ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS

Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas

São Paulo

2020

ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS

Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Reabilitação em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo

2020

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.

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

Campos, Roberta Bueno Machado de.

Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogências / Roberta Bueno Machado de Campos; orientador Rodney Garcia Rocha -- São Paulo, 2020.

73 p. : fig. ; 30 cm.

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

Versão Corrigida

1. Peri-implantite. 2. Filmes nanoestruturados. 3. Microbiologia. 4. Prata. 5. Osseointegração. I. Rocha, Rodney Garcia. II. Título.

Campos RBM. Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas
Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 18/02/2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Karin Hitomi Ishikawa

Instituição: _____

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Ivan Onone Gialain

Instituição: Universidade de Cuiabá

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Marcelo Munhoés Romano

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP

Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Às empresas **Sin Implantes® e Nanox Tecnologia S.A.®** pelos recursos cedidos à essa pesquisa e pela parceria.

Agradeço à **CAPES** pelo suporte financeiro na forma da bolsa de mestrado, que possibilitou minha dedicação à pesquisa durante esse período.

À **FOUSP**, que desde 2011, durante minha graduação, tem sido a minha segunda casa, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura cedidos durante o curso de mestrado.

Aos **pacientes da FOUSP**, sem os quais não existiria clínica ou mesmo pesquisa odontológica, agradeço aos pacientes que um dia concordaram em doar material biológico para pesquisas no país.

Aos **professores da FOUSP**, os quais tiveram papel importante na minha formação acadêmica no período de cumprimento de disciplinas.

Aos **professores e monitores da disciplina de clínica integrada** agradeço por todo o ensinamento transmitido e amizade desde a época da graduação, em especial gostaria de destacar: a **Profa. Inês Aparecida Buscariolo**, o **Prof. Dr. Alexandre Hugo Llanos**, o **Marcos Venturini**, o **Prof. Dr. José Leonardo Simone** e a **Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti**.

Aos pós-graduandos **Bruno Carrocini**, **Raquel Gutierrez** e **Thais Lage** pelo apoio, ajuda e convívio semanal, em especial à **Stella Agra** que me ajudou muito no início de tudo.

Dedico um agradecimento especial ao **Prof. Dr. Flávio Eduardo Guillin Perez** que sempre de bom humor alegrava as nossas terças-feiras na clínica da graduação.

Aos **alunos da graduação** com quem aprendi mais do que ensinei e que me fizeram admirar ainda mais a docência.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, que desde a minha graduação foi um professor muito atencioso, agradeço por ser tão gentil, correto e por estar sempre disponível a nos ajudar.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano** agradeço por cada orientação, pelas orientações bem colocadas, pelas palavras de incentivo e por me acalmar nos momentos de aperto. O senhor é um exemplo de profissional dedicado, que ama o que faz. Admiro como inspira os seus alunos de graduação e mais ainda os alunos de pós. Obrigada.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Adde**, que me inspirou enquanto foi o meu professor de corredor na graduação e que teve um importante papel na minha decisão de fazer mestrado.

À **Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer**, por toda a dedicação, atenção e ajuda durante a pesquisa. Obrigada por cada dica valiosa, te admiro muito.

À **Karin Hitomi Ishikawa**, aluna de pós-doutorado do laboratório de Microbiologia Oral que me ensinou tudo o que sei hoje sobre a prática laboratorial, obrigada por toda a sua paciência e incentivo. Você não sabe o quanto seu apoio foi essencial para essa pesquisa.

À técnica do laboratório de Microbiologia Oral **Bruna** e aos colegas que dividiam esse espaço comigo, em especial: **Natali Shimabukuru** e **Amália Caturuci** que me ajudaram diversas vezes nas atividades laboratoriais.

À minha amiga e colega de pós-graduação **Raissa Monteiro Padalko**, que sem ela a minha jornada para concluir o mestrado teria sido muito mais difícil, não somente pela ajuda na parte científica, mas por estar sempre ao meu lado, passando pelos mesmos obstáculos que eu. Obrigada por ser uma das minhas melhores companhias desde a época da graduação até hoje. O nosso convívio juntas sem dúvidas deixou a nossa jornada mais leve e alegre. Obrigada amiga.

À **Priscila Mendes Lucena** colega de pós que adorei conhecer, sempre disposta a ajudar e nos incentivar. Só vejo sucesso no seu caminho.

Ao meu avô **Augusto José** que formado na mesma escola que eu, foi um exemplo de pessoa e profissional para mim, saudades imensas do senhor e da vovó.

À minha mãe **Maria Lucia**, obrigada mãe por estar sempre ao meu lado me apoiando e sempre deixando claro o quanto tem orgulho de mim. Todas as minhas conquistas são frutos da educação que me deram.

Ao meu pai **Ricardo**, obrigada pai por me ensinar a amar o que eu faço do mesmo jeito que você ama o seu trabalho e por ter me dado a base que me fez chegar até aqui. Obrigada pelo apoio de sempre.

Ao meu irmão **Filipe**, que sempre se interessou pela minha pesquisa, me apoiou e comemorou comigo as vitórias ao longo desses anos de mestrado. Obrigada por tudo.

Ao meu companheiro **Murilo**, que perdeu finais de semana me fazendo companhia no laboratório, que sempre tinha palavras doces para me acalmar e que me deu forças para ir em frente.

Agradeço aos meus **amigos** que estiveram comigo me apoiando e incentivando do começo ao fim, gostaria de destacar o meu amigo **Ivan Onone** que esteve sempre ao meu lado fazendo o possível para me ajudar e que sempre foi uma inspiração para mim em relação a vida acadêmica.

À **Deus** que me ouve todos os dias e me dá forças para realizar o que desejo.

“Nada de importante no mundo foi realizado sem paixão”.

(Georg Wilhelm)

RESUMO

Campos RBM. Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Um dos grandes desafios da Implantodontia contemporânea é a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares. O desenvolvimento de biomateriais com características antimicrobianas pode auxiliar na prevenção ou diminuição da colonização das bactérias peri-implanto-patogênicas. Este estudo foi realizado para buscar uma alternativa preventiva, assim, o objetivo foi testar a hipótese de que o tratamento de prata sobre titânio (material utilizado para confecção componentes protéticos de implantes) pode ter uma ação anti-microbiana, prevenindo a instalação das doenças peri-implantares. Avaliou-se a ação antibacteriana de três tipos de revestimentos nanoestruturados com prata aplicados à superfície de discos de titânio frente à formação de biofilmes mono e multiespécies de microrganismos peri-implanto-patogênicos, pelos testes de biomassa e viabilidade celular (UFC). Foram confeccionados discos de titânio divididos em quatro grupos: titânio sem revestimento (controle positivo-Grupo A), titânio com uma camada do revestimento de solução coloidal de prata e sílica (Grupo B), titânio com duas camadas do revestimento de solução coloidal de prata e sílica (Grupo C), titânio extra-polido com uma camada do revestimento de solução coloidal de prata e sílica (Grupo D). Utilizou-se três discos de cada grupo por teste (triplicata), em dois ensaios independentes. Os dados sugerem que o efeito dos revestimentos foi seletivo, com atividade sobre *S. gordonii*, mas favorecendo *S. oralis*, e com pouca/nenhuma interferência sobre a formação de biofilme por *P. gingivalis*. Tendo em vista uma perspectiva preventiva, a aplicação da prata e sílica apresenta um potencial de evitar doenças peri-implantares, devido a inibição de colonização de bactérias colonizadoras iniciais, entretanto novos estudos serão necessários para se comprovar o potencial antibacteriano em situações clínicas.

Palavras-chave: Peri-implantite. Filmes nanoestruturados. Microbiologia. Prata. Osseointegração.

ABSTRACT

Campos RBM. Evaluation of antimicrobial action of nanostructured films with silver and silica particles on titanium against peri-implant-pathogenic bacteria [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

One of the great challenges of contemporary Implantology is the maintenance of the health of peri-implant tissues. The development of biomaterials with antimicrobial characteristics can help to prevent or decrease the colonization of peri-implant-pathogenic bacteria. This study aimed to search a preventive alternative, the objective was to test the hypothesis that the treatment of silver on titanium (material used to make implant prosthetic components) may have an anti-microbial action, preventing the onset of peri-implant diseases. The antibacterial action of three types of nanostructured silver coatings applied to the surface of titanium discs against the formation of mono and multispecies of peri-implant-pathogenic microorganisms was evaluated using biomass and cell viability (CFU) tests. The titanium discs were divided into four groups: uncoated titanium (positive control - Group A), titanium with one layer of silver and silica colloidal solution (Group B), titanium with two layers of silver and silica colloidal solution, (Group C), extra-polished titanium discs with a coating layer of colloidal silver and silica solution (Group D). Three disks from each group were selected per test (triplicate), in two independent tests. The data suggest that the effect of the coatings was selective, with activity on *S. gordonii*, but favoring *S. oralis*, and with little or no interference on the biofilm formation by *P. gingivalis*. In view of a preventive perspective, the application of silver and silica has a potential to prevent peri-implant diseases, due to the inhibition of colonization of initial colonizing bacteria, however further studies will be necessary to prove the antibacterial potential in clinical situations.

