

AÇÃO ANTIBACTERIANA DE ANTISSÉPTICOS FRENTE A BIOFILME FORMADO POR MICROCOSMO EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO

THAIANE SCHROEDER¹; GEORGIA VERARDI², LUCIANA RUSCHEL DOS SANTOS², TAMIRES TIMM MASKE³, MAXIMILIANO SÉRGIO CENCI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas thaianeschroeder@gmail.com

²Universidade de Passo Fundo

³Universidade Federal de Pelotas- tamirestmaske@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cencims@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Desde a época da idealização dos implantes osseointegrados, os implantes de titânio têm sido amplamente utilizados por apresentarem relativo sucesso a longo prazo. Por isso, a reabilitação oral dos pacientes edêntulos ou parcialmente edentados com implantes osseointegrados têm sido a forma mais comum de devolver a estética e a função mastigatória destes indivíduos (PELLIZZER et al., 2013).

A escolha do titânio como material para os implantes orais, se deve ao fato de suas características mecânicas, físico-químicas e bioquímicas, particularmente a tolerância tecidual e biocompatibilidade (BUNETEL et al., 2011). Ainda, apresenta boa solidez, resistência à corrosão e módulo de elasticidade similar ao osso (PIÉR-FRANCESCO et al., 2006). Porém, é de característica do titânio ter a sua superfície rugosa, e esta rugosidade apesar de melhorar a osseointegração, apresenta maior influência na adesão e colonização bacteriana (MEI et al., 2009).

A falta de higienização adequada e consequente acúmulo de colonização bacteriana ao redor destes implantes, têm sido reportado como a causa de mucosite ou peri-implantite, levando ao fracasso da reabilitação oral e consequente perda do implante (ROSENBERG et al., 1991).

Basicamente, para o tratamento de periodontite e peri-implantite faz-se o debridamento da superfície afetada, e, a terapia adicional com antibióticos e antissépticos tem sido proposta para remover biofilmes patogênicos e para melhorar o resultado de tratamentos não cirúrgicos. Desta forma, torna-se necessário o esclarecimento da potencial ação benéfica de produtos antissépticos. Portanto, o objetivo deste estudo, através da utilização da técnica de microcosmo, onde se simula o ambiente bucal com todas as suas alterações *in vitro*, estabelecer a real ação de agentes antissépticos, tais como Clorexidina, Cloramina T, Triclosan e Óleos essenciais frente ao biofilme e a adesão bacteriana na superfície de implantes de titânio.

2. METODOLOGIA

Delineamento experimental

Para este estudo, foi utilizado o modelo de biofilme *in vitro* descrito por VAN DE SANDE et al. (2011), no qual foram formados biofilmes em placas de 24 micropoços, a partir de inóculo de saliva humana de um voluntário portador de doença periodontal, sobre discos de titânio com quatro diferentes superfícies Lisa (L), Lisa e tratada com condicionamento ácido (LAA), Jateada com óxido de alumínio (J) e Jateada e tratada com condicionamento ácido (JAA). Utilizou-se como meio de crescimento o DMM - meio definido enriquecido com mucina. Os

biofilmes foram cultivados em anaerobiose, a 37°C, durante 48 horas. Após o período experimental, os espécimes de cada condição de superfície (n=9) foram tratados individualmente por imersão de 1 minuto em Clorexidina (CLX), Triclosan, Cloramina-T, Óleos essenciais e solução salina (controle). Os resultados foram obtidos através da quantificação em microorganismos totais (MT) biofilmes logo após tratamento.

Baseline - discos de titânio

Cento e oitenta discos de titânio (CPs) de diferentes superfícies (L, LAA, J, JAA) foram padronizados com 5.5mm de diâmetro e 2mm de espessura. Para cada condição de superfície (n=9), realizou-se a leitura prévia da rugosidade superficial utilizando um aparelho rugosímetro (SurrCode SE1200, calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/λc e λc 0,25 mm).

Coleta da saliva e formação de biofilme

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, 90 ml de saliva foi coletada de um voluntário, portador de doença periodontal, não fumante, que não fez uso de antibióticos no último mês e que suspendeu a higiene oral por 24 horas e a alimentação por 2 horas previamente a coleta. A saliva do paciente foi inoculada sobre os corpos de prova em placas de micropoços, em um volume de 400 µL por poço e armazenadas em estufa a 37°C por uma hora. Após esse tempo a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços e adicionado 1,8 mL de saliva artificial (meio DMM) que foi previamente preparada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em jarras de anaerobiose e mantidas em repouso. Os biofilmes foram formados de maneira independente sobre os CPs. Após o período de incubação, os CPs foram transferidos para uma nova placa contendo DMM fresco e mantidos em anaerobiose e em repouso por mais 24 horas.

Tratamentos

Após o período experimental os CPs foram transferidos para uma placa contendo 2 mL de cada antisséptico (Clorexidina 0,12% (Periogard - Colgate-Palmolive Company), Cloramina-T (Trihydral – Perland Farmacos Ltda), Triclosan (Plax - Colgate-Palmolive Company) e Óleos essenciais a base de eucaliptol, timol, salicilato de metilo e mentol (Listerine - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda) por 60 segundos. Para o grupo controle foi utilizado solução salina 0,9 % sob o mesmo protocolo.

Coleta de biofilme

Após o tratamento com as substâncias antissépticas, os CPs foram removidos da placa e lavados em 2ml de solução salina por 10s. Foram colocados em eppendorfs contendo 1mL de solução salina e mantidos em gelo.

