

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Georgia Verardi

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

Passo Fundo

2014

Georgia Verardi

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação da profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos.

Passo Fundo

2014

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Georgia Verardi

Nasceu em 21 de setembro de 1988 em Passo Fundo/RS. Filha de Geovana Battisti Ferreira e Marcus Vinicius Verardi (*in memoriam*). Graduada em Odontologia pela Universidade de Passo Fundo (UPF) em janeiro de 2011, inscrita no CRO/SC sob nº 13460. No período em que cursava a graduação, foi aluna bolsista vinculada a projetos de pesquisa na área da Periodontia e extensão em outras áreas. Especialista em Saúde Coletiva e da Família pela Faculdade São Leopoldo Mandic. Atua como Cirurgiã-Dentista no SESC – Serviço Social do Comércio em Chapecó.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, uma força inexplicável, que sempre me guia no caminho certo, demonstrando uma alternativa melhor, por mais difícil que o momento aparente ser.

Aos meus pais, **Geovana e Marcus Vinicius** (*in memoriam*), inicialmente por me darem a vida, amor indescritível, por guiarem meus passos ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores, são inspiração constante na minha existência.

A minha irmã, **Antonella**, a qual o convívio só me mostrou que não há nada mais belo, sagrado e abençoado que o amor de irmãos, ao teu lado, sempre estarei.

Ao meu noivo, **Leandro**, amor da minha vida, agradeço pelo apoio e companheirismo de sempre e, principalmente, durante a fase experimental da pesquisa, pela confiança e motivação incondicional que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus desafios.

A minha avó, **Elvira**, a qual amo muito, pelo carinho e incentivo.

Ao meu avô, **Rubens**, pelo encorajamento a fim de prosseguir à elaboração deste trabalho.

Ao meu avô, **Heitor** (*in memoriam*), que tanto me ensinou, está sempre presente em minhas lembranças.

A família **Anchieta**, em nome do **Morvan** e da **Elisete**, meus pais de coração, agradeço pelos diálogos que manifestaram incentivos e conselhos que, sem dúvida, foram e serão imprescindíveis para minha vida pessoal e profissional.

A **Carolina**, minha cunhada e irmã do coração, agradeço por ser atualmente a minha companhia diária, por confiar em mim e me permitir exercitar a docência.

A todos da minha família que, de alguma forma, incentivaram-me na constante busca pelo conhecimento.

As minhas amigas **Ana Luisa**, **Joana** e **Elieges** que estiveram presentes em fases especiais em minha vida, agradeço pela amizade, conselhos e compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva.

Aos amigos **Bruno** e **Arielli** que nos receberam de braços abertos em Pelotas, onde dividimos momentos especiais.

Aos meus amigos e colegas de mestrado **Ana Carolina**, **Antônio**, **Diogo**, **Fernando**, **João**, **Luciano**, **Montalverne**, **Nicolau**, **Pablo** e **Roger** agradeço pela companhia nesses dois anos, pelas experiências divididas e pelo quanto aprendi com vocês.

A todos os meus professores, desde a minha alfabetizadora, até os professores da pós-graduação. Obrigada por me levarem à dúvida, à busca de novos conhecimentos. Agradeço-os imensamente pela contribuição de cada um na minha formação.

Ao agradecer a Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo pela minha graduação e mestrado, gostaria de agradecer inicialmente a profa. **Miriam Lago Magro** que foi a minha inspiradora na realização do mestrado para ingressar na carreira acadêmica e em seguida ao prof. Dr. **Álvaro Della Bona**, que me guiou nesta caminhada e me recebeu de braços abertos na pós-graduação. Além do Corpo Docente e Funcionários da faculdade, que fazem com que eu tanto me orgulhe de mencionar o nome desta instituição como de pisar em suas instalações.

Ao chegar neste nível de mestrado gostaria de agradecer a profa. Dra. **Luciana Ruschel dos Santos**, minha orientadora, sou imensamente grata por sua presença sempre tão afetuosa e incentivadora, o conhecimento iluminador e entusiasmo contagiante foram fundamentais para que este trabalho fosse efetuado com sucesso, além de suas valiosas contribuições para o meu crescimento intelectual e pessoal. Agradeço, também, pela compreensão de meus limites, auxiliando-me com sua imensa sabedoria de forma imprescindível para a elaboração deste trabalho. É mais do que um privilégio ser tua orientada.

Ao prof. Dr. **Maximiliano Cenci**, a mestranda **Tamires Maske**, as meninas do laboratório e a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (**UFPEL**), agradeço pelos ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receberem em seu laboratório de portas abertas e sempre estarem à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Realmente, deu certo, e vocês são parte essencial desse trabalho.

Aos profs. **Florindo Castoldi** e **Márcia Borba**, que prontamente auxiliaram na estatística e interpretação dos resultados da pesquisa.

A empresa **Titanium Fix**, a qual doou os corpos de prova de titânio para a realização do experimento.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse a esse nível, o meu eterno agradecimento!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Biomateriais.....	30
2.2 Biofilme oral e microbiota peri-implantar.....	32
2.3 Mucosite e peri-implantite.....	35
2.4 Superfície dos implantes de titânio.....	37
2.5 Antissépticos.....	39
2.6 Sistema de cultura de placa em boca artificial – Técnica do microcosmo.....	44
3. PROPOSIÇÃO.....	47

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Corpos de prova de titânio.....	49
4.1.1 Verificação da rugosidade superficial.....	49
4.2 Desenvolvimento de biofilme por microcosmo.....	50
4.3 Coleta e processamento da saliva.....	52
4.4 Obtenção de saliva artificial (meio DMM).....	52
4.5 Desenvolvimento do biofilme.....	53
4.6 Tratamento com substâncias antissépticas.....	55
4.7 Quantificação do biofilme.....	55
4.8 Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Rugosidade.....	59
5.2 Contagens de micro-organismos totais.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE.....	87
ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média da rugosidade nas diferentes superfícies de titânio.....	59
Tabela 2 – Contagens bacterianas nas superfícies de titânio com diferentes tratamentos.....	60
Tabela 3 – Contagens bacterianas após ação dos antissépticos nas diferentes superfícies de titânio.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição dos corpos de prova, tratamentos de superfície e substâncias antissépticas utilizados no experimento..... 51

Figura 2 – A – Inoculação da saliva sobre os corpos de prova de titânio; B – Aspiração da saliva; C – Adição de saliva artificial (meio DMM); D – Placas em jarras de anaerobiose (Anaerobac ®); E – Biofilme formado sobre os corpos de prova; F – corpos de prova sendo transferidos, com pinça estéril para uma nova placa contendo DMM..... 54

Figura 3 – A – Remoção dos corpos de prova das placas de incubação, colocados em tubos contendo 1 mL de solução salina; B – Corpos de prova sendo submetidos a agitação em vortex; C - Corpos de prova sonicados para obtenção de suspensão homogênea de biofilme..... 56

Figura 4 – A – Suspensões bacterianas inoculadas em duplicata em Agar sangue; B – Placas incubadas em condições de anaerobiose (Anaerobac®); C/D – Placa após 96 h de incubação para leitura das unidades formadoras de colônia..... 57

Figura 5 – Contagens bacterianas após ação dos diferentes antissépticos nas diferentes superfícies de titânio..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
CLX	Clorexidina
CP	Corpo de prova
CPs	Corpos de prova
CRO/RS	Conselho Regional de Odontologia do Rio Grande do Sul
CT	Cloramina T
DMM	Meio Definido enriquecido com Mucina
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
<i>et al.</i>	E outros
g/L	Grama por litro
h	Horas
ISO	Organização Internacional de Normalização
mL	Mililitro

mm/ λ c	Milímetro por comprimento de cut-off
mmol/l	Milimol por litro
n°	Número
NBR	Norma Brasileira
nm	Nanômetro
OE	Óleos essenciais
pH	Potencial Hidrogeniônico
Prof.	Professor
Profa.	Professora
Profs.	Professores
Ra	Parâmetro de rugosidade média
s	Segundos
SESC	Serviço Social do Comércio
SJ	Superfície jateada
SJAAc	Superfície jateada e tratada com condicionamento ácido
SL	Superfície lisa
SLA	Sand-Blasted Larg Grit Acid Etched (superfície jateada por grãos de areia de grana grossa e atacada por ácido)
SLAAc	Superfície lisa e tratada com condicionamento ácido
SPH	Spray Plasma de Hidroxiapatita
SS	Solução salina
SSL	Sinterização Seletiva a Laser
STP	Spray Plasma de Titânio

Ti	Titânio
TiO ₂	Óxido de Titânio
TRI	Triclosan
TSB	Caldo Trípico de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UPF	Universidade de Passo Fundo
W	Watts
μL	Micro litro
μm	Micrômetros
°C	Graus Celcius
%	Porcento
®	Marca registrada
λc	Comprimento de cutt-off

RESUMO

A colonização bacteriana ao redor dos implantes leva ao desenvolvimento de mucosite ou peri-implantite e consequente perda do implante osseointegrado. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de quatro antissépticos frente à biofilme formado por microcosmo em superfícies de titânio. Os biofilmes foram formados em placas de 24 micropoços sobre discos de titânio com diferentes superfícies (lisa - SL, lisa e tratada com condicionamento ácido - SLAAc, jateada - SJ, jateada e tratada com condicionamento ácido - SJAAc) a partir do inóculo de saliva de um voluntário portador de doença periodontal. Utilizou-se para cultivo bacteriano o meio enriquecido com mucina (DMM). Os biofilmes foram cultivados em anaerobiose a 37°C por 48 h. Após este período os espécimes de cada condição de superfície (n=9) foram tratados individualmente por imersão por 1 min em substâncias antissépticas (clorexidina - CLX, cloramina T - CT, triclosan - TRI ou óleos essenciais - OE) e solução salina para controle negativo. Os resultados foram obtidos através da quantificação dos micro-organismos totais em placas de Agar sangue logo após os tratamentos, foram utilizados os testes de Anova e Tukey para análise estatística. Os grupos SJ, SJAAc e SL apresentaram valores mais altos de micro-organismos totais e estatisticamente semelhantes, SLAAc obteve o menor valor de contagem e estatisticamente semelhante a SL. O grupo SS obteve maior valor de contagem do que OE e CT, não houve diferença estatística entre as substâncias antissépticas. Diferentes antissépticos reduzem a quantificação bacteriana ao redor de implantes, existe diferença significativa entre as superfícies de titânio e os produtos antissépticos, porém não foi encontrada significância estatística para a interação entre esses fatores.

Palavras-chave: Peri-implantite, biofilme, microcosmo e antisséptico.

ABSTRACT¹

Bacterial colonization around the implants leads to the development of mucositis or peri-implantitis and consequent loss of osseointegrated implant. The aim of this study was to evaluate the effect of four antiseptics facing microcosm biofilm formed by titanium surfaces. Biofilms were formed in 24 microwell plates on titanium disks with different surfaces (smooth - SL, smooth and treated with acid attack - SLAAC, sandblasted - SJ, sandblasted and treated with acid attack - SJAAC) from the saliva of a volunteer patient with periodontal disease. It was used for the bacterial culture device supplemented with mucin (DMM). Biofilms were grown anaerobically at 37 ° C for 48 h. After this period samples of each surface condition (n = 9) were treated individually by immersion for 1 min in antiseptic substances (chlorhexidine - CLX, chloramine T - TC, triclosan - TRI oils or essences - OE) and saline solution for negative control. The results were obtained by quantification of micro-organisms on blood agar plates after the treatments, tests and ANOVA and Tukey were used for statistical analysis. SJ, SJAAC and SL groups showed higher values of total and statistically similar micro-organisms, SLAAC got the smallest count value and statistically similar to SL. The SS group had a higher count value than OE and CT, there was no statistical difference between the

¹ Antiseptic antibacterial action face to biofilm microcosm surfaces by titanium

antiseptic chemicals. Different antiseptics reduce the bacterial count around implants, there is significant difference between the titanium surfaces and antiseptic products, although no statistical significance was found for the interaction between these factors.

Keywords: Peri-implantitis, biofilm, microcosm and antiseptic.