Keywords: Peri-implantitis. Nanostructured films. Microbiology. Silver. Osseointegration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 - Desenho experimental	39
Figura 5.2 - Esquema de deposição dip-coating	41
Figura 5.3 - Colônias em placa ágar Mitis	46
Figura 5.4 - Colônias em placa ágar TSA	46
Gráfico 6.1 - Biomassa <i>P. gingivalis</i>	49
Gráfico 6.2 - UFC <i>P. gingivalis</i> /ml	49
Gráfico 6.3 - Biomassa <i>S. oralis</i>	50
Gráfico 6.4 - UFC <i>S. oralis</i> /ml.....	50
Gráfico 6.5 - Biomassa <i>S. gordonii</i>	51
Gráfico 6.6 - UFC <i>S. gordonii</i> /ml	51
Gráfico 6.7 - Biomassa Multiespécie	52
Gráfico 6.8 - UFC <i>P. gingivalis</i> e <i>S. oralis</i> e <i>S. gordonii</i> /ml em ambiente multiespécie	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Cultura Americana)
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i> (Caldo Cérebro Coração)
BOP	Do inglês <i>Bleeding on Probing</i> (Sangramento à Sondagem)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CFU	Do inglês <i>Colony Forming Units</i> (Unidades Formadoras de Colônia)
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
E. COLI	<i>Escherichia coli</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
IC	Índice de Comparação
KLEBSIEL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MONO	Monoespécie
PBS	Do inglês <i>Phosphatebuffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salina)
PCS	Profundidade Clínica de Sondagem
PDT	Do inglês <i>Photodynamic Therapy</i> (Terapia Fotodinâmica)
P. GINGIVALIS	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PSEUDOMONAS SP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RNA	Do inglês <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
S. GORDONII	<i>Streptococcus gordonii</i>
S. ORALIS	<i>Streptococcus oralis</i>
STAPHYLOCOCCUS	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEPSA	Polisilano 3-(triétoxisilil) propilsuccínico anidrido
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Ag	Prata
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
et al	Do Latin EtAlia (e outros)
g	Grama
K ₂ HPO ₄	Fosfato Dipotássico
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
KCl	Cloreto de Potássio
M	Molar
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Massa Molecular
Nº	Número
Nm	Nanograma
rpm	Rotação por Minuto
SiO ₂	Dióxido de Silício
Vs	Versus
xg	Força gravitacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos Gerais	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Discos de Titânio	40
5.1.1	Síntese dos revestimentos nanoestruturados com prata	40
5.2	Grupos Experimentais	41
5.2.1	Avaliação do efeito dos revestimentos sobre a formação do biofilme	42
5.2.2	Filme Condicionante	42
5.2.2.1	<i>Obtenção da Saliva</i>	42
5.2.2.2	<i>Formação do Filme Condicionante</i>	43
5.3	Formação do Biofilme	44
5.3.1	Microrganismos e Condições de Cultura	44
5.3.2	Inóculo e Formação do Biofilme	44
5.4	Estimativa de Biomassa de Biofilme	45
5.5	Determinação da Viabilidade Celular por UFC (Unidades Formadoras de Colônias)	46
5.6	Análise Estatística	47
6	RESULTADOS	49
7	DISCUSSÃO	53
8	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios da Implantodontia contemporânea é a manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares. A estabilidade destes tecidos, depende do bom selamento biológico e definirá o sucesso a longo prazo. A preservação da integridade do epitélio juncional ao redor do sistema implante-prótese, por se tratar da primeira barreira de proteção frente às constantes agressões químicas e microbiológicas existentes no meio bucal, é de extrema importância (Hashim-D et al., 2018; Lin et al., 2019).

Por este motivo, grandes esforços vêm sendo feitos para contribuir com estudos sobre as causas da perda óssea, do impacto das infecções, métodos de diagnóstico e terapias para as peri-implantites. O termo doença peri-implantar é utilizado para descrever complicações biológicas em implantes dentários, incluindo mucosite peri-implantar e peri-implantite (Albrektsson; Isidor, 1994; Schwarz et al., 2006).

As doenças peri-implantares podem ser consideradas uma das principais causas de insucesso dos implantes dentários (Mir-Mari et al., 2012). Existe uma relação direta entre o acúmulo de biofilme e a presença da inflamação tecidual ao redor dos implantes (Renvert et al., 2018). Este biofilme geralmente é composto por bactérias anaeróbicas mistas semelhantes a composição da flora subgengival da periodontite (Mombelli; Décaillot, 2011).

Saulacic e Schaller (2019) aferiram a prevalência das doenças peri-implantares mostrando uma grandeza de 10% dos implantes instalados e 20% dos pacientes após 5 a 10 anos de acompanhamento. A incidência de mucosite variou de 30,7% a 50% para 9,6% a 40% dos sítios investigados. Lee et al. (2017) observaram uma alta prevalência de mucosite peri-implantar em torno de 80% dos pacientes avaliados e 50% dos implantes, e para as peri-implantites, aproximadamente 28% a 77% dos pacientes e 12% a 43% dos implantes avaliados.

Alguns protocolos de tratamento foram propostos ao longo dos anos como desbridamento mecânico, uso de anti-sépticos e antibióticos locais ou sistêmicos, além de procedimentos cirúrgicos e regenerativos (Mombelli et al., 2018). Entretanto,

Charalampakis et al. (2011) observaram que em 54,7% dos pacientes, não era possível interromper a progressão da peri-implantite. Alguns fatores como o tabagismo e o desenvolvimento precoce da doença também foram associados ao insucesso. Desta forma, como relatado por Tonetti et al. (2015), existe uma grande importância em estudos que contribuam em busca de protocolos para prevenção e tratamento da doença, uma vez que a prevalência se mantém alta.

O desenvolvimento de biomateriais com características antimicrobianas pode auxiliar na prevenção ou diminuição da colonização das bactérias peri-implanto-patogênicas (Jung et al., 2008; Rai et al., 2009; Juan et al., 2010). A incorporação de partículas de prata vem sendo estudada com aplicação na implantodontia pelo seu reconhecido efeito antimicrobiano de amplo espectro. Juan et al. (2010) estudou a eficiência de uma superfície de titânio modificada por nanopartículas de prata que revelou um bom efeito contra algumas bactérias da microbiota oral.

Neste panorama clínico e científico, este estudo foi realizado para contribuir como uma alternativa preventiva de se evitar ou diminuir a colonização de bactérias patogênicas, prevenindo a instalação das doenças peri-implantares. O presente trabalho objetivou investigar o efeito antimicrobiano de um revestimento de prata, aplicado sobre as superfícies de titânio, visando reduzir a formação de biofilme mono e multiespécies da microbiota peri-implantar, sendo mimetizada a condição bucal laboratorialmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será apresentada em subdivisões.

2.1 Microbiota das Doenças Peri-implantares

Romeo et al. (2004) relataram a importância da aderência e colonização de bactérias da microbiota oral no desenvolvimento de infecções em superfícies de biomateriais expostos, como o titânio.

Algumas espécies de bactérias como o *Streptococcus gordonii* são reconhecidas como pioneiras neste processo que iniciam a formação da placa dentária constituindo-se como a maioria das bactérias cultiváveis (Loo et al., 2000; Rath et al., 2017).

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

Vargas-Reus et al. (2012) relacionam as espécies associadas a esta doença como a *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Micromonas micros* e *Campylobacter rectus* além de *Staphylococcus aureus* e *Candida spp*, microrganismos oportunistas que não estão diretamente relacionados com a doença, mas que podem também ser encontrados.

2.2 Definição das Doenças Peri-implantares

A mucosite peri-implantar é uma inflamação tecidual restrita aos tecidos moles adjacentes ao implante, com sangramento à sondagem que pode ser desencadeada por um processo infeccioso. A peri-implantite é a evolução desse quadro, frequentemente associada à supuração e profundidade à sondagem, acompanhada por perda óssea resultante da reabsorção marginal peri-implantar (Ardekian; Dodson, 2003; Humphrey, 2006; Heitz-Mayfield, 2008; Lindhe; Meyle, 2008; López-Cerero, 2008).

As mucosites peri-implantares podem ser classificadas a partir das manifestações clínicas inflamatórias reversíveis nos tecidos moles ao redor dos implantes: a) mucosite peri-implantar: lesão inflamatória reversível confinada aos tecidos moles superficiais; b) mucosite hiperplásica: inflamação exuberante, frequentemente encontrada em conjunção com componentes protéticos soltos; c) abscesso mucosal: coleção circunscrita de pus na mucosa peri-implantar, freqüentemente encontrado quando partículas densas de alimento penetram e são retidas em sulcos peri-implantares profundos; d) fistulação: é frequentemente encontrada quando da presença de componentes protéticos soltos. Pode representar também, o resultado final de abscesso mucosal não tratado (Esposito et al., 1999).

O termo peri-implantite foi introduzido ao final da década de 1980, para definir a reação inflamatória com perda de suporte ósseo em tecidos circunvizinhos a um implante funcional, com perda progressiva da osseointegração e do osso marginal de suporte, podendo ser comparada a uma periodontite, e estando frequentemente associada com supuração e bolsas mais profundas, além de mobilidade, dor ou sensação de corpo estranho (Ardekian; Dodson, 2003; Triplett et al., 2003; Humphrey, 2006; Paquette et al., 2006; Heitz-Mayfield, 2008; Lindhe; Meyle, 2008; López-Cerero, 2008; Berglundh; Lindhe, 2010; Greenstein et al., 2010).

2.3 Prevalência das Doenças Peri-implantares

Zitzmann e Berglundh (2008) observaram uma prevalência para as mucosites de 80% dos pacientes e em 50% dos implantes, enquanto a peri-implantite foi observada em 28-56% dos pacientes e 12-43% dos implantes.

Mir-Mari et al. (2012) estudaram a prevalência das doenças peri-implantares em pacientes atendidos em consultórios particulares com uma amostra de 964 implantes em 245 pacientes e encontraram como resultado 12% a 22% dos implantes apresentaram peri-implantite e cerca de 40% dos pacientes apresentaram mucosite.

