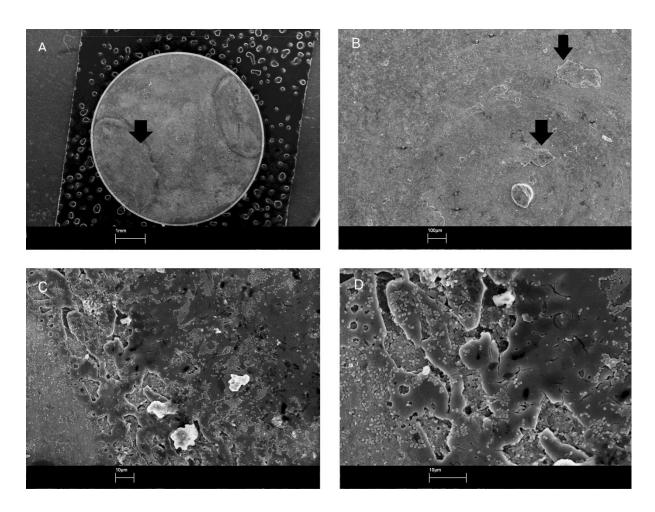


Figura 5.4 – Eletromicrografias de NT-Ag, após imersão durante 48h em meio BHI contendo *P. gingivalis* a seta indica regiões heterogêneas do filme (A), em (B) a seta está indicando regiões de irregularidades na superfície do filme, que estão ilustradas em maior proximidade em (C) e (D)

## 6 DISCUSSÃO

As infecções peri-implantares são consideradas uma das principais causas de perda de implantes (Ferreira et al., 2006; Simonis et al., 2010; Mir-Mari et al., 2012). Por ser uma patologia, que causa destruição do tecido ósseo, sua prevenção é de extrema importância, de forma que o implante seja mantido por mais tempo e em condições de saúde na arcada dentária.

Devido à capacidade de adesão bacteriana, na superfície do implante, uma série de processos irá ocorrer, levando a formação do biofilme. As bactérias mantidas no interior do biofilme estão menos susceptíveis a ação de antibióticos, portanto a alteração da superfície do implante de maneira a produzir uma, que evite a adesão primária bacteriana é de grande importância na prevenção das infecções peri-implantares (Jeyachandran et al., 2006).

Dentre as diversas terapias propostas na literatura para a manutenção e descontaminação da superfície do implante, poucas são preventivas. Muitos estudos estão sendo elaborados na área da saúde com a intenção de encontrar um biomaterial com características antibacterianas e biocompatíveis aos tecidos humanos, com o propósito de ser utilizado na prevenção de infecções (Liau et al., 1997; Kawahara et al., 2000; Silver et al., 2006; Jung et al., 2008b; Rai et al., 2009; Juan et al., 2010). Na área odontológica já existem trabalhos científicos relatando a ação antimicrobiana da prata, que já é utilizada na composição de resinas compostas e cimentos endodônticos (Yoshida et al., 1999; Kawahara et al., 2000; Kreth et al., 2008; Ahn et al., 2009; Su et al., 2009; Necula et al., 2009; Juan et al., 2010; Zheng et al., 2012).

Entretanto, o uso de cobertura na superfície de implantes não se resume apenas à prata, outros metais também estão sendo avaliados, como o óxido cuproso (Cu<sub>2</sub>O), óxido cúprico (CuO), óxido de zinco (ZnO), óxido de tungstênio (WO<sub>3</sub>), compósito de Ag + CuO e Ag + ZnO. Muitas coberturas dependem da liberação de agentes antimicrobianos, como os antibióticos vancomicina e gentamicina, porém a liberação local de antibióticos causa grande preocupação em relação à possibilidade

de induzir resistência bacteriana e outro inconveniente é o índice de liberação, que é de difícil controle (Antoci et al., 2008; Vester et al., 2012; 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. Na presente pesquisa, foi sintetizado um filme nanoestruturado com partículas de prata, que foram dispostas em uma rede de suporte de sílica amorfa, homogeneamente distribuída em discos de titânio, gerando uma superfície nanométrica, que possui elevada área superficial, proporcionando uma área de contato maior entre o componente ativo do material bactericida e os microrganismos.