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação oral através de implantes osseointegrados vem sendo a forma mais corriqueira de devolver estética e função mastigatória aos pacientes edêntulos ou parcialmente desdentados (Bastos & Accetturi, 2011; Moura *et al.*, 2012; Pellizzer *et al.*, 2013). Atualmente se tem um grande índice de sucesso a longo prazo, porém sempre teremos casos de colonização bacteriana ao redor destes implantes, devido à falta de higienização adequada, cujas bactérias potencialmente agressivas desenvolvem mucosite ou peri-implantite, levando ao fracasso dessa reabilitação e consequente perda do implante (Rosenberg & Torosian, 1991; Hass *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2010).

Descrita como uma doença inflamatória que afeta os tecidos circunjacentes ao implante osseointegrado, a peri-implantite resulta em perda óssea (Quirynen & Listgarten, 1990; Yoshinari *et al.*, 2001; Píer-Francesco *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2007) e consequente perda do implante (Grössner-Schreiber *et al.*, 2009; Gonçalves, *et al.*, 2009), sendo que a adesão bacteriana e o acúmulo de biofilme são consideradas as principais causas da patogênese dessa doença (Bürgers *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

Diversos autores concluem que as bactérias presentes em implantes são as mesmas que ocorrem em dentes naturais e passam pelos mesmos trâmites de adsorção e acúmulo de biofilme bacteriano, mostrando que a colonização e a sucessão bacteriana ao redor dos implantes se dão da mesma maneira que a gengivite e a periodontite (Shibli *et al.*, 2002; Van Der Weijden *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2006).

Há uma variedade de tratamento de superfície disponível para implantes osseointegráveis, eles variam em sua técnica de obtenção, rugosidade, características superficiais físicas e químicas. As superfícies dos implantes de titânio podem ser classificadas em cinco grupos, dependendo do tratamento que recebem: usinadas, macrotextrurizadas, microtetrurizadas, nanotetrurizadas ou biomiméticas (Carvalho *et al.*, 2009).

Visto que a peri-implantite é a principal complicação de uma reabilitação oral através de implante dentário, torna-se necessário o esclarecimento referente a potencial ação benéfica que os produtos com ação antisséptica, tais como Clorexidina, Cloramina T, Triclosan e Óleos essenciais, podem desenvolver em relação ao biofilme e adesão bacteriana. Para avaliar a ação dessas substâncias foi utilizada a técnica do microcosmo, onde simula-se *in vitro* o ambiente bucal com todas suas características e em especial, casos específicos de alteração das condições periodontais, tais como a peri-implantite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As estratégias terapêuticas não cirúrgicas propostas para o tratamento das infecções peri-implantares são baseadas em evidências disponíveis para os tratamentos de periodontite, em resultados clínicos ou em achados empíricos, mas não em resultados científicos (Mombelli & Lang, 1992; Renvert *et al.*, 2008).

O elemento básico e comum para tratar periodontite e peri-implantites parece ser o debridamento da superfície afetada (cimento e implante dentário, respectivamente) (Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008). As superfícies dos implantes modernos são altamente microestruturadas e macroestruturadas para aumentar a osteointegração. Porém, tais superfícies rugosas facilitam o início da adesão microbiana e a formação dos biofilmes complexos e fazem com que o debridamento das superfícies dos implantes seja mais complicado (Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2010).

A terapia adicional com antibióticos e antissépticos tem sido proposta para remover biofilmes patogênicos e para melhorar o resultado de tratamentos não cirúrgicos (Roos-Jansaker *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2007; Lindhe & Meyle 2008; Renvert *et al.*, 2008).

Muitos estudos têm reportado o potencial curador dos defeitos peri-implantares depois da supressão do biofilme microbiano peri-

implantar. Além disso, as recomendações de tratamento continuam não esclarecidas e o agente químico mais apropriado para desinfetar o implante ainda não foi encontrado (Klinge *et al.*, 2002; Roos-Jansaker *et al.*, 2003; Lindhe & Meyle 2008; Renvert *et al.*, 2008).

Os efeitos do hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, digluconato de clorexidina, ácido cítrico, óleos essenciais e triclosan em biofilmes *in vivo* foram investigados em quatro indivíduos saudáveis. Os autores concluíram que todos os antissépticos testados mostraram efeitos bactericidas frente adesão de micro-organismos, mas variações interindivíduos foram notadas, o que dificultou a interpretação confiável dos resultados. Outra adversidade do estudo foi que os indivíduos investigados eram periodontalmente saudáveis com “biofilmes orais regulares” (Gosau *et al.*, 2010). Entretanto, a microbiota presente em volta de dentes ou implantes sob condições saudáveis apresentava diferenças qualitativas e quantitativas às condições encontradas em sítios afetados por peri-implantites ou periodontites (Leonhardt *et al.*, 1999; Leonhardt *et al.*, 2003).

O consenso parece ser de que o uso de agentes antissépticos preventivos deve ser um complemento e não um substituto para os métodos mecânicos convencionais, de modo a complementar e tentar superar as deficiências nos hábitos mecânicos de higiene oral (Lindhe *et al.*, 2005).

2.1 Biomateriais

Branemark e colaboradores, em 1960, idealizaram os implantes osseointegrados, porém somente em 1977 houve a publicação do

primeiro trabalho clínico comprovando a osseointegração (Lorenzo, 2004). Desde essa época os implantes de titânio têm sido amplamente utilizados na substituição de elementos dentários com relativo sucesso em longo prazo (Ong *et al.*, 1992; Takanashi *et al.*, 2004; Shibli *et al.*, 2008; Pye *et al.*, 2009).

As áreas médicas e odontológicas frequentemente utilizam os biomaterias, contudo a formação de biofilme em sua superfície é um problema corriqueiro, da mesma forma que ocorre nos dentes permanentes (Mabboux *et al.*, 2004). O desenvolvimento de biomateriais que possibilitem a osteointegração e limitem a colonização bacteriana pode ser uma solução para essa problemática (Drake *et al.*, 1999).

O material de escolha para implantes orais é o titânio, devido as suas características mecânicas, físico-químicas e bioquímicas, particularmente a tolerância tecidual e biocompatibilidade (Bunetel *et al.*, 2001; Subramani *et al.*, 2009). Além de apresentar boa solidez, resistência à corrosão e módulo de elasticidade similar ao osso (Pier-Francesco *et al.*, 2006).

Faz-se necessário que a superfície do implante que fica exposta ao meio oral tenha propriedades que inibam a aderência bacteriana, contudo estudos *in vivo* e *in vitro* têm relatado que o controle da placa seria mais importante do que o tratamento das superfícies (Yoshinari *et al.*, 2000; Yoshinari *et al.*, 2001).

A rugosidade é uma das características da superfície do titânio que apresenta maior influência no que tange a adesão bacteriana inicial (Mei *et al.*, 2009). A adesão e a colonização por bactérias em superfícies sólidas representam um fator primordial na formação do biofilme, sendo que essas podem diferir de acordo com os diferentes substratos

existentes na cavidade oral. Assim, pode-se considerar que diferentes substratos apresentem diferentes biofilmes, e que o controle da formação desses é dependente do controle da adesão inicial, o que é inerente à superfície (Shemesh *et al.*, 2010).

Uma superfície rugosa melhora a osseointegração, porém essa mesma característica pode aumentar a adesão bacteriana. Nesse sentido, a indústria tem produzido implantes que apresentam tratamento de superfície somente nas porções média e apical e lisa na região cervical visando diminuir o risco de peri-implantite. O controle da peri-implantite deve ocorrer pelo controle da formação de biofilme na superfície lisa (colonização inicial), uma vez que esta, depois de instalada, resultará na formação de bolsa periodontal e uma colonização secundária da superfície rugosa de difícil controle (Mombelli, 2002).

2.2 Biofilme oral e microbiota peri-implantar

O conhecimento sobre a placa dental evoluiu significativamente desde a primeira observação, por Van Leewenhoek, em 1684, quando descrita apenas como animáculos raspados da língua e da superfície dos dentes (Wilderer *et al.*, 1989).

A formação do biofilme na cavidade oral é um processo de vários estágios. A formação inicial da película salivar, que é um filme protéico acelular sobre a superfície do dente, é seguida pela adsorção de células bacterianas para a película salivar ou película adquirida. Esse processo requer adesinas específicas, geralmente lectinas, presentes na superfície da célula bacteriana, e é seguido pelo acúmulo cultivo-dependente pela adesão célula a célula (coagregação ou coadesão) para

formar grupos de células em várias camadas na matriz polímera. Inicialmente, a adesão é reversível e mediada por forças eletrostáticas e hidrofóbicas. O segundo passo é uma adesão irreversível causada por uma alteração tempo-dependente para um estado de ligação por afinidade maior, que envolve adesinas múltiplas sobre a superfície bacteriana e a matriz polímera. A divisão das células bacterianas aderidas produz microcolônias. O crescimento confluyente resulta na formação do biofilme, que aumenta sua complexidade com o tempo (Subramani *et al.*, 2009).

Fürst *et al.* (2007) afirmam que deve existir diferença na colonização da superfície dentária e nos implantes, discordando de Bauman *et al.* (1992) que relatam que o biofilme se desenvolve mais em dentes naturais do que na superfície dos implantes, sugerindo que talvez essas superfícies possuíssem propriedades antimicrobianas.

Marcantonio *et al.* (2011) afirmam que em cerca de 10 dias a composição do biofilme ao redor dos implantes torna-se similar ao do biofilme em dentes e permanece estável em condições de saúde. A formação do biofilme é influenciada pelas propriedades da superfície dos implantes, tais como composição química, lisura superficial e energia livre de superfície. Este biofilme é composto predominantemente de cocos Gram-positivos facultativos, com baixo número de espiroquetas e bastonetes, mostrando que as bactérias presentes na cavidade bucal podem ter um impacto importante na formação do biofilme em implantes.

No estudo realizado por Koyanagi *et al.* (2010), foram avaliados sítios acometidos por peri-implantite, periodontite e sítios com saúde periodontal através da clonagem do gene *16S rRNA* para

determinar a diversidade bacteriana nesses sítios. Participaram do estudo três indivíduos apresentando sítios com peri-implantite, implante saudável e periodontite, dos quais foram coletadas amostras subgengivais com cones de papel. Um total de nove sítios foram coletados, dos quais foram obtidos 355 sequências que revelaram a presença de 112 espécies. A microbiota da peri-implantite incluiu, primariamente, espécies Gram-negativas anaeróbias e apresentou uma composição mais diversa do que a dos sítios de periodontite e saúde peri-implantar. Foi detectado nos sítios com peri-implantite os filos *Chloroflexi*, *Tenericutes* e *Synergistetes*, além de *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Solobacterium moorei*. *Fusobacterium nucleatum* foi identificado em todos os sítios com peri-implantite e *Granulicatella adiacens* em dois terços desses sítios, sendo essas duas espécies também encontradas nos sítios com doença periodontal. Bactérias previamente estabelecidas como periodontopatogênicas demonstraram uma baixa prevalência nos sítios com doença peri-implantar, enquanto outras bactérias foram identificadas como candidatas a patógenos na peri-implantite. Em estudo similar Kumar *et al.* (2012) apontam que os dados de sua pesquisa indicam que embora certas bactérias ligadas à doença periodontal possam ser encontradas na peri-implantite, o perfil microbiano das comunidades peri-implantares diferem do perfil subgengival de várias maneiras.

O conceito de que determinados micro-organismos são responsáveis pela gravidade e ocorrência da doença periodontal levou ao desenvolvimento da teoria do biofilme dentário específico. Dessa forma, não basta a presença do biofilme dentário em contato com o periodonto e

sim são necessárias bactérias periodontopatogênicas no biofilme (Jorge, 2007).

O biofilme supragengival simples de uma gengiva saudável está relacionado com poucas camadas de *Streptococcus*, bacilos Gram-positivos e alguns cocos Gram-negativos. Essas bactérias são colonizadoras pioneiras que sobrevivem em ambientes aeróbios. Já nas gengivites a placa se torna mais organizada com predominância de bacilos anaeróbios Gram-negativos e espiroquetas. As espécies envolvidas no desenvolvimento do biofilme podem variar dependendo da localização e das condições do ambiente, mas o esquema da colonização segue um mesmo padrão (Stingu *et al.*, 2008).