Lee et al. (2017) analisaram em revisão sistemática a prevalência de doenças peri-implantares. Dos 47 artigos selecionados com média ponderada as prevalências de peri-implantite baseadas em implantes e em indivíduos foram (IC [Intervalo de Confiança]: 95%) de 9,25% e 19,83%, respectivamente. A média ponderada e a prevalência de mucosite peri-implantar com base em implantes e em indivíduos foi de 29,48% e 46,83%, respectivamente.

Atualmente credita-se à falta de padronização nos métodos de diagnóstico nos trabalhos científicos em estudos sobre a prevalência de doenças peri-implantares, a grande variação entre os dados observados (Renvert et al., 2018; French et al., 2019). Esta grande variabilidade no diagnóstico foi demonstrada neste estudo retrospectivo de coorte aberta com 4.591 implantes dentários, observando-se a prevalência de mucosite em 38,6% (implantes) quando existiam critérios mais rígidos, como a presença de sangramento à sondagem, enquanto 14,2% foram observados com critérios menos rígidos, aos 6-7 anos após instalação. A prevalência de peri-implantite, neste mesmo período foi de 4,7% e 3,6% quando se utilizaram critérios (rígidos e menos rígidos), respectivamente (French et al., 2019).

2.4 Causas e Tratamento das Doenças Peri-implantares

Os riscos de doenças peri-implantares podem ser influenciados por alguns fatores. Dentre eles, a alteração superficial apresenta grande influência na formação inicial do biofilme. Além disso, acredita-se que a rugosidade da superfície pode agir protegendo as bactérias dos efeitos da higienização dos tecidos moles ao redor. Em superfícies mais rugosas há uma maior dificuldade de se realizar a higienização adequada do local apresentando-se como possível justificativa para a dificuldade nos tratamentos atuais para as doenças peri-implantares. Por outro lado, implantes e pilares, que possuem um polimento de alto brilho reduzem o risco de acúmulo de placa

bacteriana quando comparados a implantes e pilares polidos normalmente, e consequentemente diminuem o risco de uma mucosite e da peri-implantite (Al-Ahmad et al., 2014).

Existem diversas propostas terapêuticas para as doenças peri-implantares, como a utilização de clorexidina, desbridamento mecânico manual ou ultrassônico, com pontas plásticas ou fibras de carbono, jatos de pó abrasivos, antibioticoterapia local e sistêmica, laserterapia, além de cirurgias regenerativas, porém ainda não existe um protocolo estabelecido de tratamento (Heitz-Mayfield; Mombelli, 2014).

Toma et al. (2018) compararam a eficácia em diferentes alternativas de tratamentos para as doenças peri-implantares. Os biofilmes de *S. gordonii* foram cultivados em discos de titânio durante 48 horas removidos com uma cureta de plástico, dispositivo abrasivo ao ar (Perio-Flow®), escova de titânio (TiBrush®) ou implantoplastia. O biofilme restante e a recolonização dos discos tratados foram observados por microscopia eletrônica de varredura e quantificados após coloração com cristais de violeta. A rugosidade da superfície (Ra e Rz) foi aferida utilizando-se um perfilômetro. Perio-Flow®, TiBrush® e implantoplastia foram mais eficazes que a cureta plástica na remoção do biofilme de *S. gordonii* e na prevenção da recolonização.

A descontaminação da superfície do implante de bactérias e toxinas são a base para o sucesso no tratamento das doenças peri-implantares. Entretanto, o aumento da rugosidade da superfície dos implantes, pode dificultar esta descontaminação (Steinemann, 2000). O desenho dos implantes e suas diferentes superfícies dificultam a remoção do biofilme microbiano, diminuindo a efetividade do desbridamento mecânico, quando realizado isoladamente (Charalampakis et al., 2011).

Esposito et al. (2012) afirmaram que após o agravamento da condição da mucosite e consequente instalação da peri-implantite, ainda não existem fortes evidências para um tipo de tratamento mais eficaz. Após um ano, foram observadas, recidivas na maioria absoluta dos casos.

Rams et al. (2014) observaram *in vitro* a resistência de bactérias patogênicas para concentrações terapêuticas de clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou

metronidazol em pacientes com peri-implantite dificultando o tratamento com apenas antibioticoterapia.

Heitz-Mayfield e Mombelli (2014) em revisão sistemática, puderam concluir que devido às dificuldades encontradas, como variabilidade de definições e métodos de diagnóstico, diferentes graus de severidade incluídas, heterogeneidade nos desenhos de estudos científicos, tempos de acompanhamento e critérios de inclusão e exclusão, não foi possível firmar recomendações específicas para os tratamentos não-cirúrgicos. Entretanto recomendam a utilização de alguns elementos, como a instrução de higiene oral, interromper hábitos de tabagismo, acesso ou remoção das próteses para o controle de placa e desbridamento não cirúrgico com ou sem agentes antimicrobianos. Em relação ao controle cirúrgico pós-operatório, recomendam a utilização de antibioticoterapia sistêmica e bochechos com clorexidina tópica por algumas semanas, além do controle por 3 a 6 meses com periódicas instruções de higiene e controle do biofilme supramucosal.

Kadkhoda et al. (2016) observaram que o uso de enxaguatório bucal 0,2% de clorexidina teve efeito antibacteriano sobre espécies de *A. actinomycetemcomitans* isolados do biofilme subgengival de lesões peri-implantares.

Suárez-López Del Amo et al. (2016), em revisão sistemática, observaram que o tratamento não-cirúrgico da mucosite parece ser efetivo, enquanto que em lesões de peri-implantites os resultados apresentaram-se modestos e não previsíveis. Os períodos de seguimento variaram de 6 a 60 meses.

Heitz-Mayfield et al. (2018) observaram que o diagnóstico de peri-implantite requer a presença de BOP (*bleeding on probing*- sangramento à sondagem) e perda óssea progressiva e o tratamento das peri-implantites deve ser seguido de cuidados de suporte individualizados, acarretando em alta sobrevida nos implantes após 5 anos.

A terapia das doenças peri-implantares seguida de cuidados regulares de suporte resultou em alta sobrevida do implante a médio e a longo prazo. Resultados favoráveis foram relatados, com melhorias clínicas e níveis ósseos peri-implantares estáveis na maioria dos pacientes (Roccuzzo et al., 2018).

2.5 Antimicrobianos e Prata frente às Doenças Peri-implantares

Godoy-Gallardo et al. (2015) estudando o poder antibacteriano de revestimento sob superfícies de titânio frente à biofilmes monoespécies e multiespécies comprovaram que as cepas bacterianas possuem sensibilidades distintas e por isso o modelo de biofilme multiespécie é mais confiável para se avaliar as propriedades antibacterianas em amostras de estudos odontológicos.

Na década de 1940, depois das penicilinas, foi introduzido o uso de prata para o tratamento de infecções bacterianas (Russell, 1982; Demling; DeSanti, 2001; Chopra, 2007). A prata voltou a aparecer na década de 1960 quando Moyer introduziu o uso de nitrato de prata a 0,5% para o tratamento de queimaduras. Ele propôs que esta solução não interferisse na proliferação epidérmica, pois possui propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Moyer, 1965; Bellinger; Conway, 1970).

Em 1968, o nitrato de prata foi combinado com sulfonamida para formar creme de sulfadazina de prata, que serviu como agente antibacteriano de amplo espectro e foi usado para o tratamento de queimaduras. A sulfadazina de prata é eficaz contra bactérias como *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.* Comprova-se também que o material possui algumas atividades antifúngicas e antivirais (Fox; Modak, 1974).

Lansdown (2002) e Castellano et al. (2007) apresentaram um modelo para o mecanismo de ação da prata ionizada, que se justifica através da sua ligação às proteínas teciduais com consequente mudanças estruturais na parede celular bacteriana e membrana além da ligação ao DNA e RNA bacteriano desnaturando e inibindo a replicação.

Jung et al. (2008) observaram reduções de mais de 5 log₁₀ UFC / ml de ambas as bactérias *S. aureus* e *E. coli* após 90 min de tratamento com a solução de íons de prata e concluíram que os resultados deste estudo sugeriram que os íons de prata podem causar danos nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* resultando em uma eventual morte.

Segundo Rai et al. (2009) relataram que a prata é considerada não-tóxica para os seres humanos em concentrações pequenas e ser pouco provável que os microrganismos desenvolvam resistência contra a prata, em comparação com os antibióticos.

Os íons de prata possuem maior ação em bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas. A razão pela qual as bactérias Gram-positivas geralmente são menos susceptíveis à agentes antibacterianos que contêm íons de prata, pode ser devido ao fato de que a camada de peptidoglicano carregada negativamente liga-se a alguns íons de prata (Monteiro et al., 2009).

Juan et al. (2010) utilizando o método por silanização prepararam uma superfície de titânio modificada por nanopartículas (Ti-nAg) de prata e observaram após incubação de 24 horas uma redução de 94% dos *Staphylococcus aureus* e mais de 95% de *Escherichia coli*, identificando este método com grande potencial como biomaterial para implantes. Em um outro estudo, os resultados demonstraram que o Ti-nAg não apresenta qualquer citotoxicidade para os fibroblastos gengivais humanos (Juan et al., 2010).

Lanfredi (2012) avaliou a atividade antibacteriana de filme contendo partículas de prata aplicado em discos de titânio, com o objetivo de reduzir a adesão de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na contagem, entretanto, através da leitura dos discos em microscópio eletrônico de varredura demonstraram redução da adesão bacteriana nos discos com filme nanoestruturado com partículas de prata em comparação com as imagens do grupo controle para todas as cepas.

Vargas-Reus et al. (2012) avaliaram a ação prata, óxido cuproso, óxido cúprico, óxido de zinco, dióxido de titânio, óxido de tungstênio, compósitos de Ag com CuO e Ag com ZnO contra cepas de *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e observaram que a prata apresentou melhores resultados, relatando ainda ser promissor esta associação com o titânio de implantes dentários.