Os CPs foram homogeneizados em um agitador de tubos e sonicados com potência de 30 W e amplitude de 5%, usando três pulsos de 10 segundos com intervalo de 5 segundos para obtenção de suspensão homogênea de biofilme. As suspensões foram diluídas em solução salina (10^{-6} até 10^{-7}) e imediatamente inoculadas em duplicata em Ágar Sangue para contagem de micro-organismos totais. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose a 37°C por 96 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por área de espécime (UFC/área).

Análise estatística

Os dados obtidos através da contagem das UFC foram analisados estatisticamente usando a análise de variância (ANOVA) de dois fatores com significância de 5%. E foi utilizado o teste de Tukey para comparar os dados entre os grupos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme tabela 1, observa-se que após 48 horas de formação de biofilme ocorreu a formação de biofilme em todas as superfícies de titânio, independente da rugosidade. Ainda, as contagens bacterianas foram maiores nas superfícies jateadas, jateadas e com condicionamento ácido e nas superfícies lisas do que nas superfícies lisas e tratadas com condicionamento ácido, mas sem diferença estatística. Neste contexto, POGNARINSON et al. (2007) sugeriu que o desenvolvimento da inflamação associada aos implantes independe da superfície do mesmo, mas sim da presença de placa bacteriana.

Tabela 1 – Contagens bacterianas nas superfícies de titânio com diferentes tratamentos.

Superfície	UFC/ mm ²	*
Jateada	0,31	A
Jateada e tratada com cond. ácido	0,31	A
Lisa	0,24	AB
Lisa e tratada com cond. Ácido	0,20	B

* Valores seguidos da mesma letra na coluna são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Com relação a ação dos diferentes grupos antissépticos, o grupo tratado com solução salina demonstrou maior contagem bacteriana do que os outros grupos testados. No entanto, sem diferença estatística para Triclosan e Clorexidina. Óleos essenciais e Cloramina T apresentaram menores e estatisticamente significantes contagens bacterianas quando comparado a solução salina. (Tabela 2).

Tabela 2 – Contagens bacterianas após ação dos antissépticos nas diferentes superfícies de titânio.

Antisséptico	UFC/ mm ²	*
Solução Salina	0,37	A
Triclosan	0,28	AB
Clorexidina	0,25	AB
Óleo essencial	0,22	B
Cloramina T	0,25	B

* Valores seguidos da mesma letra na coluna são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Destes, o Triclosan foi o produto antisséptico que obteve o resultado menos favorável na diminuição da contagem total dos micro-organismos (0,28 UFC/mm²). Por muito tempo a Clorexidina tem sido considerada como padrão ouro quando comparada com outros agentes químicos devido à sua capacidade de evitar a formação de biofilme dental (CHARLES, et al., 2004), porém, neste estudo demonstrou pouca efetividade na redução microbiana (0,25 UFC/mm²). A mesma quantidade de redução bacteriana 0,25 UFC/mm², foi encontrada no grupo tratado com Cloramina T, porém essa substância tem gerado bastante interesse, não só pela sua atividade, mas pelo fato de não apresentar efeitos colaterais indesejáveis. O grupo com óleos essenciais demonstrou a menor contagem bacteriana (0,22 UFC/mm²) do que os demais antissépticos, estes, em

estudos de longo prazo tem demonstrados serem eficientes e seguros (GONÇALVES et al., 2009).

4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que os antissépticos a base de Cloramina T e Óleos essenciais foram efetivos em reduzir a quantidade bacteriana ao redor dos implantes de titânio. E, que as diferentes superfícies não influenciaram de forma significativa no aumento da contagem bacteriana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUNETEL, L.; GUÉRIN, J.; AGNANI, G.; PIEL, S.; PINSARD, H.; CORBEL, J.C.; *et al.* *In vitro* study of the effect of titanium on *Porphyromonas gingivalis* in the presence of metronidazole and spiramycin. **Biomaterials**, v. 22, n. 22, p. 3067-72, 2001.

CHARLES, C.H.; MOSTLER, K.M.; BARTELS, L.L.; MANKODI, S.M. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 31, p. 878-84, 2004

GONÇALVES, E. M.; VASCONCELOS, A. M.; MAIA, C. R. N. P.; FREITAS, R. A.; CARLOS, M. X.; LIMA, D. L. F. Investigação dos ingredientes ativos presentes nos colutórios e dentifrícios encontrados no mercado brasileiro. **R. Periodontia**, v. 19, n. 1, 2009.

MEI, L.; BUSSCHER, H.; VAN DER MEI, H.C.; CHEN, Y.; VRIES, J.; REN, Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 117, p. 419-426, 2009.

PELLIZZER, E. P.; MAZZARO, J. V. Q.; SANTIAGO JR, J. F.; VERRI, F. R.; ALMEIDA, D. A.F. Reabilitação oral: prótese livre de metal, removível e implantes. Um caso de 12 anos de acompanhamento, **ImplantNews**, v. 10, n. 2, p. 183-190, 2013.

PIER-FRANCESCO, A.; ADAMS, R.J.; WATERS, M.G.J.; WILLIAMS, D.W. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an *in vitro* study. **Clin Oral Implants Res.**, v. 17, n. 6, p. 633-637, 2006.

PONGNARISORN, N.J.; GEMMELL, E.; TAN, A.E.; HENRY, P.J.; MARSHALL, R.I.; SEYMOUR G.J. Inflammation associated with implants with different surface types, v. 18, n. 1, p 114-25, 2007.

ROSENBERG, E.; TOROSIAN, J. P. Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. **Clinical of Oral Implants Research**, v. 2, p. 135-44, 1991.

VAN DE SANDE, F.H.; AZEVEDO, M.S.; LUND, R.G.; HUYSMANS, M.C.D.N.J.M.; CENCI, M.S. An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies, **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1057–1063, 2011.