É denominado biofilme subgengival aquele que se forma a partir da migração apical do biofilme abaixo da linha gengival e de menor espessura devido às restrições anatômicas. Podem ser identificadas três porções: uma aderida, associada ao elemento dentário; uma não aderida, associada ao epitélio do sulco gengival; e uma intermediária que é frouxamente organizada e os micro-organismos parecem flutuar no exsudato gengival. A matriz do biofilme subgengival é menos densa e cocos, bastonetes e filamentos são numerosos. Espiroquetas de diferentes dimensões são encontradas em biofilme de dentes periodontalmente comprometidos (Jorge, 2007).

2.3 Mucosite e peri-implantite

A osseointegração é definida como um processo pelo qual ocorre a fixação rígida, clínica e assintomática de material aloplástico no osso durante o carregamento funcional. Do ponto de vista histológico é

geralmente interpretada como aposição íntima do tecido ósseo ao implante sem interferência de tecido fibroso. O estabelecimento de uma vedação, constituída de tecido mucoso, em torno do pilar do implante é importante para proteger o corpo do implante das comunidades microbianas da cavidade oral (Norowski & Bumgardner, 2008).

A manutenção da osseointegração depende, entre outros fatores, da preservação dos tecidos marginais. Complicações biológicas em implantes em função, como a mucosite peri-implantar têm sido descritas e evidências sugerem um papel primário do biofilme bacteriano na etiologia destas doenças (Silva *et al.*, 2007).

Mucosite peri-implantar é caracterizada como uma reação inflamatória reversível nos tecidos moles em torno de um implante (Norowski & Bumgardner, 2008). A lesão na mucosa peri-implantar apresenta um número inferior de fibroblastos quando comparada a lesão em gengiva. Essa pequena quantidade de fibroblastos parece simplesmente não ser capaz de produzir uma quantidade suficiente de colágeno e matriz durante a fase de reparo, resultando em propagação e disseminação do infiltrado celular inflamatório na mucosa peri-implantar (Lindhe *et al.*, 2005).

Peri-implantite pode ser definida como um processo inflamatório que acomete os tecidos moles e duros, vizinhos ao implante, resultando em formação de bolsa peri-implantar e rápida perda óssea, tendo como consequência a perda de suporte e estabilidade do implante após a colocação de carga sobre o mesmo, além de poder estar associado a sangramento e supuração (Mombelli, 2002; Norowski & Bumgardner, 2008). Em alguns casos o implante pode permanecer estável por longos períodos (Lindhe *et al.*, 2005).

2.4 Superfície dos implantes de titânio

As superfícies dos implantes de titânio podem ser classificadas em cinco grupo: usinadas, macrotexturizadas, microtexturizadas, nanotexturizadas ou biomiméticas (Carvalho *et al.*, 2009).

As superfícies usinadas não apresentam características de completa lisura superficial devido à presença de microrranhuras superficiais resultante do processo de corte ou usinagem da peça metálica (Teixeira, 2001). Os implantes usinados apresentam valor médio de rugosidade de superfície entre 0,53 e 0,96 μm (Sykaras *et al.*, 2000).

As superfícies macrotexturizadas são formadas por um processo de texturização da superfície utilizando spray de plasma de titânio (STP), com espessuras que variam de 10 a 40 μm (Jensen *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 2000), ou spray de plasma de hidroxiapatita (SPH), que a espessura varia de 50 a 70 μm (Buser *et al.*, 1991; London *et al.*, 2002). O jateamento com partículas de vários diâmetros é outro método, frequentemente, usado para macrotexturização superficial (Pilliar, 1998), sendo que a superfície do implante é bombardeada por partículas, como silício, óxido de alumínio, óxido de titânio e vidro, criando ranhuras irregulares, com rugosidade média variando entre 1,20 e 2,20 μm (Gotfredsen & Karlsson, 2001; Ivanoff *et al.* 2001).

As superfícies microtexturizadas recebem tratamento com ataque ácido (Hsu *et al.*, 2007; Klollevoid *et al.*, 1997), tendo 1,30 μm de rugosidade média da superfície (Pilliar, 1998; Sykaras *et al.*, 2000; Teixeira, 2001). Podem ocorrer superfícies que combinem macrotexturização por partículas de óxido de alumínio e

microtexturização causada pelo ataque ácido hidrocloreídrico ou sulfúrico, sendo então conhecidas como a superfície SLA (Gahlert *et al.*, 2007). A sinterização seletiva a laser (SSL) é um processo de tratamento da superfície do implante que usa laser para produzir uma superfície rugosa à osteointegração (Traini *et al.*, 2008).

Segundo Carvalho *et al.* (2009), uma superfície nanotexturizada pode ser obtida através de um aumento controlado da camada de óxido de titânio (TiO₂), incluindo alterações nas propriedades específicas, na espessura, rugosidade e textura do óxido. O método de obtenção da superfície de óxido porosa é eletroquímico, chamado de oxidação anódica. A média de diâmetro dos poros fica em torno de 1 a 2 µm. Esse tipo de superfície exibe uma topografia única, sem características agudas e com boa capacidade para reter líquidos e tecido ósseo. A camada de óxido é fortemente aderente ao metal subjacente, com ótima resistência ao desgaste, o que indica risco mínimo de liberação de partículas durante a inserção do implante.

Nas superfícies biomiméticas camadas de fosfato de cálcio sob condições fisiológicas de temperatura e pH são integradas a estrutura do material e então liberadas gradualmente, sendo um sistema de liberação lento de agentes osteogênicos para o sítio de implantação. Uma vantagem do processo de cobertura biomimética é que moléculas biologicamente ativas, como agentes osteogênicos, podem ser precipitadas com componentes inorgânicos para formarem uma matriz com propriedades tanto osteoindutora quanto osteocondutora (Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002).

2.5 Antissépticos

A clorexidina foi sintetizada na década de 1940 e inicialmente utilizada como antisséptico para tratamento de lesões cutâneas, sendo somente comercializada para fins odontológicos na década de 1970 (Campos *et al.*, 2012). É citada em muitos estudos como a solução antimicrobiana mais eficiente, sendo reconhecida como o padrão ouro (Addy *et al.*, 1994; Bürgers *et al.*, 2012). Sendo considerada uma bisbiguanida que possui alta substantividade intraoral, tendo a capacidade de se ligar de forma reversível aos tecidos orais e ser liberada lentamente após a realização do bochecho, permitindo um efeito antimicrobiano sustentado (Kornman, 1986).

A clorexidina tem natureza dicatiônica: uma extremidade da molécula age na membrana celular das bactérias, causando sua lise ou precipitação de seus componentes intracelulares e a outra extremidade se liga as mucinas salivares, reduzindo a formação da película adquirida e, consequentemente, inibindo a colonização do biofilme (Fine *et al.*, 1996). É considerada um agente bactericida e bacteriostático de amplo espectro de ação, agindo em bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (Quirynen *et al.*, 2001). Tem se mostrado um potente inibidor da formação de placa bacteriana, além de melhorar a condição gengival ao redor dos dentes naturais e dos implantes (Bürgers *et al.*, 2012).

Por ser um composto dicatiônico, a clorexidina é quimicamente incompatível com substâncias aniônicas, podendo ser inativada. Devido a presença de fluoretos e de saponáceos nos dentifrícios, a clorexidina deverá ser administrada no mínimo 30 minutos após a escovação para

que se reduza a inativação da clorexidina em contato com os ânions do dentífrico, conservando-se assim a ação desejada (Kolahi & Soolari, 2006).

Resultados encontrados na literatura mostram que pacientes que se abstiveram de controle mecânico do biofilme e utilizaram como controle químico bochecho de clorexidina duas vezes ao dia tiveram menor formação de biofilme do que aqueles que utilizaram um tipo comercial de óleo essencial sob o mesmo protocolo (Sekino & Ramberg, 2005). Uma meta-análise mostrou maior eficácia do bochecho de clorexidina 0,12% no controle do biofilme quando comparado aos óleos essenciais e resultados semelhantes quanto à inflamação gengival (Gunsolley, 2006). Após terapia de desinfecção oral, o uso da clorexidina 0,2% duas vezes ao dia sob forma de bochecho mostrou ter efeito significativo, porém discreto, sobre o ganho de inserção clínica periodontal e redução da profundidade de sondagem após três meses de avaliação (Stratul *et al.*, 2010).

É reconhecido na literatura que o fenótipo bacteriano é alterado quando as bactérias se encontram na forma livre daquele manifestado quando bactérias estão associadas a um biofilme. Isso resulta em uma alteração na suscetibilidade aos agentes antimicrobianos nessas duas formas (Campos *et al.*, 2012).

Recentemente, em um estudo clínico, foi verificado que a presença de biofilme prévio à terapia coadjuvante com clorexidina 0,12% aumenta significativamente os depósitos de cálculo dental e pigmentação, mostrando a necessidade de descontaminação bacteriana prévia para que, também, os efeitos adversos sejam minimizados (Zanatta *et al.*, 2010).

Os efeitos adversos mais comuns relacionados com o uso contínuo da clorexidina são a pigmentação dos dentes, sendo que maiores concentrações estão associadas a manchamentos mais expressivos e alteração do paladar. O manchamento dos dentes é facilmente resolvido com profilaxia e a descontinuação do uso da clorexidina normaliza o paladar do paciente (McCoy *et al.*, 2008).

Os produtos contendo óleos essenciais fenólicos (Listerine®) apresentam uma combinação de timol (0,064%), mentol (0,042%) e salicilato de metila (0,060%), além de álcool, com concentração variando entre 21,6% e 26,9% (Lotufo *et al.*, 2009). Mostraram atividade antimicrobiana frente a bactérias colonizadoras de amostras clínicas de dentes, língua e saliva. Têm sido sucessivamente utilizado em diferentes condições clínicas, como em pós-operatórios e em implantes em função devido a sua eficácia antiplaca. O mecanismo de ação envolve a destruição da parede celular bacteriana, inibição enzimática e extração de lipopolissacarídeos das bactérias. Este efeito bactericida de óleos essenciais, têm sido afirmado contra *Actinomyces comitans*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans* e *S. sanguinis* (Bürgers *et al.*, 2012).

Há evidência de que óleos essenciais penetram no biofilme dentário e exercem ação bactericida contra bactérias localizadas dentro do biofilme (Pan *et al.*, 2000). Um estudo de meta-análise avaliou através de ensaios clínicos de 6 meses de duração a eficácia de bochechos com óleos essenciais na redução de placa e gengivite (Gunsolley *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais apresentam baixa substantividade, além de sensação de queimação, gosto amargo, manchas nos dentes e injúrias ao tecido bucal que constituem seus efeitos colaterais (Mendes *et al.*, 1995).

O triclosan é um fenol sintético, não iônico, de baixa toxicidade, e não provoca desequilíbrio na cavidade bucal (Saba-Chujfi *et al.*, 1998; Gebran & Gebert, 2002). Tem amplo espectro bacteriano, sendo eficaz contra Gram-positivos e Gram-negativos, demonstrando efetividade também contra *Mycobacterium* e principalmente bactérias anaeróbias, assim como esporos e fungos da espécie *Candida*. Sua ação ocorre pela lise da membrana citoplasmática do micro-organismo (Saba-Chujfi *et al.*, 1998; Monfrin & Ribeiro, 2000).

O triclosan pode ser encontrado associado ao copolímero gantrez 0,2% (metoxietileno mais ácido maléico). Essa associação é realizada para aumentar a sua presença na cavidade bucal, devido à baixa substantividade apresentada pelo antisséptico. O copolímero também aumenta o seu espectro de ação sobre bactérias Gram-negativas e leveduras (Saba-Chujfi *et al.*, 1998; Gebran & Gebert, 2002; Bugno *et al.*, 2006).