Zheng et al. (2012) estudaram a ação antimicrobiana de superfície nanoestruturada de prata em titânio em cepas de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Candida albicans* e observaram redução de 93,99% dos *S. mutans*, 93,57% de *P. gingivalis*, e 89,78% de *C. Albicans* exibindo, portanto, boas propriedades antimicrobianas.

Rani et al. (2015) em estudo *in vitro*, observaram a influência da incorporação de nanopartículas de prata na composição de membranas utilizadas para regeneração tecidual guiada nas cepas de *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, através da contagem das unidades formadoras de colônia, observando diminuição do número de bactérias, e boas perspectivas terapêuticas para o controle da infecção associada a esse tipo de membrana.

Kassab (2015) avaliou a citotoxicidade de nanoestruturas associadas à prata aplicadas à superfície de titânio frente a cultura de osteoblastos, visando desenvolver um material biocompatível e promissor pela prevenção da colonização bacteriana dos implantes, e observou uma morfologia celular compatível com viabilidade e presença de adesão dos osteoblastos em todas as superfícies testadas, similar aos grupos controles, demonstrando sua biocompatibilidade à osteoblastos.

Farhadian et al. (2016) avaliaram a ação de nanopartículas de prata associadas à contenções ortodônticas removíveis e concluíram que a adição de nanopartículas de prata no acrílico das contenções removíveis mostrou ter uma grande efetividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*.

Teodoro et al. (2011) estudaram os mecanismos de toxicidade de nanopartículas de prata (NP-Ag). Puderam observar através da disfunção mitocondrial do fígado de ratos que a deposição de NP-Ags na mitocôndria causa produção de estresse oxidativo, o que gera uma quebra na cadeia respiratória mitocondrial, o aumento da óxido redução também pode induzir respostas inflamatórias. Carlson et al. (2008) relataram que os efeitos tóxicos da prata foram avaliados em macrófagos, pois são as primeiras células de defesa e por possuírem um importante papel na iniciação do estresse oxidativo. Park et al. (2011) demonstraram em seu estudo que o tamanho das partículas pode interferir na sua toxicidade, comparando 3 diferentes

tamanhos de partículas (20, 80, 113 nm). Em todos os aspectos avaliados, as nanopartículas de 20 nm demonstraram ser mais tóxicas do que as maiores.

Smanio (2018) analisou três filmes nanoestruturados com partículas de prata, que foram dispostos em uma rede de suporte de solução coloidal de sílica, prata e dióxido de titânio e somente dióxido de titânio. Esses revestimentos foram distribuídos homogeneamente em discos de titânio, gerando uma superfície nanométrica, com elevada área superficial. Os revestimentos nanoestruturados com partículas de prata foram efetivos na redução de UFC/ml das bactérias *A. actinomycescomitans* e *P. gingivalis*, sendo que o melhor resultado foi encontrado com revestimento de sílica. Os revestimentos nanoestruturados com partículas de prata não demonstraram eficiência na diminuição das bactérias *S. aureus* e *F. nucleatum*, quando comparados com o disco de titânio sem revestimento. Posteriormente foi analisada uma maior aplicação de prata no revestimento de sílica o que interferiu positivamente no desempenho antimicrobiano, promovendo uma maior redução da bactéria *S. gordonii*, obtendo resultados semelhantes à clorexidina 0,12%.

Vilarrasa et al. (2018) analisaram a formação do biofilme em titânio com nanopartículas de prata e titânio com silanização TESPSA (polisilano 3- (trietoxisilil) propilsuccínico anidrido) de bactérias de cinco tipos diferentes de cepas bacterianas da microbiota oral. Concluíram que o TESPSA reduziu significativamente a viabilidade celular em todas as superfícies, por outro lado, a deposição de prata na superfície de titânio não apresentou diferença antibacteriana quando comparada à superfície correspondente sem prata

Nascimento et al. (2019) compararam a eficiência antibacteriana de uma pasta de iodofórmio em pilares de implantes recobertos com prata, o estudo realizado *in vitro*. Concluíram que a pasta de iodofórmio e os pilares revestidos de prata reduziram a frequência da contaminação e os níveis microbianos. Os tratamentos não foram eficazes em relação a redução da contagem das espécies-alvo.

Sobolev et al. (2019) estudaram a incorporação de nanopartículas de prata em um revestimento de óxido de titânio contendo cálcio e fósforo. Puderam concluir que o revestimento contendo as partículas de Ag possui uma eficácia significativamente maior quando comparado ao revestimento sem Ag frente à colonização das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3 OBJETIVOS

O trabalho foi dividido entre os objetivos gerais e os objetivos específicos.

3.1 Objetivos Gerais

Determinar o efeito de filmes nanoestruturados com incorporação de prata e sílica aplicado ao titânio, em modelo de biofilme formado por organismos orais sobre a película adquirida formada por saliva.

3.2 Objetivos Específicos

Este estudo *in vitro* visa determinar o efeito de filmes nanoestruturados com incorporação de prata e sílica aplicado ao titânio sobre a formação de biofilme. Foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a adição e o número de camadas de prata e sílica aplicadas ao titânio.
- o grau de polimentos dos discos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

-biomassa e número de unidades formadoras de colônias nos biofilmes monoespécies formados por organismos comensais iniciadores do biofilme dental *S. gordonii* e *S. oralis* ou pelo patógeno *P. gingivalis*, e em biofilme multiespécie.

4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Considerando o grande número de trabalhos na literatura demonstrando que não há um protocolo estabelecido para o tratamento das doenças peri-implantares e sem altos índices de sucesso nos tratamentos existentes, o estudo propôs buscar uma alternativa preventiva à instalação da doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na figura 5.1 ilustra um desenho do ensaio laboratorial.

Figura 5.1 – Desenho Experimental

Fonte: O autor.

Foram avaliados os efeitos de diferentes revestimentos e de tratamento de superfície de discos de titânio sobre a formação de biofilme e os dados comparados à um grupo controle, em que o titânio não recebeu qualquer tratamento. Os discos com diferentes tipos de tratamento foram divididos em grupos que serão detalhados futuramente. Visando determinar se o efeito observado era seletivo, foram avaliados biofilmes monoespécie formados por *S. oralis*, *S. gordonii* e *P. gingivalis*, e multiespécies. Os discos foram submetidos a tratamento com saliva, mimetizando a formação da película adquirida, que ocorre no ambiente oral. A seguir, os biofilmes de organismos orais foram formados por 24 horas sobre as diferentes superfícies, e foram

avaliados a biomassa total do biofilme e o número de UFC, que representa o número de células bacterianas viáveis no biofilme formado.

5.1 Discos de Titânio

Foram confeccionados discos de 5,9 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, com a mesma barra de titânio utilizada para confecção de componentes protéticos que foram fornecidos pela empresa SIN Implante®. Parte dos discos sofreu aplicação dos revestimentos nanoestruturados de deposição da solução coloidal de prata e sílica desenvolvida pela empresa NANOX Tecnologia S.A.® (grupos B, C e D), enquanto os demais foram usados como controle (grupo A) sem aplicação.

Todos discos foram polidos industrialmente (antes da aplicação dos revestimentos) com rodas de granulação decrescente realizados em três etapas: roda de feltro com esmeril 220 usando massa marrom para polimento (nicrotex), roda dura ventilada e roda amarela para brilho usando massa pratalux. Os discos extra-polidos (grupo D) passaram duas vezes pelo mesmo processo de polimento.

5.1.1 Síntese dos revestimentos nanoestruturados com prata

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

Para obter os revestimentos dos discos foi utilizado o método de dip-coating, como ilustrado na figura 5.2. Depois da deposição da suspensão coloidal, os discos foram tratados em um forno por uma hora em uma temperatura de 120 °C para evaporar a água e permitir a formação de ilhas do agente antimicrobiano (prata) na superfície do titânio. As partículas de prata apresentam tamanho médio de partícula de 200 nm

Figura 5.2 – Esquema de deposição por dip-coating

Fonte: Smanio (2018, p. 61).

5.2 Grupos Experimentais

Assim foram empregados os seguintes grupos experimentais:

- Grupo A:** disco sem deposição
- Grupo B:** disco com uma camada de deposição da solução coloidal de prata e sílica
- Grupo C:** disco com duas camadas de deposição da solução coloidal de prata e sílica
- Grupo D:** disco extra-polido com uma camada de deposição da solução coloidal de prata e sílica

5.2.1 Avaliação do efeito dos revestimentos sobre a formação de biofilme

A avaliação microbiana foi realizada no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com as cepas isoladas e em combinação, em modelos de biofilme mono e multiespécies. Os discos de titânio foram testados em triplicata em ensaios de biofilme mono e multiespécies. Foram utilizados discos sem deposição (controle positivo - grupo A), e com diferentes tratamentos experimentais (grupos B, C e D). Além de poços inoculados com as diferentes cepas bacterianas ou com o inóculo para formação do biofilme multiespécie, foram também empregados discos controle (A) e dos grupos experimentais (B, C, D) em poços que não receberam inóculo bacteriano, constituindo os controles negativos.

5.2.2 Filme Condicionante

Visando mimetizar as condições orais, os discos foram tratados com saliva obtida de 3 voluntários, para a formação de filme condicionante, denominado película adquirida, com objetivo de prover os receptores para a adesão bacteriana. A formação de filme condicionante foi realizada de acordo com Lemos et al. (2010).

5.2.2.1 Obtenção da Saliva

A doação da saliva pelos pacientes foi feita mediante assinatura de formulário específico (Anexo B) devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP (CAAE: 92322118.8.0000.0075) (Anexo A). A avaliação dos pacientes foi feita sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Alberto Adde. Os sujeitos que se enquadraram nos critérios de inclusão responderam à anamnese da pesquisa e foram submetidos a exame periodontal completo.