Observa-se que em outros trabalhos as partículas de prata, aplicadas na superfície, são de tamanho nanométrico (Morones et al., 2005; Su et al., 2009; Juan et al., 2010; Martinez-Gutierrez et al., 2010), o que eleva o custo do material, dificultando seu acesso. Na presente pesquisa, as partículas de prata utilizadas, para a confecção do filme nanoestruturado, foram ancoradas em sílica amorfa e não possuem tamanho nessa escala, esse método foi utilizado, pois torna mais baixo o custo do material, ainda que possua tecnologia inovadora, por apresentar uma superfície final nanométrica. Outro aspecto desse método, é que por estarem ancoradas pelo suporte de sílica amorfa, as partículas de prata não liberam íons, o que deve diminuir seus efeitos tóxicos.

Park et al. 2011, compararam os efeitos de partículas de prata, *in vitro*, 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 danificação 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 nanopartícula de prata baseada em concentração em massa não é apropriada.

Carlson et al. (2008) avaliaram os efeitos tóxicos, dependentes do tamanho das nanopartículas de prata. Os efeitos foram avaliados em macrófagos, pois são as primeiras células de defesa e por possuírem um importante papel na iniciação do estresse oxidativo. Através dos resultados, foi possível concluir que o efeito tóxico,

produzido em macrófagos, foi causado principalmente pela geração de estresse oxidativo.

A presente pesquisa objetivou testar a capacidade de redução da adesão bacteriana de filme nanoestruturado com partículas de prata, quando aplicado na superfície de componentes protéticos feitos de titânio. Para isso, foram realizados dois tipos de teste, o antibacteriano e a avaliação da adesão bacteriana, através de imagens obtidas pelo MEV (Juan et al., 2010; Liao et al., 2010). Para o teste antibacteriano foi utilizada cepa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719) e para a avaliação da adesão bacteriana, cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43719) *Fusobacterium nucleatum* ATCC (25586) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) (Liao et al., 2010; Zheng et al., 2012), que são bactérias anaeróbias, gram-negativas, frequentemente associadas ao quadro de peri-implantite (Becker et al., 1990; Leonhardt et al., 2002; Mombelli, 2002; Quirynen et al., 2002; Pfau; Avila-Campos, 2005; Liao et al., 2010).

Em implantes acometidos pela peri-implantite, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, são encontradas com frequência e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em bolsas profundas, acima de 6 mm (Becker et al., 1990; Leonhardt et al., 2002; Mombelli, 2002; Quirynen et al., 2002; Pfau; Avila-Campos, 2005).

O resultado obtido com cepa de *A. actinomycetemcomitans*, não apresentou diferença estatística (p≤ 0,01) entre o grupo controle (Ti) e o teste (NT-Ag). Este resultado indica que o filme nanoestruturado com partículas de prata, não foi efetivo na redução do número de bactérias aderidas à sua superfície, porém o valor médio de UFC/mL, do grupo NT-Ag (1,05 UFC/mL), foi menor do que o encontrado para o grupo Ti (1,46 UFC/mL), demonstrando que através de melhorias na confecção do filme nanoestruturado com partículas de prata, esse pode se tornar um material promissor na prevenção das infecções peri-implantares, como a mucosite e a peri-implantite, através da diminuição da adesão de bactérias associadas a essa patologia.

As imagens do MEV, ilustradas na figura 5.4, evidenciam regiões de heterogeneidade do filme e também irregularidades em sua superfície, o que indica que apesar de apresentar um bom comportamento na redução da adesão

bacteriana, o filme nanoestruturado com partículas de prata, deve ser bem distribuído e recobrir a superfície de titânio por completo, para que sua ação ocorra de maneira previsível, e talvez assim, possa apresentar resultados significativos. Além disso, a literatura aponta que a ação antibacteriana, pode ser dependente do tamanho das partículas utilizadas no filme nanoestruturado, bem como da concentração de prata apresentada pela superfície (Morones et al., 2005; Su et al., 2009; Martinez-Gutierrez et al., 2010).

Morones et al. (2005), compararam o efeito antibacteriano, dependente do tamanho das partículas, utilizando nanopartículas de prata com tamanhos de 1-100 nm e realizando testes com bactérias gram-negativas. Somente as nanopartículas, com diâmetro de 1-10 nm, apresentaram interação direta com as bactérias, indicando que as propriedades antibacterianas da prata são dependentes de seu tamanho. Martinez-Gutierrez et al. (2010) também compararam o tamanho das nanopartículas de prata em seu efeito antimicrobiano, utilizando tamanhos de 20-25 nm e de 80-90 nm. Os resultados demonstraram que o grupo com tamanho de 20-25 nm foi o mais efetivo contra as bactérias testadas.