O triclosan é eficaz na redução da microbiota subgingival, tanto quantitativamente como qualitativamente, e tem servido como antimicrobiano e auxiliar na redução de placa bacteriana, sendo um dos componentes dos produtos de higiene oral, tais como pastas de dentes e enxaguatórios bucais. Clinicamente, o triclosan tem sido eficaz na inibição do biofilme dentário, gengivites e cálculo, além de ajudar na redução da progressão das cáries (Bürgers *et al.*, 2012).

O agente antisséptico cloramina T o qual é reconhecido e aceito como agente terapêutico dental (ADA, 1977), foi introduzido pela

primeira vez em 1916 por Dakin *et al.* (1916) e foi amplamente utilizado para a irrigação de feridas infectadas durante a 1ª Guerra Mundial. A ação bactericida dos compostos cloramina é principalmente através da liberação do cloro disponível e a formação de ácido hipocloroso.

A cloramina T é formada por nanopartículas, o que confere ao princípio ativo uma excelente capacidade de penetração ao agir permeando paredes celulares e tecidos afetados. Tem capacidade de acessar irregularidades, interposições, superfícies e interiores dos diversos tecidos orais, espaços interdentais, espaços periodontais e bolsas subgingivais. Esta ação permite uma profunda interação com os micro-organismos que se desenvolvem não somente nas superfícies e irregularidades, mas igualmente no interior de tecidos e túbulos dentinários. A cloramina T age por ação biocida por meio de reação oxidativa e de hidrólise protéica, reagindo com o material orgânico dos micro-organismos vivos de qualquer tipo, penetrando e/ou rompendo as paredes celulares das bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos, vírus, micobactérias, levedos em formas vegetativas e/ou esporuladas. Esta reação oxidativa e de hidrólise protéica elimina os micro-organismos tanto em ambiente aeróbios como anaeróbios muito rapidamente, mesmo em baixas concentrações. Por causa da irreversibilidade da reação oxidativa e de hidrólise não há possibilidade dos micro-organismos criarem resistência ao princípio ativo. É considerada com poder antisséptico quatro vezes superior ao do hipoclorito na presença de sangue, tendo poder antisséptico mais duradouro (Landi, 2012).

Relatos de casos da utilização de cloramina T para o tratamento de doenças periodontais em humanos são raros, mas descrevem

melhorias clínicas favoráveis após a irrigação subgengival em bolsas periodontais (Stern, 1919; Horel, 1919).

Stralfors *et al.* (1967) em estudo sobre a doença periodontal experimental em hamsters mostraram reduções significativas na perda de osso alveolar relacionada com a adição de 1,0% de cloramina T na água potável do hamster. Em estudos bacteriológicos orais em humanos, Hanke (1940), apresentou uma redução de 92-95% da população bacteriana entre uma a duas horas após a exposição a 0,3% de cloramina T. Em investigações clínicas *in vivo* Sweet *et al.* (1978) verificaram que a cloramina T foi eficaz contra bactérias aeróbias e anaeróbias, quando utilizado em forma de bochecho a 1,0 % prévia a extração dentária, além de reduzir significativamente a bacteremia pós-extração.

Rams *et al.* (1984) obtiveram resultados de efeitos bactericidas contra espiroquetas subgengivais e fornecem mais provas de que a cloramina T pode ter um valor terapêutico no tratamento de lesões periodontais.

2.6 Sistema de cultura de placa em boca artificial – Técnica do microcosmo

Devido ao fato de a placa dental humana ser um biofilme complexo, seu estudo *in vivo* torna-se difícil devido a sua heterogeneidade, pouca quantidade disponível, acesso limitado, ambientes variados e impossibilidade de controle nos mesmos, além dos problemas éticos. Wong & Sissons (2001) desenvolveram um sistema de cultura de placa em boca artificial, na tentativa de solucionar as limitações do estudo da placa dental. Assim, o microcosmo é definido

como uma entidade microbiológica que representa a placa dental natural *in vitro*. O microcosmo retém a complexidade natural do biofilme oral, sua biodiversidade e sua estrutura heterogênea (Sissons *et al.*, 1991; Sissons, 1997; Filoche *et al.*, 2007b; Wong & Sissons, 2001).

Filoche *et al.* (2007a) utilizaram a técnica do microcosmo para estudar biomassa e viabilidade bacteriana pós tratamentos com antissépticos orais, concluindo que a biomassa foi diminuída por todas as soluções testadas, mas a viabilidade não foi alterada. Vários autores têm buscado a utilização dessa técnica a partir da saliva de pacientes devido a sua maior capacidade de simular a realidade da cavidade oral para os mais diferentes estudos, na maioria voltada para a área de cariologia e de testes de substâncias antissépticas (Sissons 1997; Sissons *et al.*, 1991; Filoche *et al.*, 2008; Leite, 2009; Zaura *et al.*, 2011).

Walker & Sedlacek (2007) propuseram um modelo *in vitro* de placa subgengival sobre discos de hidroxiapatita, onde foram inoculadas alíquotas de dispersão de biofilme subgengival coletado de pacientes portadores de periodontite e de pacientes saudáveis. Esse modelo foi realizado em anaerobiose em meio TSB por até 10 dias (comunidade clímax) sendo o meio renovado a cada 48h, mostrando composição e proporção semelhantes às encontradas nos inóculos.

Para o desenvolvimento de um modelo de biofilme *in vitro* Walker & Sedlacek (2007) e Sedlacek & Walker (2007) obtiveram um resultado satisfatório quando compararam quantidades e espécies bacterianas presentes na coleta e após o processamento e crescimento bacteriano em discos de hidroxiapatita. Os autores citam que quanto mais jovem o biofilme mais susceptível às alterações ambientais.

A técnica do microcosmo foi utilizada por Mei *et al.* (2009) para avaliação de biofilmes sobre superfície braquete-adesivo-esmalte. Essa mesma técnica foi usada por Guggenheim *et al.* (2009) para avaliar a interação do biofilme formado com uma cultura primária de células epiteliais humanas buscando um melhor entendimento entre o biofilme e os tecidos do hospedeiro. Ledder *et al.* (2009), utilizaram a técnica do microcosmo para avaliação de enzimas hidrolíticas como agentes de controle de placa, porém esse microcosmo foi criado a partir de culturas puras de *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Polymorphum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Neisseria subflava*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis*, *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis* e *Veillonella dispar* que cresceram em anaerobiose a 37°C por 7 dias em meio Wilkins-Chalgren antes da inoculação.

Desconhece-se estudos que avaliem a ação dos princípios ativos citados anteriormente sobre a formação de biofilme em superfícies de titânio utilizando a técnica do microcosmo.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação antibacteriana de quatro antissépticos frente à biofilme formado por microcosmo em superfícies de titânio.

Objetivos específicos:

1. Medir a rugosidade inicial das topografias de titânio (lisa, lisa e tratada com condicionamento ácido, jateada, jateada e tratada com condicionamento ácido) por meio de rugosímetro óptico;
2. Avaliar a adesão e formação do biofilme sobre estas topografias após 48 horas de crescimento bacteriano;
3. Comparar a ação de quatro agentes antissépticos, em superfícies de implante tratadas, na redução da viabilidade celular bacteriana em biofilme formado por microcosmo.

Testando a hipótese de que a substância antisséptica a base de clorexidina produz os menores valores de micro-organismos totais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (UPF), sob protocolo nº 135.946.

4.1 Corpos de prova de titânio

Os corpos de prova de titânio (CPs) foram obtidos em caráter de doação pela empresa Titanium Fix (São José dos Campos, São Paulo) já estéreis, em discos com 5.5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os tratamentos de superfície foram superfície lisa, lisa e tratada com condicionamento ácido nítrico, jateada com óxido de alumínio, jateada com óxido de alumínio e tratada com condicionamento ácido nítrico.

4.1.1 Verificação da rugosidade superficial

A leitura da rugosidade superficial dos corpos de prova foi realizada com rugosímetro SurrCode SE1200 (Kosakalab, Tóquio, Japão), calibrado nos parâmetros V 200, H 25 mm/ λc e λc 0,25 mm, sendo considerado o valor de rugosidade média dada pelo equipamento (Ra).

Foram realizadas três medições em cada lado dos CPs e em diferentes direções para avaliar a maior área possível das superfícies, sendo então realizada a média de rugosidade de cada CP (ABNT NBR ISO 4288).

4.2 Desenvolvimento de biofilme por microcosmo

Para o desenvolvimento de biofilme *in vitro* pela técnica do microcosmo foi utilizado o modelo descrito por van de Sande *et al.* (2011). Na figura 1 estão descritos a distribuição dos corpos de prova, tratamentos de superfície e substâncias antissépticas utilizados no experimento.

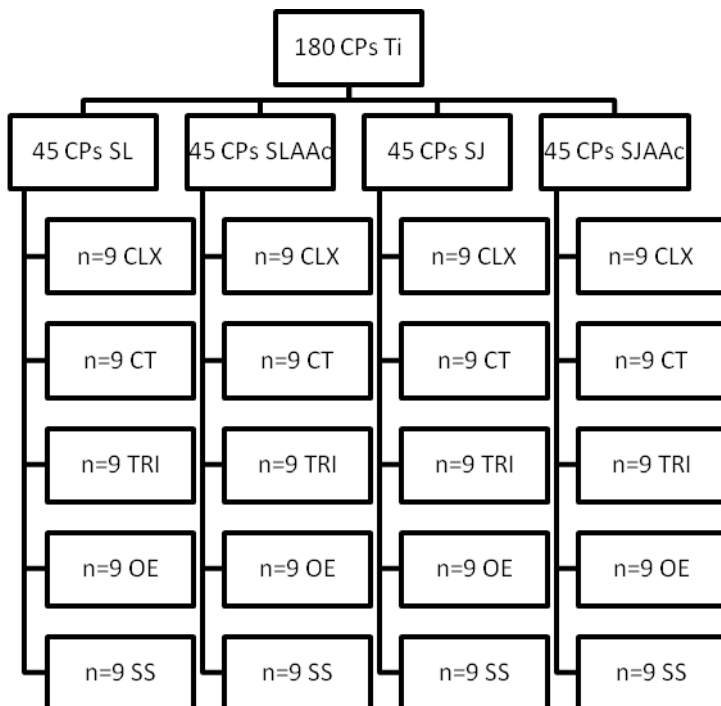


Figura 1 – Distribuição dos corpos de prova, tratamentos de superfície e substâncias antissépticas utilizados no experimento.

Legenda: CPs: corpos de prova, Ti: titânio, SL: superfície lisa, SLAAC: superfície lisa e tratada com condicionamento ácido, SJ: superfície jateada, SJAAC: superfície jateada e tratada com condicionamento ácido, CLX: clorexidina, CT: cloramina T, TRI: triclosan, OE: óleos essenciais e SS: solução salina.

4.3 Coleta e processamento da saliva

Foi selecionado um voluntário portador de doença periodontal, não fumante, que não tinha utilizado antibióticos no último mês e que suspendeu a higiene oral por 24 horas e a alimentação por 2 horas previamente a coleta. O mesmo assinou um termo de consentimento livre e esclarecido a fim de autorizar sua participação no estudo (Apêndice). Foi realizada coleta de 90 mL de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm®) sendo depositada em um coletor graduado estéril e transportada sob refrigeração em gelo ao laboratório, armazenada em um recipiente estéril e homogeneizada em um agitador de tubos (Vortex) (Filoche *et al.*, 2007b). Após a coleta da saliva o paciente foi encaminhado para tratamento periodontal, gratuito, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

4.4 Obtenção de saliva artificial (meio DMM)

A obtenção do meio DMM (meio enriquecido com mucina) foi realizada conforme protocolo descrito por Wong & Sissons (2001) o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5g/l), ureia (1.0mmol/l), sais (em mmol/l: de CaCl₂, 1,0; MgCl₂, 0,2; KH₂PO₄, 3,5; K₂HPO₄, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH₄Cl, 2,0), mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/peptídeo (em mmol/l) em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina

(2,38), leucina (3,68), serina (3,46), treonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38) e caseína (5,0 g/l).