Foram selecionados 3 voluntários saudáveis, considerando-se os seguintes critérios:

- inclusão: periodonto saudável, sem sítios com PCS ≥ 3 mm, e sangramento a sondagem em menos que 30% do total de sítios.
- exclusão: presença de qualquer condição sistêmica que possa afetar a microbiota oral (como diabetes), gestantes ou lactantes, tabagistas, que relatem o uso de antibióticos, e/ou antissépticos bucais nos três meses prévios à coleta do material de estudo.

As amostras de saliva foram obtidas pela manhã após um jejum durante a noite, durante o qual foi solicitado aos participantes não ingerir nada, exceto água. Foram obtidos 5ml de saliva total estimulada por mastigação de um pedaço equivalente a 1 grama de parafilme, e mantidas em tubos em recipiente com gelo.

5.2.2.2 *Formação do Filme Condicionante*

A saliva estimulada foi submetida a centrifugação a 5.500xg, 4 °C, 10 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi transferido para outro tubo e esterilizado por filtração (filtro Millipore, com poros de 0,2 μ m), seguindo-se adição de 1 ml de solução de PMSF (0.1M phenylmethyl-sulfonylfluoride [Sigma]) para inativação das proteases e estocadas em freezer a -80°C até o momento do uso. A saliva foi diluída 1:5 em tampão AB [50 mM de KCl, 1 mM de fosfato de potássio (0,35 mM de K₂HPO₄ e 0,65 mM de KH₂PO₄), 1 mM de CaCl₂, 0,1 mM de MgCl₂, Ph 6,5].

Em cada poço da placa de 96 poços (Corning) foram acrescidos 100 μ l dessa saliva clarificada diluída 1:5, juntamente com os discos de titânio, seguindo-se de incubação a 37 °C sob agitação em microaerofilia por 24 horas. Após a incubação, a porção não adsorvida foi retirada com o auxílio de micropipetas.

5.3 Formação do Biofilme

Detalhamento da formação do biofilme mono *P. gingivalis* (Pg), *S. oralis* (So), *S. gordonii* (Sg) e biofilme multiespécie.

5.3.1 Microrganismos e Condições de Cultura

As cepas padrão *P. gingivalis* (ATCC 33277), *S. oralis* (ATCC 10557) e *S. gordonii* DH-1 (Hsu et al., 1994) foram utilizadas nos ensaios de formação de biofilme monoespécie e multiespécies.

As bactérias foram cultivadas a partir de estoques congelados a -80 °C em meio sólido a 37 °C. *P. gingivalis* foram cultivadas em placas de ágar triptona de soja (TSA, Acumedia, Lansing, Estados Unidos) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 5 mg de hemina / ml e 10 mg de menadiona / ml, sob condições anaeróbias, em câmara de anaerobiose (Plas Labs) em atmosfera de 85% de N₂, 5% H₂ e 10% CO₂. Os estreptococos comensais *S. oralis* e *S. gordonii* foram cultivados em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Acumedia, Lansing, Estados Unidos) em microaerofilia (estufa com atmosfera de 10% de CO₂).

5.3.2 Inóculo e Formação do Biofilme

Para os ensaios de biofilme, *P. gingivalis* foi cultivada em caldo BHI com 5 mg de hemina/ml e 10 mg de menadiona/ml por 12 - 16 horas em anaerobiose. *S. oralis* e *S. gordonii* foram cultivadas em caldo BHI por 12 - 16 h em atmosfera de microaerofilia. As concentrações das bactérias nas culturas foram ajustadas pela densidade óptica (DO) 600nm até atingir DO 600nm~0,5 para *P. gingivalis* e DO 600nm ~1 para *S. oralis* e *S. gordonii*. As culturas de *S. oralis* e *S. gordonii* foram então diluídas 1:10 em caldo BHI (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos). A

seguir as culturas foram incubadas por 3 horas, 37 °C, em anaerobiose (Pg) ou microaerofilia (So e Sg). A DO a 600nm das culturas foi ajustada até atingir o valor de 1 para *P. gingivalis*, e 0,5 para So e Sg, correspondendo a 1×10^9 UFC/ml de cada espécie

Alíquotas de 100µL de inóculo bacteriano em caldo BHI contendo 1×10^7 UFC/ml de cada espécie foram adicionadas aos poços contendo os diferentes discos de titânio, seguindo-se adição de 100µl do mesmo meio estéril, para a formação dos biofilmes monoespécies. Para a formação dos biofilmes multiespécies, quantidades iguais das culturas ajustadas a 1×10^7 UFC/ml foram combinadas, e alíquotas de 100µl, contendo $0,33 \times 10^7$ UFC/ml de cada espécie foram adicionadas aos poços contendo os diferentes discos de titânio. Poços não inoculados foram utilizados como controle negativo, e poços inoculados contendo discos de titânio sem tratamento de prata e sílica na superfície foram considerados controle positivo (Grupo A).

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, com agitação leve (80 rpm) sob anaerobiose.

5.4 Estimativa de Biomassa de Biofilme

Após a incubação das placas, as bactérias não aderentes foram removidas por duas lavagens com solução salina fosfatada (PBS) e o biofilme corado pela adição de safranina a 0,4% durante 15 min. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada e o corante, extraído com etanol a 95% durante 15 min. O corante extraído foi quantificado medindo a absorbância a 490 nm, que representa a biomassa.

5.5 Determinação da Viabilidade Celular por UFC (Unidades Formadoras de Colônias)

A viabilidade de *P. gingivalis*, *S. gordonii* e *S. oralis* foi determinada nos biofilmes aderidos aos discos de titânio. As bactérias planctônicas foram removidas das placas e o biofilme suspenso em PBS. Após agitação em vortex por 10 segundos, a suspensão de biofilme foi diluída em série em PBS, e alíquotas de 25µl inoculadas pela técnica da gota, em triplicata em placas de ágar, seguindo-se incubação sob condições apropriadas, contagem de colônias e estimativa de UFC dos grupos teste e controle. Para os estreptococos, foi utilizado o ágar Mitis Salivarius, e incubação em microaerofilia. Para *P. gingivalis*, foram empregadas placas de ágar sangue com hemina e menadiona e incubação em anaerobiose. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas, sendo realizada a leitura. Foram contadas as colônias das gotas apresentando entre 5 e 50 colônias. Para os estreptococos foram contadas todas as colônias, visto que o meio era seletivo. Para *P. gingivalis*, todas as colônias oriundas dos biofilmes monoespecífico foram contadas; nos biofilmes multiespécies foram contadas apenas as colônias características desta espécie, amarronzadas com brilho de pérola. As figuras 5.3 e 5.4 demonstram a técnica explicitada acima com as colônias formadas por estreptococos em ágar Mitis e *P. gingivalis* em ágar TSA, respectivamente.

Figura 5.3 - Colônias em placa ágar Mitis

Fonte: O autor.

Figura 5.4 - Colônias em placa ágar TSA

Fonte: O autor.

Após a determinação do número de colônias por gota (contagem realizada na diluição em que as três gotas apresentavam de 5 a 50 colônias), foi feita a média da diluição para cada poço e calculado o número de unidades formadoras de colônias de cada disco (UFC/mL). Os resultados foram apresentados como a média da triplicata para cada condição.

5.6 Análise Estatística

Para determinar o efeito dos diferentes tratamentos sobre os discos de titânio sobre a biomassa foi calculada a média do valor de DO 490nm do controle negativo de cada grupo e subtraída do valor da triplicata de cada respectivo grupo, para eliminar a densidade óptica emitida pela prata dos revestimentos liberada. Os dados de biomassa e UFC/ml foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) de cada condição do ensaio. Após determinação da normalidade da distribuição dos dados, foi utilizado o teste ANOVA de sentido único seguido do teste de Comparação Múltipla de Tukey para análises estatísticas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$ (GraphPad Prism® Versão 6.0c - Software GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

6 RESULTADOS

Efeito dos diferentes revestimentos na superfície de titânio sobre o biofilme monoespécie de *P. gingivalis*

Não foi demonstrado qualquer efeito dos tratamentos do titânio sobre a biomassa do biofilme formado por *P. gingivalis* (Gráfico 6.1). No entanto, foi observado que o tratamento com duas camadas de prata coloidal favoreceu a formação de biofilme por *P. gingivalis* (grupo C), representado por maior número de UFC *P. gingivalis*/ml que os demais, como observado no gráfico 6.2.

Gráfico 6.1 apresenta a Biomassa (mensurada pela determinação da densidade óptica a 490nm) e número de *P. gingivalis* viáveis (UFC) (Gráfico 6.2) em discos de titânio com (B, C e D) e sem revestimento de sílica e prata (A). Ensaio realizado em microplacas de 96 poços, inoculados com 100 μ l de cultura ajustada a DO 600nm~1, correspondente a 1×10^7 UFC/poço, e mantidos a 37 °C em atmosfera anaeróbica sob agitação.

Gráfico 6.1 - Biomassa *P. gingivalis*

Fonte: O autor.

Gráfico 6.2 – UFC/ml *P. gingivalis*

κ Diferença em relação a A
 λ Diferença em relação a B
 π Diferença em relação a C
 θ Diferença em relação a D

Fonte: O autor.

Efeito dos diferentes revestimentos na superfície de titânio sobre o biofilme monoespécie de *S. oralis*

Não foram observadas diferenças na biomassa de *S. oralis* entre os grupos (Gráfico 6.3). No entanto, a determinação do número de viáveis (Gráfico 6.4) permitiu visualizar que o revestimento com uma camada de prata promoveu redução não significativa no número de viáveis de *S. oralis* (grupo B) em relação ao controle positivo (grupo A), enquanto os demais tratamentos promoveram aumento no número de organismos viáveis no biofilme.