Pesquisa comparando os efeitos de acordo com a concentração de prata na superfície de titânio, foi realizada por Su et al. (2009), com um preparo de TiO<sub>2</sub>/Ag, contendo nanopartículas de prata, com diâmetro médio de 20 nm, os testes antibacterianos foram realizados com diferentes concentrações de prata (1, 4, 7 e 10 ppm). A concentração mais efetiva contra *E. coli,* foi de 10 ppm, atingindo nível de inibição do crescimento de 99,9%, porém essa porcentagem diminuiu significantemente na medida em que as concentrações foram diminuindo. Portanto, é possível que uma modificação na composição do filme nanoestruturado, com relação ao tamanho das partículas de prata e também à sua concentração, possa proporcionar uma ação mais efetiva na diminuição das bactérias utilizadas no presente experimento.

As imagens obtidas pelo MEV, também demonstraram uma diminuição notável no número de bactérias aderidas na superfície dos discos do grupo NT-Ag, confirmando a possibilidade de ação antibacteriana do filme nanoestruturado com partículas de prata, porém as imagens não podem ser conclusivas com relação à efetividade do material, uma vez que, para que seja utilizado como parâmetro

estatístico, um número significativamente maior de amostras teria que ser realizado, o que foi inviável nesta pesquisa, devido ao alto custo desse procedimento. Liao et al. (2010), também realizaram a visualização dos espécimes em microscópio eletrônico de varredura, para testar as propriedades antiadesivas de nanopartículas de prata depositadas na superfície de titânio, após incubação das amostras, durante 24 horas em meios contaminados com *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, constataram que a adesão, dessas duas espécies, foi diminuída na superfície com nanopartículas de prata, em comparação com a superfície de titânio polida.

## 7 CONCLUSÕES

Dentro das limitações deste estudo foi possível concluir que:

- O grupo teste (NT-Ag) apresentou valor médio de UFC/ml menor do que o grupo controle (Ti), porém esta diferença não foi estatisticamente significante.
- O filme nanoestruturado com partículas de prata, não foi efetivo na redução da adesão de Aggregatibacter actinomycetemcomitans, sobre sua superfície, quando comparado com o grupo controle (Ti).
- As imagens obtidas pelo MEV demonstram uma notável redução no número de bactérias aderidas à superfície dos discos do grupo teste (NT-Ag), em comparação com o grupo controle (Ti).

## **REFERÊNCIAS**

Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. Dent Mater. 2009;25(2):206-13.

Akhavan O. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO2/Ag/A-TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. J Colloid Interface Sci. 2009; 336(1):117-24.

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

Antoci V Jr, Adams CS, Parvizi J, Davidson HM, Composto RJ, Freeman TA, Wickstrom E, Ducheyne P, Jungkind D, Shapiro IM, Hickok NJ. The inhibition of *Staphylococcus epidermis* biofilm formation by vancomycin modified titanium alloy and implications for treatment of perioprosthetic infection. Biomaterials. 2008;29(35):4684-90.

Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: A comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. J Periodontal Res. 1989; 24(2): 96-105.

Avila-Campos MJ, Nakano V. Pathogenicity of *Fusobacterium nucleatum:* general aspects of its virulence. Int J Probiotics Prebiotics; 2006;1(2): 105-12.

Becker W, Becker EB, Newman GM, Nyman S. Clinical and Microbiologic Findings That May Contribute to Dental Implant Failure. Int J Oral Maxillofac Implants. 1990 Spring;5(1):31-8.

Belibasakis GN, Mattsson A, Wang Y, Chen C, Johansson A. Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distening toxin. APMIS 2004 Oct;112(10):674-85.

Bostanci N,Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol Lett. 2012 Aug;333(1):1-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x. Epub 2012 May 28.

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: Analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infect Immun. 1994 Feb;62(2):501-8.

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.

Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a case for concern? J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):587-90. Epub 2007 Feb 16.

Cho-Yan LJ, Mattheos N, Nixon KC, Ivanovski S. Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. Clin Oral Implants Res. 2012 Mar;23(3):325-33. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02264.x. Epub 2011 Aug 5.

Dabija-Wolter G, Sapkota D, Cimpan MR, Neppelberg E, Bakken V, Costea DE. Limited in-depth invasion of *Fusobacterium nucleatum* into in vitro reconstructed human gingival. Arch Oral Biol. 2012 Apr;57(4):344-51. Epub 2011 Oct 24.