4.5 Desenvolvimento do biofilme

A saliva do paciente foi inoculada sobre os corpos de prova em placas de micropoços, em um volume de 400 µL por poço (figura 2A) e armazenadas em estufa a 37°C por uma hora. Após esse tempo a saliva foi delicadamente aspirada da base dos poços (figura 2B) e adicionado 1,8 mL de saliva artificial (meio DMM) previamente preparado em cada micro-poço (figura 2C). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em jarras de anaerobiose (Anaerobac® - PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda. São Paulo - SP - Brasil) (figura 2D) e mantidas em repouso na incubadora. Os biofilmes foram formados de maneira independente sobre os corpos de prova (figura 2E). Após esse período os CPs foram delicadamente transferidos com pinça estéril para uma nova placa contendo DMM (figura 2F) e mantidas em anaerobiose (Anaerobac®) e repouso por mais 24 horas.

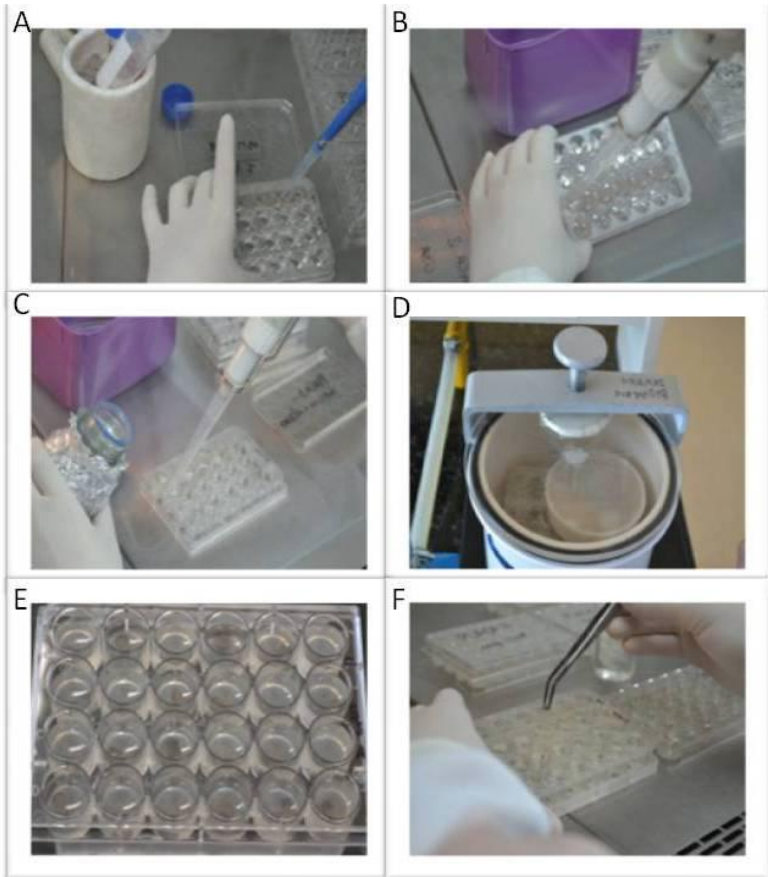


Figura 2 – A – Inoculação da saliva sobre os corpos de prova de titânio; B – Aspiração da saliva; C – Adição de saliva artificial (meio DMM); D – Placas em jarras de anaerobiose (Anaerobac ®); E – Biofilme formado sobre os corpos de prova; F – corpos de prova sendo transferidos, com pinça estéril para uma nova placa contendo DMM.

4.6 Tratamento com substâncias antissépticas

Após as 48 horas de incubação os CPs foram delicadamente transferidos com pinça estéril para uma nova placa contendo 2 mL de cada antisséptico e mantidas em contato por 60 segundos.

Os antissépticos testados foram soluções de: Clorexidina 0,12% (Periogard - Colgate-Palmolive Company), Cloramina-T (Trihydral – Perland Pharmacos 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). Para o grupo controle foi utilizada a solução salina 0,9 %.

4.7 Quantificação do biofilme

Após o tratamento com as substâncias antissépticas os CPs foram removidos dos poços com pinça estéril e as células não aderidas gentilmente retiradas por lavagem com 2 mL de solução salina estéril em placas de micropoços. Os CPs, em ordem de tratamento de superfície e antisséptico testado, foram colocados em eppendorfs contendo 1 mL de solução salina (figura 3A) e mantidos em gelo.

Os CPs foram homogeneizados em um agitador de tubos (Vortex) (figura 3B) 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 de biofilme homogênea (figura 3C) (Stefenon, 2012).



Figura 3 – A – Remoção dos corpos de prova das placas de incubação, colocados em tubos contendo 1 mL de solução salina; B – Corpos de prova sendo submetidos a agitação em vortex; C - Corpos de prova sonicados para obtenção de suspensão homogênea de biofilme.

As suspensões foram diluídas em solução salina até 10^{-7} e imediatamente inoculadas em duplicata em Agar sangue para contagem de micro-organismos totais (figura 4 A). As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (Anaerobac®) a 37°C por 96 horas (figura 4B). As unidades formadoras de colônia foram contadas (figura 4 C/D) e os resultados expressos em UFC/área de espécime ($At = 2\pi r (h+r)$) (Arthur *et al.*, 2013).

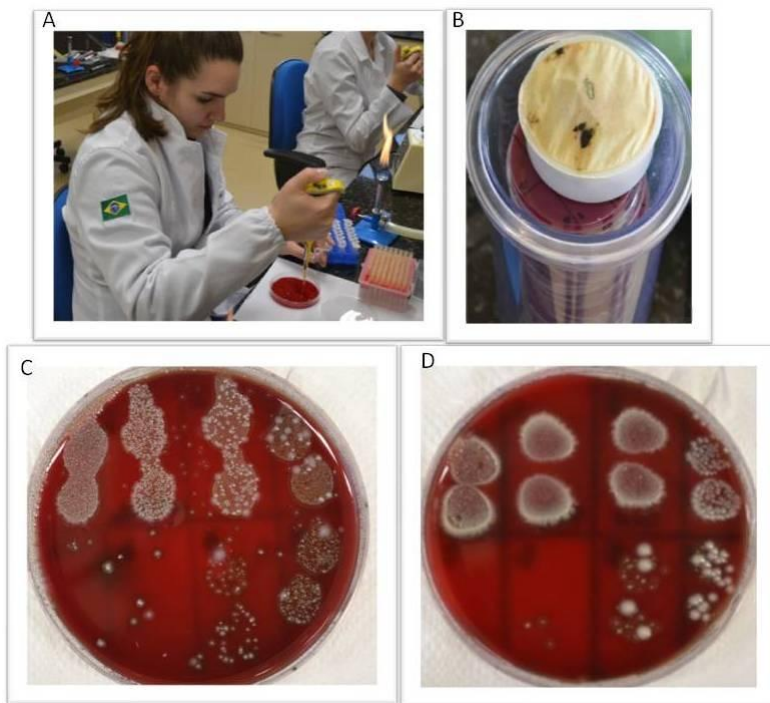


Figura 4 – A – Suspensões bacterianas inoculadas em duplicata em Agar sangue; B – Placas incubadas em condições de anaerobiose (Anaerobac®); C/D – Placa após 96 h de incubação para leitura das unidades formadoras de colônia.

4.8 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 %, para verificar a diferença entre os grupos. E foi utilizado o teste de Tukey para comparar os dados entre os grupos, identificando onde está essa diferença.

5. RESULTADOS

5.1 Rugosidade

Os resultados obtidos na mensuração da rugosidade dos corpos de prova de titânio com diferentes tratamentos de superfície podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Média da rugosidade nas diferentes superfícies de titânio.

Tratamento de superfície	Média da rugosidade
Lisa	0,47 μm
Lisa e tratada com cond. ácido	0,43 μm
Jateada	0,79 μm
Jateada e tratada com cond. ácido	0,72 μm

5.2 Contagens de micro-organismos totais

Os resultados do teste estatístico de Tukey, referente as superfícies de titânio com diferentes tratamentos estão descritos na Tabela 2. A Tabela 3 expõe os resultados da ação dos antissépticos em relação a contagem bacteriana nas superfícies dos corpos de prova de titânio.

Tabela 2 – 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 ($p > 0,05$).

Tabela 3 – 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 ($p > 0,05$).

A figura 5 ilustra a média das contagens de micro-organismos em cada superfície após tratamento com os produtos antissépticos.

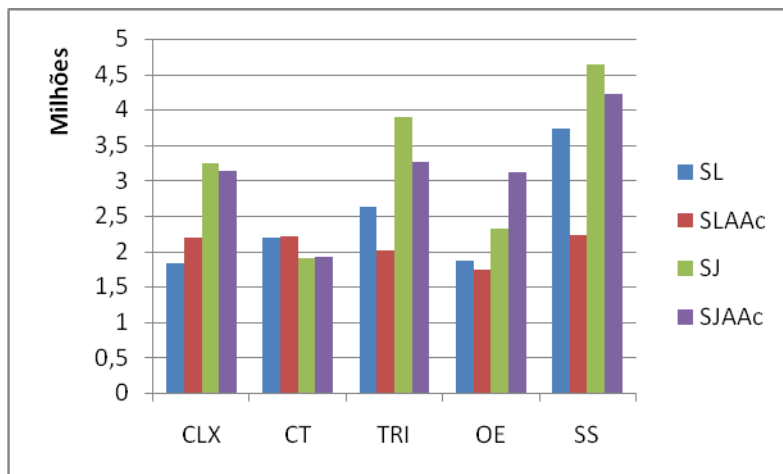


Figura 5 – Contagens bacterianas após ação dos diferentes antissépticos nas diferentes superfícies de titânio.

6. DISCUSSÃO

Atualmente na odontologia o que há de mais moderno e com a mais alta tecnologia para satisfazer as necessidades reabilitadoras e estéticas dos pacientes são os implantes dentários. Contudo, insucessos nesses tratamentos são relatados e muitas vezes relacionados à peri-implantite.

Fürst *et al.* (2007) observaram uma deficiência de informações sobre a colonização inicial e a formação do biofilme nos implantes de titânio, e nenhuma informação sobre o impacto das bactérias presentes nos dentes adjacentes. Em seu estudo avaliaram implantes 30 minutos após sua colocação e 1, 2, 4, 8 e 12 semanas após, observando que a colonização iniciava-se 30 minutos após a colocação do implante. Salientaram ainda que a colonização inicial ocorreu em padrões diferentes quando se considera a superfície dentária e a superfície do implante, principalmente no padrão de distribuição de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e algumas espécies de streptococos.

Entretanto, Marcantonio *et al.* (2011) afirmam que em cerca de 10 dias a composição do biofilme ao redor dos implantes torna-se similar ao do biofilme em dentes e permanece estável em condições de saúde. Este biofilme é composto predominantemente de cocos Gram-positivos

facultativos, com baixo número de espiroquetas e bastonetes, mostrando que as bactérias presentes na cavidade bucal podem ter um impacto importante na formação do biofilme em implantes.

De acordo com Shibli *et al.* (2008), de 36 implantes colocados em cães, após 60 dias de indução de peri-implantite estão presentes bactérias *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium spp*, *Streptococcus sp.* na maioria dos implantes, *Campylobacter spp* em baixas proporções e em alguns implantes *P. gingivalis*. Por outro lado, Kuula *et al.* (2004) revelaram que estudos *in vitro* têm mostrado adesão bacteriana de diversas espécies às superfícies de titânio através de suas membranas protéicas. Entre elas, a *Fusobacterium nucleatum* parece ter pouca atração pelo titânio. Já a *P. gingivalis* e a *Prevotella intermedia* têm um nível maior de afinidade a este material.

No presente estudo, com o intuito de mimetizar adequadamente a formação do biofilme em superfícies de titânio, foi utilizada a técnica do microcosmo, definido como um ensaio microbiológico que representa a placa dental natural *in vitro*. Para tanto foi selecionado um paciente periodontalmente comprometido como doador de saliva para o experimento, em conformidade com Heydenrijk *et al.* (2002), que cita a microbiota presente na peri-implantite como semelhante a da doença periodontal. De acordo com Marcantonio *et al.* (2011) a formação de biofilmes seria influenciada pelas propriedades da superfície dos implantes, tais como composição química, lisura superficial e energia livre de superfície.