Gráfico 6.3 Biomassa (densidade óptica mensurada a 490nm) e número de *S. oralis* viáveis (UFC) (Gráfico 6.4) em discos de titânio com revestimento de sílica e prata. Ensaio realizado em microplacas de 96 poços, inoculados com 100 μ l de cultura ajustada a OD 600nm~0,5, correspondente a 1×10^7 UFC/poço, e mantidos a 37 °C em atmosfera anaeróbica (85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) sob agitação.

Gráfico 6.3 - Biomassa *S.oralis*

Fonte: O autor.

Gráfico 6.4 – UFC/ml *S.oralis*

κ Diferença em relação a A
 λ Diferença em relação a B
 π Diferença em relação a C
 θ Diferença em relação a D

Fonte: O autor.

Efeito dos diferentes revestimentos na superfície de titânio sobre o biofilme monoespécie de *S. gordonii*

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na biomassa de biofilme de *S. gordonii* formada na superfície dos discos submetidos aos diferentes tratamentos (B, C e D) em relação ao controle (A) (Gráfico 6.5). Por outro lado, o tratamento com a prata coloidal dos discos de titânio promoveu forte redução no número de organismos viáveis desta espécie, como observado no gráfico 6.6.

Biomassa (Gráfico 6.5) (densidade óptica mensurada a 490nm) e número de *S. gordonii* viáveis (UFC) (Gráfico 6.6) em discos de titânio com revestimento de sílica e prata. Ensaio realizado em microplacas de 96 poços, inoculados com 100 μ l de cultura ajustada a OD 600nm~0,5, correspondente a 1×10^7 UFC/poço, e mantidos a 37°C em atmosfera anaeróbica (85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂) sob agitação.

Gráfico 6.5 - Biomassa *S.gordonii*

Fonte: O autor.

Gráfico 6.6 – UFC/ml *S.gordonii*

Fonte: O autor.

Efeito dos diferentes revestimentos na superfície de titânio sobre o biofilme Multiespécies

A biomassa do biofilme multiespécie (Gráfico 6.7) foi semelhante entre os grupos controle (A) e com uma ou duas camadas de prata coloidal (Grupos B e C). No entanto, foi observada maior quantidade de biomassa de biofilme nos discos do grupo D do que no controle positivo sem tratamento. Por outro lado, a análise do número de viáveis no biofilme multiespécies (Gráfico 6.8) mostrou que os diferentes tratamentos da superfície do titânio não exerceram efeito sobre o número de *P. gingivalis*. Por outro lado, o tratamento com duas camadas de prata coloidal (grupo C) favoreceu fortemente a formação de biofilme pelos estreptococos, quando este foi comparado ao controle positivo (A).

Gráfico 6.7 - Biomassa Multiespécie

θ Diferença em relação a D

Gráfico 6.8 – UFC/ml *P. gingivalis* e *S.oralis* e *S. gordonii* em ambiente Multiespécie

κ Diferença em relação a A
 λ Diferença em relação a B
 π Diferença em relação a C
 θ Diferença em relação a D

Fonte: O autor.

Fonte: O autor.

7 DISCUSSÃO

A relevância clínica e científica da manutenção da saúde dos tecidos peri-implantares, associados a falta de padronização de protocolos para o tratamento e o baixo nível de evidências a respeito do nível de sucesso e prognóstico, justificam a busca para alternativas preventivas a instalação da doença.

Apesar dos esforços científicos em busca de protocolos para um tratamento de sucesso, alguns autores já sugerem e recomendam a eficiência de ações não-cirúrgicas, necessidade de terapias de suportes e cuidados regulares individualizados (Suárez-López Del Amo et al., 2016; Heltz-Mayfield et al., 2018; Roccuzzo et al., 2018).

A prata foi escolhida por ser considerada biocompatível para os seres humanos em concentrações baixas e pelo fato de ser improvável que se desenvolva uma resistência dos microrganismos à prata (Rai et al., 2009).

No presente estudo visamos, em um ensaio *in vitro*, mimetizar algumas das condições da cavidade bucal, como a presença de filme condicionante formado por saliva em superfícies não descamativas como o titânio, simulando a película adquirida, e a formação de biofilme multiespécie, com colonizadores iniciais, que utilizam receptores da película para a sua adesão.

Assim, testamos a hipótese de que a aplicação de um revestimento com prata coloidal em titânio de componentes protéticos sobre implantes, poderia alterar a formação de biofilme por bactérias pioneiras, no caso a que apresentou melhor resultado antimicrobiano a *S. gordonii*, com enfoque preventivo, consequentemente diminuindo a adesão de bactérias colonizadoras tardias como a *P. gingivalis*.

Muitos esforços têm sido realizados visando obter materiais que previnam a formação de biofilmes (Juan et al., 2010; Vargas-Reus et al., 2012; Smanio, 2018). Entre estes esforços, destacam-se o uso de revestimentos, e polimentos de superfície, de maneira a prevenir a adesão microbiana, e/ou inibir a multiplicação dos microrganismos aderidos (Al-Ahmad et al., 2014). No presente estudo foi utilizada a

prata, um revestimento biocompatível (Kassab, 2015), que em estudos prévios promoveu a redução de *S. gordonii* (Smanio, 2018).

Pudemos observar, que ao contrário do esperado, o revestimento com prata, principalmente aquele de maior concentração (Grupo C), onde foram depositadas duas camadas do filme, permitiu maior formação de biofilme por *S. oralis* quando este foi comparado ao controle. O mesmo efeito foi observado em biofilme multiespécie, onde o grupo C apresentou maior número de estreptococos viáveis, representados por *S. oralis* e *S. gordonii*. Por outro lado, a adição do revestimento de prata coloidal em qualquer um dos grupos estudados resultou em menor número de *S. gordonii*, principalmente quando apenas uma camada de prata coloidal foi utilizada (grupo B). A quantidade pode ter sido maior somente para *S. oralis* e não para *Sg* em biofilme multiespécie e para saber se houve ou não diminuição, pode ser feito uma quantificação em qPCR para os futuros trabalhos.

Alguns estudos indicam que apesar de dispositivos recobertos com prata apresentarem reduzida colonização *in vivo*, estes revestimentos não resultam em inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. A ausência da atividade inibitória foi explicada por uma necessidade de tempo maior de contato dos discos com superfície tratada e o meio, permitindo uma maior troca íons de prata com o ambiente biológico (Khare et al., 2007). Portanto, as limitações dos modelos experimentais empregados têm que ser consideradas na interpretação dos resultados. Vilarrasa et al. (2018) também observaram que superfícies de titânio com prata e sem prata frente à cepas bacterianas da microbiota oral não promoveram diferenças entre os grupos avaliados.

Os dados sugerem que o efeito dos revestimentos foi seletivo, com atividade sobre *S. gordonii*, mas favorecendo *S. oralis*, e com pouca/nenhuma interferência sobre a formação de biofilme por *P. gingivalis*. Os resultados aqui apresentados são similares aos observados por Smanio (2018), onde os revestimentos com prata reduziram a formação de biofilme por *S. gordonii*. Deve-se, no entanto, enfatizar que apesar de ter sido empregada a mesma cepa bacteriana de *S. gordonii* e o mesmo tipo de revestimento (SiO_2) aplicado sobre titânio, os estudos diferem quanto a outros aspectos metodológicos. No presente estudo houve formação de película adquirida sobre os discos antes da inoculação das bactérias com intuito de simular o ambiente

bucal e aumentar o número de receptores facilitando a aderência bacteriana na superfície e os tipos de análises de biofilme.

Os resultados do presente estudo sugerem que em todos os ensaios analisados não houve redução da biomassa durante as 24 horas de incubação, o que poderia sugerir que a atividade da prata não promoveu uma interferência ou mesmo aumentou a adesão inicial de bactérias como *S. oralis*. O presente estudo não teve como objetivo avaliar a adesão inicial às superfícies, visto que a adesão por *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus oralis* ao esmalte condicionado por saliva já pode ser medida após incubação por 30 minutos, ocorrendo logo após a exposição das bactérias aos receptores expostos na película adquirida (Cheaib et al., 2015).

Por outro lado, a formação da película adquirida pode ter sido modificada pela presença dos íons metálicos uma vez que *S. oralis* e *S. gordonii* aderem mais ao esmalte com película adquirida (Cheaib et al., 2015).

O biofilme dental é resultado da adesão das bactérias ao filme condicionante adsorvido à superfície do dente, e sua proliferação e agregação aos organismos já aderidos. O filme condicionante é formado principalmente por glicoproteínas salivares que se absorvem às superfícies recém exposta na cavidade bucal, *in vivo*, a película adquirida é criada pela formação de camadas sucessivas de proteínas, inicialmente se ligando a superfície mineral dos dentes (cálcio e fosfato) e subsequentemente em interações proteína-proteína. Esta adsorção no dente recém limpo ocorre por meio de cargas positivas do esmalte, que permitem a adsorção de proteínas de cargas negativas (De Lorenzo, 2010). A colocação de um revestimento sobre a superfície do titânio como a prata coloidal iônica poderia aumentar a quantidade de cargas positivas na superfície, favorecendo a adsorção de proteínas carregadas negativamente que serviriam de receptores para organismos pioneiros do biofilme.

A presença de granulações/rugosidades nas superfícies após os diferentes tratamentos, podem ter interferido nos resultados, principalmente quando comparado o grupo C em que os discos apresentam duas camadas do revestimento, uma aplicada sobre a outra, uma vez que a adesão bacteriana é facilitada em superfícies com irregularidades.