Das M, Badley AD, Cockerill FR, Steckelberg JM, Wilson WR. Infective endocarditis Caused by HACEK Microorganisms. Annu Rev Med.. 1997;48:25-33.

Ewald A, Glückermann KS, Thull R, Gbureck U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. Biomed Eng Online. 2006 Mar 24;5:22.

Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000. 2003;32:24-35.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res. 2000 Dec 15;52(4):662-8.

Ferreira SD, Silva GLM, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. J Clin Periodontol. 2006 Dec;33(12):929-35.

Filoche, S, Wong L, Sissons CH. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. J Dent Res. 2010 Jan;89(1):8-18.

Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. Periodontol 2000. 2006;42:114-57.

Guéhennec LL, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. Dent Mater. 2007 Jul;23(7):844-54. Epub 2006 Aug 14.

Heitz-Mayfield LJ. Peri-implant diseases: Diagnosis and risk indicators. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):292-304.

Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. Periodontol 2000. 2010 Jun;53:167-81.

Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a tripleA\* periodontopathogen?. Periodontol 2000. 2010 Oct;54(1):78-105.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000. 1999 Jun;20:168-238.

Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. Periodontol 2000. 2010 Oct;54(1):53-70.

Jeyachandran YL, Narayandass SaK, Mangalaraj D, Bao CY, Li W, Liao YM, Zhang CL, Xiao LY, Chen WC. A study on bacterial attachment on titanium and hydroxyapatite based films. Surf Coat Technol. 2006;201(6)3462–74.

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

Jung RE, Pjetursson BE, Glauser R, Zembic A, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. Clin Oral Implants Res. 2008a Feb;19(2):119-30. Epub 2007 Dec 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. 2008b Apr;74(7):2171-8. Epub 2008 Feb 1.

Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dent Mater. 2000 Nov;16(6):452-5.

Kreth J, Kim D, Nguyen M, Hsiao G, Mito R, Kang MK, Chugal N, Shi W. The antimicrobial effect of silver ion impregnation into endodontic sealer against Streptococcus mutans. Open Dent J. 2008;2:18-23. Epub 2008 Feb 21.

Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. J Clin Periodontol. 2012 May;39(5):425-33. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x. Epub 2012 Mar 14.

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

Leonhardt Å, Adolfsson B, Lekholm U, Wikström M & Dahlén G. A longitudinal microbiological study on osseointegrated titanium implants in partially edentulous patients. Clin Oral Implants Res. Res. 1993 Sep;4(3):113-20.

Leonhardt Å, Gröndahl K, Bergström C, Lekholm U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. Clin Oral Implants Res. 2002 Apr;13(2):127-32.

Leonhardt Å, Revert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. Clin Oral Implants Res. 1999 Oct;10(5):339-45.

Liao J, Anchun M, Zhu Z, Quan Y. Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. Int J Nanomedicine. 2010 May 13;5:337-42.

Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. Lett Appl Microbiol. 1997 Oct;25(4):279-83.

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.

Martinez-Gutierrez F, Olive PL, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Sanchez EM, Ruiz F, Bach H, Av-Gay Y. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nanomedicine. 2010 Oct;6(5):681-8. Epub 2010 Mar 6.

Mengel R, Kruse B, Flores-de-Jacoby L. Digital volume tomography in the diagnosis of peri-implant defects: an in vitro study on native pig mandibles. J Periodontol. 2006 Jul;77(7):1234-41.

Mir-Mari J, Mir-Orfila P, Figueiredo R, Valmaseda-Castello´n 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.x.

Mombelli, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. Periodontol 2000. 2002;28:177-89.

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.x.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. Periodontol 2000. 1998 Jun;17:63-76.

Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. J Clin Periodontol. 1995 Feb;22(2):124-30.

Mombelli A, Van Oosten MAC, Schurch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987 Dec;2(4):145-51.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005 Oct;16(10):2346-53. Epub 2005 Aug 26.

Necula BS, Fratila-Apachitei LE, Zaat SA, Apachitei I, Duszczyk J. In vitro antibacterial activity of porous TiO<sub>2</sub>-Ag composite layers against methicillin-resistant *Sthaphylococcus aureus*. Acta Biomater. 2009 Nov;5(9):3573-80. Epub 2009 May 18.