Através da mensuração da rugosidade das superfícies avaliadas obteve-se os seguintes resultados: superfície lisa (0,47 μm), superfície lisa e com condicionamento ácido (0,43 μm), superfície jateada (0,79

µm) e superfície jateada e com condicionamento ácido (0,72 µm), conforme tabela 1. Após 48 horas de formação do biofilme ocorreu a formação de uma biomassa espessa em todas as superfícies de titânio, independentemente da rugosidade.

Teughels *et al.* (2006) também citam que superfícies rugosas acumulariam e reteriam maior quantidade de placa. Além disso, após vários dias de formação de placa sem interferências, as superfícies rugosas desenvolveriam uma placa mais madura, caracterizada pelo aumento de colônias, organismos móveis e espiroquetas. Silva e colaboradores (2009) mostraram maior número de células osteoblásticas em todos os períodos de cultura sobre superfícies de titânio com rugosidade de 0,50 µm, corroborando os resultados de Anselme (2000), Keller *et al* (2003) e Isa *et al* (2006), que sugeriram que um elevado grau de microrugosidade favoreceria respostas de adesão e proliferação de células iniciais.

Para Vázquez (2008), ao mesmo tempo em que acelera o processo de osteointegração, a rugosidade da superfície parece estar diretamente relacionada a quantidade de adesão bacteriana na superfície dos implantes dentários (Newman, 1974; Wise & Dykema, 1975; Rimondini *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2000; Ausschill *et al.*, 2001; Quirynen *et al.*, 2002; Ausschill *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2003).

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 (tabela 2). Berglundh *et al.* (2007) estudaram superfícies tratadas com a associação de jateamento e condicionamento

ácido na progressão espontânea da peri-implantite em cães e concluíram que a progressão da peri-implantite é mais acelerada nas superfícies rugosas do que nas superfícies polidas (lisas). Neste contexto, Pongnarisorn *et al.* (2007), ao avaliarem diferentes tratamentos de superfície na porção transmucosa de implantes (usinados, condicionados com ataque ácido e anodizados) sugeriram que o desenvolvimento da inflamação associada aos implantes independe do tipo de superfície ou rugosidade e sim da presença de placa bacteriana. Os autores citam ainda que o tipo da superfície não teria influência na qualidade do infiltrado inflamatório, sendo as células T predominantes em todos os casos, assim como parece não ter influência no tipo de microbiota peri-implantar, embora a presença de ranhuras na área subgingival facilite o acúmulo de placa e conseqüentemente aumente o infiltrado inflamatório.

Analisando o gráfico da figura 5, observa-se que o menor crescimento bacteriano em uma superfície lisa ocorreu quando a mesma foi tratada com clorexidina, seguida pelo tratamento com óleos essenciais. Já na superfície lisa e tratada com condicionamento ácido obteve-se menor crescimento bacteriano sob ação do produto a base de óleos essenciais, enquanto que na superfície jateada a menor adesão bacteriana ocorreu quando o tratamento foi realizado com cloramina T, assim como nas superfícies jateadas e com condicionamento ácido. Entretanto, na análise estatística da presente pesquisa com o teste ANOVA verificou-se que existe diferença significativa para o fator superfície de titânio ($p = 0,015$) e para o fator produto antisséptico ($p = 0,003$), porém não foi encontrada significância estatística para a interação entre os fatores ($p = 0,718$).

Com relação a ação dos produtos antissépticos, o grupo tratado com solução salina demonstrou maiores contagens bacterianas do que os grupos que receberam tratamento com óleos essenciais e cloramina T. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com triclosan, clorexidina, óleos essenciais e cloramina T (tabela 3).

O triclosan foi o produto antisséptico que obteve o resultado menos favorável na diminuição da contagem total dos micro-organismos (0,28 UFC/mm²), Moreira *et al.*, (2009) observaram que o triclosan foi eficaz contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias mesófilas facultativas da saliva.

Por mais de três décadas, a clorexidina tem sido considerada o padrão ouro em comparações com outros agentes químicos em odontologia devido à sua capacidade de evitar a formação do biofilme dental (Charles *et al.*, 2004), porém na presente pesquisa demonstrou pouca efetividade na redução microbiana (0,25 UFC/mm²). Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro antimicrobiano, atuando tanto em micro-organismos gram-positivos como em gram-negativos, além da substantividade prolongada e contínua, mesmo na presença de sangue e demais fluídos corporais (Rosenthal *et al.*, 2004). Contudo, apresenta inúmeros efeitos adversos, de acordo com Ciancio (1995) não tem sido relatada toxicidade sistêmica da clorexidina, já que esta é pouco absorvida no sistema gastrointestinal, entretanto o uso prolongado destes agentes pode apresentar efeitos clínicos colaterais transitórios, como pigmentação extrínseca de dentes, restaurações e língua, descamação de mucosa bucal e, eventualmente, reações alérgicas.

Atualmente poucos estudos refletem a ação da cloramina T, principalmente em relação a peri-implantite, entretanto Hanke (1940), Sweet *et al.* (1978) e Rams *et al.* (1984) obtiveram efetividade significativa na redução bacteriana, sendo eficaz contra bactérias aeróbias e anaeróbias além de reduzir significativamente a bacteremia pós-extração. Na presente pesquisa a cloramina T obteve 0,25 UFC/mm², ou seja, a mesma quantidade de redução microbiana que a clorexidina. Porém, essa substância ativa tem gerado interesse baseado não só na sua atividade, mas especialmente por causa da ausência de efeitos colaterais indesejáveis.

Já o grupo tratado com óleos essenciais demonstrou menores contagens bacterianas (0,22 UFC/mm²) do que os demais antissépticos, corroborando com os resultados de Bugno e colaboradores (2006) onde evidenciaram que o produto à base de óleos essenciais foi o que apresentou melhor atividade antimicrobiana e antifúngica, quando comparado com o produto a base de clorexidina. No entanto, Moreira *et al.*, 2009 e Monfrin e Ribeiro (2000) evidenciaram pouca eficácia do Listerine na redução da microbiota da saliva. Entretanto, os óleos essenciais têm sido avaliados em estudos clínicos de longo prazo e demonstrados serem eficientes e seguros (Gonçalves *et al.*, 2009). Nas investigações de Lamster *et al.* (1983), De Paola *et al.* (1989) e Gordon *et al.* (1985) não foram observadas alterações na mucosa ou aparecimento de manchas sobre os dentes. O efeito colateral associado a este produto foi a sensação de queimação.

Assim como em nosso estudo, Bürges *et al.* (2012) testando substâncias antissépticas contra peri-implantite, causada por micro-organismos específicos, tais como *Stafilococcus epidermidis*,

Streptococos sanguini e *Candida albicans*, obtiveram resultado positivo apenas quando tratado com hipoclorito de sódio, e que os demais produtos como clorexidina, óleos essenciais e triclosan, apesar de terem resultado em uma proporção menor de células vitais aderidas ao titânio, diferenças significativas não puderam ser observadas.

Embora a presente pesquisa não tenha demonstrado estatisticamente diferença significativa entre os antissépticos, um implantodontista ao indicar uma solução de bochecho ao seu paciente irá eleger aquela que tem melhor desempenho no sentido de diminuição da contagem geral de micro-organismos potencialmente agressivos ao desenvolvimento de mucosite e peri-implantite, além de não ter efeitos adversos com uso a longo prazo. O consenso parece ser de que o uso de agentes antissépticos preventivos deve ser um complemento e não um substituto para os métodos mecânicos convencionais, de modo a complementar e tentar superar as deficiências nos hábitos mecânicos de higiene oral (Lindhe *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÃO

Em face aos estudos já comprovados, diferentes antissépticos reduzem a quantificação bacteriana ao redor de implantes de titânio, porém o atual padrão ouro, clorexidina, não teve o seu melhor desempenho, frente a biofilme formado por microcosmo, quando comparado as demais substâncias utilizadas, tais como a cloramina T e os óleos essenciais que apresentam eficácia comprovada e menores efeitos colaterais com uso a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ADA Council on Dental Therapeutics, Accepted Dental Therapeutics. 37th ed. Chicago: American Dental Association, p. 203, 1977.

ADDY, M.; MORAN, J.; WADE, W. Chemical plaque control in prevention of gingivitis and periodontitis. In: Lang, N.P. & Karring, T. (eds). Proceedings of the 1st European Workshop on periodontology, p. 244-257, 1994.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, p. 667-81, 2000.

ARTHUR, R. A.; WAEISS, R.A.; HARA, A.T.; LIPPERT, F.; ECKERT, G. J.; ZERO, D. T. A Defined-Multispecies Microbial Model for Studying Enamel Caries Development. *Caries Res*, v. 47, p. 318-324, 2013.

AUSCHILL T.M.; ARTWEILER N.B.; NETUSCHIL L.; BRECX M.; REICH E.; SCULEAN A. et al. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol.*, v. 46, n. 5, p. 471-6, 2001.

AUSCHILL T.M.; ARWEILER N.B.; BRECX M.; REICH E.; SCULEAN A.; NETUSCHIL L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.*, v. 110, n. 1, p. 48-53, 2002.

BASTOS, E. L. S.; ACCETTURI, F. Reabilitação oral através de implantes osseointegrados em paciente com agenesia dentária: relato de caso clínico, *Rev. paul. Odontol.*, v. 33, n. 1, p. 26-31, 2011.

BAUMAN, G.R.; MILS, M.; RAPLEY, J.W.; HALMON, W.W. Plaque-induced inflammation around implants. *Oral Maxillo Implants*, v. 7, p. 330-336, 1992.

BERGLUNDH, T. et al. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res*, v. 18, p. 655-661, 2007.

BUGNO, A.N. et al. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *R. Inst. Adolfo Lutz*, v. 65, n. 1, p. 40-45, 2006.

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

BÜRGER, R.; GERLACH, T.; HAHNEL, S.; SCHWARZ, F.; HANDEL, G.; GOSAU, M. *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res*, v. 21, n. 2, p. 156-164, 2010.

BÜRGER, R.; WITECY, C.; HAHNEL, S.; GOSAU, M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguis*. *Archives of Oral Biology*, v. 57, p. 940-947, 2012.

BUSER, D.; SCHENK, R.K.; STEINEMANN, S.; FIORELLINI, J.P.; FOX, C.H.; et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, n. 25, p. 889-902, 1991.

CAMPOS, M. L. G.; CORRÊA, M. G.; RUIZ, K. G. S.; SALLUM, E. A.; SALLUM, A. W. Estado atual da Clorexidina na terapia periodontal. *PerioNews*, v. 6, n. 3, p. 279-84, 2012.

CARVALHO, B. M.; PELLIZZER, E. P.; MORAES, S. L. D.; FALCÓN-ANTENUCCI, R. M.; FERREIRA, J. S. Tratamento de superfície nos implantes dentários, *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxillo-fac., Camaragibe*, v. 9, n. 1, p. 123-130, 2009.

CARR, A.B.; GERARD, D.A.; LARSEN, P.E. Histomorphometric analysis of implant anchorage for 3 types of dental implants following 6 months of healing in baboon jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants*, n. 15, p. 785-91, 2000.

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.

CIANCIO, S.G. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. *Periodontology 2000*, v. 8, p. 75-86, 1995.

DAKIN, H. D.; COHEN, J. B.; KENYON, J. Onchloramine: its preparation, properties, and use. *Brit. Med. J.*, v. 1, p. 160-162, 1916.

DEPAOLA, L.G.; OVERHOLSER, C.D.; MEILLER, T.F.; MINAH, G.E.; NIEHAUS, C. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol*, v. 16, n. 5, p. 311-5, 1989.

DRAKE, D.R.; PAUL, J.; KELLER, J.C. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 14, n. 2, p. 226-232, 1999.

ESPOSITO, M.; HIRSCH, J.M.; LEKHOLM, U.; THOMSEN, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I) success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*, v. 106, p. 527-551, 1998.

ESPOSITO, M., *et al.* Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 14, p. 2-75, 2007.