Os dados sugerem que o tratamento com camada de prata coloidal promove a redução de *S. gordonii*. O *Streptococcus gordonii* é um dos colonizadores que iniciam a formação de placas e a capacidade de *P. gingivalis* de reconhecer e interagir especificamente com *S. gordonii*, por isso ela é considerada importante para a colonização por *P. gingivalis* da bolsa periodontal (Tribble et al., 2013). No entanto, o tratamento poderia favorecer a colonização por outros organismos como *S. oralis*.

A *S. gordonii* é uma das principais bactérias colonizadoras que iniciam a formação do biofilme oral (Loo et al., 2000; Rath et al., 2017; Toma et al., 2018).

Estudos realizados com prata em nanopartículas apresentados por Zheng et al. (2012), Rani et al. (2015), Farhadian et al. (2016), mostraram resultados mais eficientes. Entretanto, diferentemente do biomaterial idealizado em nosso estudo, estes estudos utilizaram a prata em nanopartículas e liberadas ao meio, promovendo maior contato e ação antimicrobiana. Se por um lado este poderia ser um fator de grande interesse, a liberação da prata ao meio poderia elevar seu efeito tóxico ao organismo, como relataram Carlson et al. (2008) e Park et al (2011), além de limitar o efeito temporal. Os revestimentos estudados apresentam-se aprisionados ao filme nanoestruturado, sem liberação ao meio e, assim, diminuindo seu potencial citotóxico (Kassab 2015) e aumentando o período de bioatividade, porém poderiam dificultar a interpretação do método utilizado inicialmente, que foi quantitativo, pois não apresenta zona de inibição.

A alta prevalência da doença e a dificuldade de bom prognóstico nos diversos protocolos de tratamento existentes nos leva a pensar que a prevenção é o melhor caminho. A intenção desse estudo foi desenvolver a aplicação de um filme com efeito duradouro, com menor toxicidade e menor custo, uma vez que a nanoestrutura requer menos prata para um efeito eficiente. Os bons resultados apresentados em bactérias pioneiras na colonização do biofilme incentivam a continuidade de estudos visando mimetizar as condições orais, estudos *in situ*, por períodos mais longos, avaliando sua possível interferência na instalação das mucosites peri-implantares.

8 CONCLUSÃO

Biomassa:

-Monoespécie: sem diferença significativa entre os grupos A (sem tratamento), B, C e D (com tratamento).

-Multiespécie: o grupo D (extra-polido e tratado) apresentou uma maior quantidade de biomassa quando comparado ao grupo A (sem tratamento).

UFC:

-Monoespécie nos grupos de *S. oralis*, *P. gingivalis* e multiespécie estreptococcus observou-se uma maior quantidade de viáveis no grupo C (tratado com o dobro de aplicação).

-Monoespécie de *S. gordonii* os grupos com revestimento de prata (B, C e D) apresentaram efeito antimicrobiano quando comparados ao grupo controle positivo A (sem tratamento), apresentando melhor resultado no grupo B (tratado com uma camada de aplicação).

Novos estudos serão necessários para se comprovar o potencial antibacteriano das superfícies de titânio com o revestimento de prata e sílica.

REFERÊNCIAS¹

Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):223-30. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.023.

Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. London: Quintessence; 1994. p. 365-9.

Ardekian L, Dodson TB. Complications associated with the placement of dental implants. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2003 May;15(2):243-9. doi: 10.1016/S1042-3699(03)00014-1.

Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1970 Jun;45(6):582-5. doi: 10.1097/00006534-197006000-00009.

Berglundh T, Lindhe J. Reosseointegração. In: Lindhe J, Karring T, Niklaus P, editores. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 1004-9.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*. 2008 Oct;112(43):13608-19. doi: 10.1021/jp712087m.

Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J*. 2007 Jun;4(2):114-22.

Charalampakis G, Rabe P, Leonhardt A, Dahlén G. A follow-up study of peri-implantitis cases after treatment. *J Clin Periodontol*. 2011 Sep;38(9):864-71. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01759.x.

¹De acordo com o Estilo Vancouver.

Cheaib Z, Rakmathulina E, Lussi A, Eick S. Impact of acquired pellicle modification on adhesion of early colonizers. *Caries Res.* 2015;49(6):626-32. doi: 10.1159/000442169.

Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2007 Apr;59(4):587-90. doi: 10.1093/jac/dkm006.

De Lorenzo JL. *Microbiologia, Ecologia e imunologia aplicadas à clínica odontológica.* São Paulo: Atheneu; 2010.

Demling RH, DeSanti L. The rate of restoration of body weight after burn injury, using the anabolic agent oxandrolone, is not age dependent. *Burns.* 2001 Feb;27(1):46-51. doi: 10.1016/S0305-4179(00)00064-4.

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

Esposito M, Hirsch J, Lekholm U, Thomsen P. Differential diagnosis and treatment strategies for biologic complications and failing oral implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):473-90.

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

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

Fox CL Jr, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974 Jun;5(6):582-8. doi: 10.1128/AAC.5.6.582.

French D, Grandin HM, Ofec R. Retrospective cohort study of 4,591 dental implants: Analysis of risk indicators for bone loss and prevalence of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *J Periodontol.* 2019 Jul;90(7):691-700. doi: 10.1002/JPER.18-0236.

Godoy-Gallardo M, Wang Z, Shen Y, Manero JM, Gil FJ, Rodriguez D, et al. Antibacterial coatings on titanium surfaces: a comparison study between in vitro single-species and multispecies biofilm. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Mar;7(10):5992-6001. doi:10.1021/acsami.5b00402

Greenstein G, Cavallaro Jr J, Tarnow D. Dental implants in the periodontal patient. *Dent Clin North Am*. 2010 Jan;54(1):113-28. doi: 10.1016/j.cden.2009.08.008.

Hashim D, Cionca N, Combescure C, Mombelli A. The diagnosis of peri- implantitis: a systematic review on the predictive value of bleeding on probing. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Oct;29 Suppl 16:276-293. doi: 10.1111/clr.13127.

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

Heitz-Mayfield LJ, Aaboe M, Araujo M, Carrión JB, Cavalcanti R, Cionca N, et al. Group 4 ITI Consensus Report: risks and biologic complications associated with implant dentistry. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Oct;29 Suppl 16:351-8. doi: 10.1111/clr.13307.

Heitz-Mayfield LJ, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29 Suppl:325-45. doi: 10.11607/jomi.2014suppl.g5.3.

Hsu SD, Cisar JO, Sandberg AL, Kilian M. Adhesive properties of viridans streptococcal species. *J Microbial Ecol Health Dis*. 1994;7(3):125-37. doi: 10.3109/08910609409141342.

Humphrey S. Implant maintenance. *Dent Clin North Am*. 2006;50:463-78. doi: 10.1016/j.cden.2006.03.002.

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;5:261-7. doi: 10.2147/ijn.s8810.

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*. 2008 Feb;19(2):119-30. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01453.x.

Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Apr;74(7):2171-8. doi: 10.1128/AEM.02001-07.

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

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

Khare MD, Bukhari SS, Swann A, Spiers P, McLaren I, Myers J. Reduction of catheter-related colonisation by the use of a silver zeolite-impregnated central vascular catheter in adult critical care. *J Infect*. 2007 Feb;54(2):146-50. doi: 10.1016/j.jinf.2006.03.002.

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.

Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002 Apr;11(4):125-30. doi: 10.12968/jowc.2002.11.4.26389.

Lee C-T, Huang Y-W, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017 Jul;62:1-12. doi: 10.1016/j.jdent.2017.04.011.

Lemos JA, Abranches J, Koo H, Marquis RE, Burne RA. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods Mol Biol*. 2010;666:87-102. doi: 10.1007/978-1-60761-820-1_7.

Lin CY, Chen Z, Pan WL, Wang HL. The effect of supportive care in preventing peri-implant diseases and implant loss: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2019 Aug;30(8):714-24. doi: 10.1111/clr.13496.

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

Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol.* 2000 Mar;182(5):1374-82. doi: 10.1128/JB.182.5.1374-1382.2000.

López-Cerero L. Infecciones relacionadas con los implantes dentarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Nov;26(9):589-92. doi: 10.1157/13128277.

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

Mombelli A, Décaillot 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, Hashim D, Cionca N. What is the impact of titanium particles and biocorrosion on implant survival and complications? A critical review. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Oct;29 Suppl 18:37-53. doi: 10.1111/clr.13305.

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

Moyer CA. A treatment of burns. *Trans Stud Coll Physicians Phila.* 1965 Oct;33(2):53-103.

Nascimento C, Nogueira Fernandes FHC, Teixeira W, Pedrazzi V. Iodoform and silver-coated abutments preventing bacterial leakage through the implant-abutment interfaces: in vitro analysis using molecular-based method. *Arch Oral Biol.* 2019 Sep;105:65-71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.06.009.

Paquette DW, Brodala N, Williams RC. Risk factors for endosseous dental implant failure. *Dent Clin North Am.* 2006 Jul;50(3):361-74. doi: 10.1016/j.cden.2006.05.002.

Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2011 Dec;32(36):9810-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.085.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009 Jan-Feb;27(1):76-83. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.

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

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

Rath H, Feng D, Neuweiler I, Stumpp NS, Nackenhorst U, Stiesch M. Biofilm formation by the oral pioneer colonizer *Streptococcus gordonii*: an experimental and numerical study. *FEMS Microbiol Ecol.* 2017 Mar;93(3). doi:10.1093/femsec/fix010.

Renvert S, Persson GR, Pirih FQ, Camargo PM. Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: case definitions and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S304-S312. doi: 10.1002/JPER.17-0588.