Nies DH. Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 1999 Jun;51(6):730-50.

Oliveira LM, Oliveira APLV. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. Braz. j. food technol. 2004;7(2)161-5.

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.

Pfau EA & Avila-Campos MJ. *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. Braz J Microbiol. 2005;36; 281-5.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. Clin Oral Implants Res. 2002 Feb;13(1):1-19.

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.

Sakka S, Coulthard P. Implant failure: Etiology and complications. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Jan 1;16(1):e42-4.

Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Fiehn N-E, Skovgaard LT. Probing around implants and teeth with healthy or inflamed peri-implant mucosa/gingiva. Clin Oral Implants Res. 2002;13(2):113–26. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130201.x

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

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in Periodontal Health and Disease. Curr Issues Mol Biol. 2011;13(2):25-36. Epub 2011 Jan 10.

Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006 Jul;33(7):627-34. Epub 2006 May 25.

Simonis P, Dufour T, Tenenbaum H. Long-term implant survival and success: a 10-16 year follow-up of non-submerged dental implants. Clin Oral Implants Res. 2010 Jul;21(7):772-7.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):134-44.

Su W, Wei SS, Hu SQ, Tang JX. Preparation of TiO<sub>2</sub>/Ag colloids with ultraviolet resistance and antibacterial property using short chain polyethylene glycol. J Hazard Mater. 2009 Dec 30;172(2-3):716-20. Epub 2009 Jul 22.

Swierkot K, Lottholz P, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. Mucositis, Periimplantitis, Implant Success and Survival of Implants in Subjects with Treated Generalized Aggressive Periodontitis: 3 – 16 Year Results of a Prospective Long-term Cohort Study. J Periodontol. 2012;83(10)1213-25.

Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, Palmeira CM. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: A mitochondrial perspective. Toxicol In Vitro. 2011 Apr;25(3):664-70. Epub 2011 Jan 11.

Thiel J, Pakstis L, Buzby S, Raffi M, Ni C, Pochan DJ, Ismat Shah S. Antibacterial properties of silver-doped titania. Small. 2007 May;3(5):799-803.

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.

Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, Stöckle U, Lucke M. Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants in vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. Injury. 2012;41(10):1053-9.

Xing ZC, Chae WP, Baek JY, Choi MJ, Jung Y, Kang IK. In Vitro assessment of antibacterial activity and cytocompatibility of silver-containing PHBV nanofibrous scaffolds for tissue engineering. Biomacromolecules. 2010 May 10;11(5):1248-53.

Wang HL, Weber D, McCauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and case report. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):584-94.

Yoshida K, Tanagawa S, Matsumoto T, Yamada M, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver containing materials. Eur J Oral Sci. 1999;107(4)290-6.

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

# APÊNDICE A – Infusão de Cérebro e Coração Suplementado

BHI	3,7 g
H <sub>2</sub> O	100mL
Extrato de levedura	0,5 g
Hemina	0,1 mL
Menadiona	0,1mL

Autoclavar à 121 °C por 15 minutos.

# APÊNDICE B – Ágar Sangue

## Para 1 litro

Ágar de soja tripsicaseína (TSA) 40 g
Extrato de levedura 5 g
H <sub>2</sub> O destilada 1000 mL
Menadiona 0,10 mL
Hemina 0,10 mL
Autoclavar o meio a 121°C por 15 minutos. Após, resfriar o meio a 45°C, adicionar:
Sangue de cavalo 50 mL

## APÊNDICE C - Solução Tampão PBS

## Para 1 litro

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,77 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 g
NaCl	9,01 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL
Ph	7,3

Aquecer até dissolver por completo. Dispensar em tubos e autoclavar à 121°C por 15 minutos.

## APÊNDICE D – Solução de Hemina e Menadiona

Solução de Hemina (5 mg/mL)

Hemina	0,5 g
Solução de hidróxido de sódio 1N	10 mL
Água destilada	90 mL

Dissolver a hemina na solução de NaOH e adicionar a água destilada. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Guardar em frasco escuro e armazenar em geladeira

Solução de Menadiona (1 mg/mL)

Menadiona	0,1 g
Etanol	100 mL

Dissolver a menadiona na solução de etanol. Guardar em frasco escuro e armazenar em geladeira

# APÊNDICE E – Solução de Hidróxido de sódio (1N)

1 N	4 g
3 N	12 g
10 N	40 a

Dissolver em 100 mL de água destilada.