FERREIRA, R. C. Q.; KUGUIMYIA, R. N.; RODRIGUES, R. A.; LINS, R. A. U.; DIAS, A. H. M.; GADE-NETO, C. R. Abordagem clínica da periimplantite. *Rev Bras Implantodon Prótese Implant*, v. 13, n. 51, p. 150-4, 2006.

FILOCHE, S.K.; COLEMAN, M.J.; ANGKER, L.; SISSONS, C.H.A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J. Microbiological Meth.*, v. 69, p. 489-496, 2007a.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosmo biofilms developed in microplates. *Oral. Microbiol. Immunol.*, v. 22, p. 73-79, 2007b.

FILOCHE, S.K.; SOMA, D.; VAN BEKKUM, M.; SISSONS, C.H. Plaques from diferente individuals yield diferente microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 54, p. 27-36, 2008.

FINE, D. H.; FURGANG, D.; LIEB, R.; KORIK, I.; VINCENT, J. W.; BARNETT, M. L. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol*, v. 23, n. 5, p. 444-51, 1996.

FÜRST, M.M.; SALVI, G.E.; LANG,N.P.; PERSSON, G.R. Bacterial colonination immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res.*, v. 18, n. 4, p. 501-508, 2007.

GAHLERT, M.; GUDEHUS, T.; EICHHORN, S.; STEINHAUSER, E.; KNIHA, H.; et al. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.*, n. 18, p. 662-8, 2007.

GEBRAN, M.P; GEBERT, A.P.O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti: Ciência e Cultura*, v. 3, n. 26, p. 45-58, 2002.

GONÇALVES, F.; ZANETTI, L.Z.; ZANETTI, R.V.; RAMALHO, S.A. Estudo in vitro do laser de diodo 980nm na desinfecção de implantes. *RGO, Porto Alegre*, v. 57, n. 4, p. 395-399, 2009.

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.

GORDON, J.M.; LAMSTER, I.B.; SEIGER, M.C. Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.*, v. 12, n. 8, p. 697-704, 1985.

GOSAU, M.; HANHEL, S.; SCHWARZ, F.; GERLACH, T.; REICHERT, T.E.; BÜRGERS, R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.*, v. 21, n. 8, p. 866-72, 2010.

GOTFREDSEN, K.; KARLSSON, U. A prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and TiO₂-blasted surface. *J Prosthodont.*, n. 10, p. 2-7, 2001.

GUGGENHEIN, B.; GMUR, R.; GALICIA, J.C.; STATHOPOULUS, P.G.; BENAKANAKERE, M.R.; MEIRER, M.; THURNHEREER, T.; KINANE, D.F. In vitro modeling of host-parasite interactions: the subgingival biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiol.*, v.9, p. 208-292, 2009.

GUNSOLLEY, J. C. A meta-analysis of six mouth studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.*, v. 137, p. 1649-57, 2006.

GRÖSSNER-SCHEIBER, B.; TEICHMANN, J.; HANNIG, M.; DÖFER, C.; WENDEROTH, D.F.; OTT, S.J. Modified implant surfaces show different biofilm compositions under in vivo conditions. *Clin Oral Implants Res.*, v. 20, n. 8, p. 817-826, 2009.

HANKE, M. T. Studies on the local factors in dental caries. I. Destruction of plaques and retardation of bacterial growth in the oral cavity. *J.A.D.A.*, v. 27, n. 9, p. 1379-1393, 1940.

HASS, R.; HAIMBOCK, W.; MAILATH, G. The relationship of smoking on periimplant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent*, v. 76, p. 592-6, 1996.

HEUER, W.; ELTER, C.; DEMLING, A.; NEUMANN, A.; SUERBAUM, S.; HANNIG, M.; HEIDENBLUT, T.; BACH, F.W.; STIESCH-SCHOLZ, M. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehab*, v. 34, n. 5, p. 377-382, 2007.

HEYDENRIJK, K.; MEIJER, H.J.A.; VAN DER REIJDEN, W.A.; RAGHOEBAR, G.M.; VISSINK, A.; STEGENGA, B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 17, n. 6, p. 829-838, 2002.

HOREL, R. F. The use of hypochlorites and chloramins in dentistry. *Dent. Cosmos*, v. 61, n. 4, p. 373-381, 1919.

HSU, S.H.; LIU, B.S.; LIN, W.H.; CHIANG, H.C.; HUANG, S.C.; et al. Characterization and biocompatibility of a titanium dental implant with a laser irradiated and dual-acid etched surface. *Biomed Mater Eng.*, n. 17, p. 53-68, 2007.

ISA, Z.M.; SCHNEIDER, G.B.; ZAHARIAS, R.; SEABOLD, D.; STANFORS, C.M. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 21, p. 203-11, 2006.

IVANOFF, C.J.; HALLGREN, C.; WIDMARK, G.; SENNERBY, L.; WENNERBERG, A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res.*, n. 12, p. 128-34 2001.

JENSEN, O.T.; SHULMAN, L.B.; BLOCK, M.S.; IACONO, V.J. Report of the Sinus Consensus Conference of 1996. *Int J Oral Maxillofac Implants*, n. 13, p. 11-45, 1998.

JORGE, A.O.C. *Microbiologia Bucal*. São Paulo: Santos Editora, 2007.

KAWAI K.; URANO M.; EBISU S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent.*, v. 83, n. 6, p. 664-7, 2000.

KELLER, J.C.; SCHNEIDER, G.B.; STANFORD, C.M.; KELLOGG, B. Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment. *Implant Dent.*, v. 12, p. 175-9, 2003.

KLINGE, B.; GUSTAFSSON, A.; BERGLUNDH, T. A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of periimplantitis. *J Clin Periodontol*, v. 29, n. 3, p. 213-25, 2002.

KOLAH, J.; SOOLARI, A. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int.*, v. 37, n. 8, p. 605-12, 2006.

KONISHI, N.; TORII, Y.; KUROSAKI, A.; TAKATSUKA, T.; ITOTA, T.; YOSHIYAMA, M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil.*, v. 30, n. 8, p. 790-5, 2003.

KORNMAN, K. S. The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases. A review of current concepts. *J Periodontal Res.*, v. 21, n. 16, p. 5-22, 1986.

KOYANAGI, T.; SAKAMOTO, M.; TEKEUCHI, Y.; OHKUMA, M.; IZUMI, Y. Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *Journal of Oral Microbiology*, v. 24, n. 2, 2010.

KUMAR, P. S.; MASON, M. R.; BROOKER, M. R.; O'BRIEN, K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 39, p. 425-433, 2012.

KUULA, H.; KONONEN, E.; LOUNATMAA, K.; KONTTINEN, Y.T.; KONONEN, M. Attachment of oral gram-negative anaerobic rods to a smooth titanium surface: an electron microscopy study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 19, n. 6, p. 803-809, 2004.

LAMSTER, I.B.; ALFANO, M.C.; SEIGER, M.C.; GORDON, J.M. The effect of Listerine® Antiseptic on reduction of existing plaque and gingivitis. *Clin Prev Dent.*, v. 5, p. 12-16, 1983.

LANDI, F. *Monografia Trihydral*. Disponível em: <<http://www.trihydral.com.br/conteudo/artigos.php?id=13>>. Acesso em: 06 out. 2012.

LEE, B.C.; JUNG, G.Y.; KIM, D.J.; HAN, J.S. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont.*, v. 3, p. 81-4, 2011.

LEDDER, R.G; MADHWAI, T.; SREENIVASAN, P.K.; DE VIZIO, W.; MCBAIN, A.J. Na in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J. Medical Microbiol.*, v. 58, p. 482-491, 2009.

LEITE, F.H.VS. *Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

LEONHARDT, A.; RENVERT, S.; DAHLEN, G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res*, v. 10. n. 5, p. 339-45, 1999.

LEONHARDT, A.; BERGSTROM, C.; LEKHOLM U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res*, v.5, n. 4, p. 226-32, 2003.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LINDHE, J.; MEYLE, J. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *J Clin Periodontol*, v. 8, p. 282-5, 2008.

LIU, Y.; LAYROLLE, P.; DE BRUIJIN, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE GROOT, K. Biomimetic coprecipitation of calcium phosphate and bovine serum albumin on titanium alloy. *J Biomed Mater Res.*, n. 57, p. 327-35, 2001.

LIU, Y.; HUNZIKER, E. B.; DE GROOT, K.; LAYROLLE, P. Introduction of ectopic bone formation by BMP-2 incorporated biomimetically into calcium phosphate coatings of titanium alloy implants. In: Ben-Nissan B, Sher D, Walsh W, editors. *Bioceramics*. Sydney: *Trans Tech Publications*, v. 15, p. 667-70, 2002.

LONDON, R.M.; ROBERTS, F.A.; BAKER, D.A.; ROHRER, M.D.; O'NEAL, R.B. Histological comparison of a thermal dualetched implant surface to machined, TPS, and HA surfaces: bone contact in vivo in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, n. 17, p. 369-76, 2002.

LOPES, A. C.; REZENDE, C. E. E.; FERNANDES, M. S.; WEINFELD, I. Infiltração bacteriana na interface do Implante/pilar: Considerações ao implantodontista, *RGO: Revista Gaúcha de Odontologia*, v. 58, n. 2, p. 239-242, 2010.

LORENZO, J. L. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 274, 2004.

LOTUFO, R. F. M.; PANNUTI, C. M.; CALIL, C. M.; FENG, H. S.; SEKIGUCHI, R. T.; CARVALHO, V. F. Controle químico do biofilme dentário supragengival: Revisão da literatura. *R. Periodontia*, v. 19, n. 1, p. 34-42, 2009.

LOZADA, J. L.; JAMES, R. A.; BOSKOVIC, M. Surgical repair of peri-implant defects. *J Oral Implantol.*, v. 16, n. 1, p. 42-6, 1990.

MABBOUX, F.; PONSONNET, L.; MORRIER, L.; JAFFREZIE, N.; BARSOTTI, O. Surface free energy and bacterial retention to saliva-coated dental implant material – an *in vivo* study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 39, n. 4, p. 199-205, 2004.

MARCANTONIO, A.; GURGEL, B. C. V.; SILVA, C.S.; NAGATA, M. J. H.; CORTELLI, S. C. Biofilme – dentes e implantes. *Perio News*, v. 5, n. 2, p. 126-30, 2011.

MCCOY, L. C.; WEHLER, C. J.; RICH, S. E.; GARCIA, R. I.; MILLER, D. R. JONES, J. A. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. *J Am Dent Assoc*, v. 139, n. 2, p. 178-83, 2008.

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.

MENDES, M.M.S.G. *et. al.* Agentes químicos para o controle da placa bacteriana. *Periodontia*, v. 5, n. 2, p. 253-256, 1995.

MOMBELLI, A.; LANG, N.P. Antimicrobial treatment of periimplant infections. *Clin Oral Implants Res*, v. 3, n. 4, p. 162–8, 1992.

MOMBELLI, A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol* 2000, v. 28, p. 177-189, 2002.

MONFRIN, R.C.P.; RIBEIRO, M.C. Avaliação in vitro de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. *R. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v. 54, n. 1, p. 401-407, 2000.

MOREIRA, A. C. A.; PEREIRA, M. H. Q.; PORTO, M. R.; ROCHA, L. A. P.; NASCIMENTO, B. C.; ANDRADE, P. M. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais *R. Ci. méd. biol.*, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2009.

MOURA, C. D. V. S.; VALENTE, V. S.; SILVA, A. M.; VALENTE, M. L. M. M.; CRAVINHOS, J. C. P.; NOGUEIRA, L. B. L. V. Reabilitação total do arco superior com implantes e prótese cerâmica de infraestrutura em zircônia - Relato de caso clínico, *Rev. ABO nac.*, v. 19, n. 5, p. 303-308, 2012.

NEWMAN, H.N. Diet, attrition, plaque and dental disease. *Br Dent J*. v. 136, n. 12, p. 491-7, 1974.

NOROWSKI, P. A.; BUMGARDNER, J. D. Biomaterial and Antibiotic Strategies for Peri-implantitis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, p. 530-543, 2008.