Roccuzzo M, Layton DM, Roccuzzo A, Heitz- Mayfield LJ. Clinical outcomes of peri-implantitis treatment and supportive care: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2018 Oct;29 Suppl 16:331-350. doi: 10.1111/clr.13287.

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

Russell AD. The destruction of bacterial spores. London: Academic Press; 1982.

Saulacic N, Schaller B. Prevalence of peri-implantitis in implants with turned and rough surfaces: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res.* 2019 Mar;10(1):e1. doi: 10.5037/jomr.2019.10101.

Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J. Healing of intrabonyperiimplantites defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostimt) or a bovine-derived xenograft (Bio-Osst) in combination with a collagen membrane (Bio-Gidet). A case series. *J Clin Periodontol.* 2006 Jul;33(7):491-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2006.00936.x.

Smanio JA. Ação antibacteriana de revestimentos nanoestruturados com partículas de prata aplicados em titânio frente a bactérias peri-implanto patogênicas. Análise in vitro [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018.

Sobolev A, Valkov A, Kossenko A, Wolicki I, Zinigrad M, Borodianskiy K. Bioactive coating on Ti alloy with high osseointegration and antibacterial Ag nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Oct 30;11(43):39534-44. doi: 10.1021/acsami.9b13849.

Steinemann SG. Titanium -- the material of choice? *Periodontol* 2000. 1998 Jun;17:7-21. 10.1111/j.1600-0757.1998.tb00119.x.

Suárez-López Del Amo F, Yu S-H, Wang H-L. Non-surgical therapy for peri-implant diseases: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res*. 2016 Sep;7(3):e13. doi: 10.5037/jomr.2016.7313.

Teodoro JS, Simões AM, Duarte FV, Rolo AP, Murdoch RC, Hussain SM, et al. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles in vitro: a mitochondrial perspective. *Toxicol In Vitro*. 2011 Apr;25(3):664-70. doi: 10.1016/j.tiv.2011.01.004.

Toma S, Behets C, Brex MC, Lasserre JF. In vitro comparison of the efficacy of peri-implantitis treatments on the removal and recolonization of *Streptococcus gordonii* biofilm on titanium disks. *Materials (Basel)*. 2018 Dec;11(12). pii: E2484. doi: 10.3390/ma11122484.

Tonetti MS, Chapple ILC, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S1-4. doi: 10.1111/jcpe.12382.

Tribble GD, Kerr JE, Wang BY. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. *Future Microbiol*. 2013 May;8(5):607-20. doi: 10.2217/fmb.13.30.

Triplett RG, Froberg U, Sykaras N, Woody RD. Implant materials, design, and surface topographies: their influence on osseointegration of dental implants. *J Long Term Eff Med Implants*. 2003;13(6):485-501. doi: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.v13.i6.50.

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. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.012.

Vilarrasa J, Delgado LM, Galofré M, Àlvarez G, Violant D, Manero JM, et al. In vitro evaluation of a multispecies oral biofilm over antibacterial coated titanium surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Nov;29(11):164. doi:10.1007/s10856-018-6168-8.

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. doi: 10.2147/IJN.S28450.

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x.

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas

Pesquisador: ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 92322118.8.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.745.575

Apresentação do Projeto:

A utilização de partículas de prata tem sido pesquisada na implantodontia com o objetivo de evitar a resistência ao tratamento com antibióticos bem como determinar novas formulações e novos materiais com propriedades efetivas na redução bacteriana.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficiência antimicrobiana do filme nanoestruturado com incorporado de prata aplicado ao titânio para buscar uma maneira de prevenir a colonização de bactérias peri-implanto-patogênicas através da contagem do número de colônias e pela atividade metabólica das bactérias pelo teste XTT.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No há riscos, pois será realizada apenas coleta de saliva dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os resultados dessa pesquisa poderá avaliar se os filmes nanoestruturados de prata e sílica em titânio causam morte das bactérias peri-implantopatogênicas, em laboratório

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram entregues os documentos necessários.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.745.575

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

É necessário corrigir os erros de digitação nas Informações Básicas do Projeto (digitadas no Plataforma Brasil).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1146787.pdf	22/06/2018 16:53:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_novo.pdf	22/06/2018 16:52:47	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_nova.pdf	22/06/2018 16:52:16	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_roberta_bueno_m_c.pdf	06/06/2018 00:37:57	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_lab.PDF	06/06/2018 00:35:55	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_clinica.PDF	06/06/2018 00:35:28	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito
Cronograma	cronograma_roberta.pdf	06/06/2018 00:34:35	ROBERTA BUENO MACHADO DE CAMPOS	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.745.575

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazovic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

Avaliação da ação antimicrobiana de filmes nanoestruturados com partículas de prata e sílica em titânio frente à bactérias peri-implanto-patogênicas.

Pesquisadora Responsável: Roberta Bueno Machado de Campos

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

Colaboradores: Prof. Dr. Marcelo Munhóes Romano, Prof. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer, Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, Dra. Karin Ishikawa, Raissa Monteiro Padalko

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Local: Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Contato: (11) 3091-8030 ou (11) 3091-7813

Av.Prof.Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”,
CEP:05508-900

Convite para participação voluntária:

Você está sendo convidado para participar, voluntariamente, ou seja, se você quiser, dessa pesquisa, e se em algum momento, desejar parar de participar, você tem total liberdade para retirar esse consentimento, sem prejuízo algum na continuidade do seu tratamento.

➤ **Objetivos do estudo:** Avaliar a ação em laboratório de filmes antimicrobianos de prata e sílica frente a bactérias peri-implanto-patogênicas (bactérias que causam inflamação dos tecidos em volta do implante).

➤ **Seleção de participantes:** Serão selecionados 3 participantes com saúde bucal normal, considerando-se os seguintes critérios de: - **inclusão:** saúde bucal normal; - **exclusão:** presença de qualquer condição sistêmica (condição de saúde) que possa afetar a saúde da boca como diabetes, gestantes ou lactantes, fumantes, que relatem o uso de antibióticos, e/ou enxaguantes bucais nos três meses anteriores à coleta do material de estudo. Será excluído também o/a participante que apresente alergia a substância utilizada na coleta de saliva: parafina.

➤ **Procedimentos:** As amostras de saliva serão obtidas pela manhã (8h- primeiro horário de atendimento da clínica) após um jejum durante a noite, durante o qual será solicitado ao (a) participante da pesquisa não beber nada até o momento da coleta, exceto água. Serão obtidos 5 mL de saliva total estimulada por mastigação de um pedaço equivalente a 1 grama de parafilme (filme de parafina plástica com papel). As

amostras serão mantidas em tubos em um recipiente com gelo. Após o procedimento será oferecido um jejum para o/a participante.

➤ **Riscos e desconfortos:** Os riscos oferecidos são mínimos, pois se trata de um procedimento pouco invasivo uma vez que o procedimento será de coleta de saliva em recipientes plásticos.

➤ **Assistência em virtude de danos decorrentes da pesquisa:** O (a) participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrente da pesquisa.

➤ **Ressarcimento:** As despesas que o (a) participante da pesquisa e seu (sua) acompanhante, exclusivamente, tiverem de locomoção e alimentação serão ressarcidos.

➤ **Indenização:** o (a) participante da pesquisa tem direito a indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

➤ **Tempo despendido:** O tempo necessário para a realização dessa pesquisa será de aproximadamente 10 (dez) minutos e após realizada o/a senhor (a) participante da pesquisa continuará o tratamento (pelo qual o (a) senhor (a) nos procurou) na clínica da faculdade.

➤ **Benefícios:** Não haverá benefícios diretos para o (a) participante da pesquisa, porém essa pesquisa permitirá avaliar se os filmes de prata e sílica aplicados em titânio (material em avaliação) causam morte de bactérias específicas em laboratório. Caso seja constatado que o filme é eficiente, futuramente, poderemos realizar a aplicação deste revestimento em componentes protéticos de implantes, diminuindo assim a chance de contaminação bacteriana ao redor de implantes.

➤ **Ajuda de custo:** Será fornecido ao (a) participante da pesquisa o dinheiro referente ao transporte até a faculdade assim como o jejum.

➤ **Garantia do sigilo da identidade do(a) participante da pesquisa:** As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. O(a) participante da pesquisa não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

➤ **Desistência:** O(a) participante da pesquisa tem o direito de desistir desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

➤ **Reutilização dos dados:** O(a) participante da pesquisa autoriza a utilização dos dados em outras pesquisas:

☐ NÃO autorizo a utilização de dados em outra pesquisa

☐ SIM autorizo a utilização de dados em outra pesquisa

Para utilizar os dados em outra pesquisa o(a) participante da pesquisa deseja ser consultado:

☐ NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa

☐ SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa

Se o/a senhor (a) participante da pesquisa tiver dúvidas quanto à ética da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia:

CEP-FOUSP - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Avenida Professor Lineu Prestes nº 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP – Telefone (11) 3091.7960 – e-mail cepfo@usp.br. O horário de atendimento ao público e pesquisadores é: de segunda a sexta-feira das 9 às 12h e de 14 às 16h (exceto em feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

“Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa”

São Paulo, ____ de ____ de ____

Participante da Pesquisa:

Nome: _____ Idade: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Pesquisadora responsável:

Roberta Bueno Machado de Campos

ESTE DOCUMENTO FOI ELABORADO EM DUAS VIAS, UMA PARA O(A) PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL E OUTRA PARA O(A) PARTICIPANTE DA PESQUISA. O(A) PARTICIPANTE DA PESQUISA RECEBEU UMA VIA DO DOCUMENTO, ASSINADA E RUBRICADA POR ELE(A) OU REPRESENTANTE LEGAL E PELO(A) PESQUISADOR(A).