ONG, E.S.M.; NEWMAN, H.N.; WILSON, M.; BULMAN, J.S. The occurrence of periodontitis-related microorganisms in relation to titanium implants. *J. Periodontol.*, v. 63, p. 200-205, 1992.

PAN, P.; BARNETT, M. L.; COELHO, J. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol*, v. 27, p. 256-261, 2000.

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 *Porphyrromonas gingivalis*: an *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res*, v. 17, n. 6, p. 633-637, 2006.

PILLIAR, R. M. Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dent*, n. 7, p. 305-14, 1998.

PONGNARISORN, N.J.; GEMMELL, E.; TAN, A.E.S.; HENRY, P.J.; MARSHALL, R.I.; SEYMOUR, G.J. Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Impl Res*, v. 18, n. 1, p. 114-125, 2007.

PYE, A.D.; LOCKHART, D.E.A.; DAWSON, M.P.; MURRAY, C.A.; SMITH, A.J. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*, v. 72, n. 2, p. 104-110, 2009.

QUIRYNEN, M.; LISTGARTEN, M.A. The distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Branemark. *Clin Oral Implants Res.*, v. 1, p. 8-12, 1990.

QUIRYNEN, M.; AVONTROODT, P.; PEETERS, W.; PAUWELS, M.; COUCKE, W.; VAN STEENBERGHE, D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*, v. 28, p. 1127-36, 2001.

QUIRYNEN, M.; DE SOETE, M.; VAN STEENBERGHE, D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl Res*, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2002.

RAMS, T. E.; KEYES, P. H.; JENSON, A. B. Morphological Effects of Inorganic Salts, Chloraniine-T, and Citric Acid on Subgingival Plaque Bacteria, *Quintessence International*, n. 8, p. 835-844, 1984.

RENVERT, S.; ROOS-JANSAKER, A.M.; CLAFFEY, N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*, v. 35, n. 8, p. 305-15, 2008.

RIMONDINI, L. The effect of surface roughness on early *in vivo* plaque colonization on titanium. *J Periodontol.*, v. 68, n. 6, p. 556-62, 1997.

ROMEIRO, R.L.R.; ROCHA, R.F.; JORGE, A.O.C. Etiologia e tratamento das doenças periimplantares, *Odonto*, v. 18, n. 36, p. 59-66, 2010.

ROOS-JANSACKER, A.M.; RENVERT, S.; EGELBERG, J. Treatment of periimplant infections: a literature review. *J Clin Periodontol*, v. 30, n. 6, p. 467-85, 2003.

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.

ROSENTHAL, S.; SPANGBERG, L.; SAFAVI, K.; CONN, F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 98, p. 488-92, 2004.

SABA-CHUJFI, E. *et al.* A eficácia da formulação contendo o anti-séptico triclosan associado ao copolímero gantrez e ao flúor, utilizada através de bochecho para controle químico da placa bacteriana. *R. Assoc. Bras. Odontol.*, v. 6, n. 3, p. 164-170, 1998.

SCHWARZ, F.; BIELING, K.; BONSMANN, M.; LATZ, T.; BECKER J. Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Investig*, v. 10, n. 4, p. 279-88, 2007.

SEDLACEK, M.J.; WALKER, C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*, v. 22, n. 5, p. 333-339, 2007.

SEKINO, S.; RAMBERG, P. The effect of a mouth rinse containing phenolic compounds on plaque formation and developing gingivitis. *J Clin Periodontol*, v. 32, p. 1083-8, 2005.

SHEMESH, M.; TAM, A.; AHRONI, R.; STEINBERG, D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 51, 2010.

SHIBLI, J. A.; MARTINS, M. C.; ROSSA JR, C.; MARCANTONIO JR, C.; ITO, I. Y. Microbiota relacionada à periimplantite. *Revista do CROMG*, v. 8, p. 60-4, 2002.

SHIBLI, J.A.; MELO, L.; FERRARI, D.S.; FIGUEIREDO, L.C.; FAVERI, M.; FERES, M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Impl Res.*, v. 19, n. 10, p. 975-982, 2008.

SILVA, G.L.M.; FERREIRA, S.D.; ZENÓBIO, E.G.; SOARES, R.V.; COSTA, F.O. Mucosite periimplantar e periimplantite: prevalência e indicadores de risco em indivíduos parcialmente edêntulos. *R. Periodontia*, v. 17, n. 3, p. 90-97, 2007.

SILVA, T.S.N.; MACHADO, D.C.; VIEZZER, C.; SILVA JÚNIOR, N.A.; OLIVEIRA, M.G. Efeito da rugosidade da superfície de titânio sobre a proliferação de células de medula óssea humana e de diferenciação. Um estudo experimental. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 24, n. 3, 2009.

SISSONS, C.H.; CUTRESS, T.W.; HOFFMAN M.P.; WAKEFIELD, J.S.J. A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque grow, metabolism, pH, and mineralization. *J Dental Res.*, v. 70, n. 11, p. 1409-1416, 1991.

SISSONS, C.H. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dental Res.*, v. 11, n. 1, p. 110-126, 1997.

STEFENON, L. Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte. Dissertação de mestrado em Odontologia. Universidade de Passo Fundo/RS. 2012.

STERN, D. S. The ehloramins in the treatment of pyonhea. *Dent. Cosmos*, v. 61, n. 12, p. 1218-1222, 1919.

STINGU, C.S.; ESCHRICH, K.; RODLOFF, A.C.; SCHAUMANN, R.; JENTSCH, H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Medical.Microbiol.*, v. 57, p. 495-499, 2008.

STRALFORS, A.; THILANDER, H.; BERGENHOLTI, A. Simultaneous inhibition of caries and periodontal disease in hamsters by disinfection, tooth-brushing or phosphate addition. *Arch. Oral. Biol.*, v. 12, n. 12, p. 1367-1373, 1967.

STRATUL, S. L.; RUSU, D.; DIDILESCU, A.; MESAROS-ANGHEL, M.; LALA, C.; TION, L.; *et al.* Prospective clinical study evaluating the long-time adjunctive use of chlorhexidine after one stage full-mouth SRP. *Int J Dent Hyg*, v. 8, n. 1, p. 35-40, 2010.

SUBRAMANI, K.; JUNG, R.E.; MOLENBERG, A.; HÄMMERLE, C.H.F. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillo fac. Impl.*, v. 24, n. 4, p. 616-626, 2009.

SYKARAS, N.; IACOPINO, A. M.; MARKER, V. A.; TRIPLETT, R. G.; WOODY, R. D. Implant materials, design and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, n. 15, p. 675-90, 2000.

SWEET, J. B.; *et al.* Nitroblue tetrazolium and limulus assays for bacteremia after dental extraction: effect of tropical antiseptics *J.A.D.A.*, v. 96, n. 2, p. 27-281, 1978.

TAKANASHI, K.; KISHI, M.; OKUDA, K.; ISHIHARA, K. Colonization by *Phorphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions. *Bull. Tokyo dent.Coll.*, v. 45, n. 2, p. 77-85, 2004.

TEIXEIRA, E.R. Superfície dos implantes: o estágio atual. In: Dinato JC, Polido WD. *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas; cap. 5, p. 63-80, 2001.

TEUGHEL, W.; ASSCHE, N.V.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Impl Res.*, v. 17, n. 2, p. 68-81, 2006.

TRAINI, T.; MANGANO, C.; SAMMONS, R.L.; MANGANO, F.; MACCHI, A.; *et al.* Direct laser metal sintering as a new approach to fabrication of an isoelastic functionally graded material for manufacture of porous titanium dental implants. *Dent Mater.*, n. 24, p. 1525-33, 2008.

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.

VAN DER WEIJDEN, G. A.; VAN BEMMEL, K. M.; RENVERT, S. Implant therapy in partially edentulous, periodontally compromised patients: a review. *J Clin Periodontol*, v. 32, p. 506-11, 2004.

VÁZQUEZ, A. J. L. Influencia de las características estructurales de los implantes en el proceso de oseointegración: revisión de la literatura, *Acta odontol.*, v. 46, n. 4, 2008.

WALKER, C.; SEDLACEK, M.J. An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 22, n. 3, p. 152-161, 2007.

WILDERER, P. A.; CHARACKLIS, W. G. Structure and function of biofilms. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. *Structure and function of biofilms*. Chichester, UK: John Wiley, p. 5-17, 1989.

WISE M.D.; DYKEMA R.W. The plaque-retaining capacity of four dental materials. *J Prosthet Dent.*, v. 33, n. 2, p. 178-90, 1975.

WONG, L.; SISSONS, C.H. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grow in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.*, v. 46, n. 6, p. 477-486, 2001.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K.; HIRAYAMA, A. Influence of surface modification to titanium on oral bacterial adhesion *in vitro*. *J Biomed Mater Res.*, v. 52, n. 2, p. 388-394, 2000.

YOSHINARI, M.; ODA, Y.; KATO, T.; OKUDA, K. Influence of surface modifications to titanium on bacterial activity *in vitro*. *Biomaterials*, v. 22, n. 14, p. 2043-2048, 2001.

ZANATTA, F. B.; ANTONIAZZI, R. P.; RÖSING, C. K. Staining and calculus formation after 0,12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. *J Appl Oral Sci.*, v. 18, n. 5, p. 515-21, 2010.

ZAURA, E.; BUIJIS, M.J.; HOOGENKAMP, M.A.; CIRIC, L.; PAPETTI, A.; SIGNORETTO, C.; STAUDER, M.; LINGSTROM, P.; PRATTEN, J.; SPRATT, D.A.; WILSON, M. The effects of fractions from Shiitake Mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. *J. Biomed. And Biotach.*, v. 2011, p. 1-10, 2011.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Ação de antissépticos frente a biofilme formado por microcosmo em superfície de titânio” de responsabilidade de Georgia Verardi, aluna do Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade de Passo Fundo. O objetivo dessa pesquisa é avaliar a ação antisséptica na redução do biofilme bacteriano sobre as superfícies de titânio, através de métodos microbiológicos e microscopia de fluorescência.

A sua participação vai se dar pela coleta de saliva no momento em que for diagnosticada doença periodontal. A coleta será realizada por examinadores da UFPel, acompanhados da pesquisadora responsável, nessa instituição. A coleta é realizada com você cuspiendo em um recipiente esterilizado por alguns minutos, e essa saliva será utilizada como inóculo para pesquisa no desenvolvimento de bactérias. Sendo que após a coleta você está liberado de qualquer compromisso com a pesquisa. Esse procedimento não trás desconforto ou risco à saúde. E em qualquer momento você poderá receber esclarecimentos sobre qualquer

dúvida ou eventual desconforto, podendo ter acesso aos seus dados em qualquer etapa da pesquisa.

Ao participar dessa pesquisa você receberá as orientações sobre a doença periodontal e será encaminhado para tratamento adequado na instituição (UFPEL). Sua participação na pesquisa não é obrigatória e você pode desistir em qualquer momento retirando seu consentimento. Caso tenha alguma despesa relacionada a pesquisa essa será ressarcida, porém você não receberá pagamento pela participação no estudo. As suas informações e informações geradas a partir da sua saliva serão mantidas em sigilo. Você não será identificado em nenhum momento da pesquisa e da divulgação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas ou se considera prejudicado(a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com a pesquisadora Georgia Verardi (54) 91156938, com o curso de Mestrado em Clínica Odontológica da UPF, com a Coordenação da Pós-Graduação da UFPEL ou também consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF pelo telefone (54)33168370.

Dessa forma, concordo em participar da pesquisa de acordo com as explicações e orientações acima. Desde já agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua autorização, que será assinada em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com a pesquisadora.

Pelotas, ____ de _____ de 2013.

Nome do participante: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Georgia Verardi

RG: 8062781078

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AÇÃO DE ANTISÉPTICOS SOBRE BIOFILMES ORAIS.

Pesquisador: LUCIANA RUSCHEL DOS SANTOS

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 09128412.0.0000.5342

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 135.946

Data da Relatoria: 31/10/2012

Apresentação do Projeto:

Este estudo visa avaliar a ação anti-séptica na redução do biofilme bacteriano sobre as superfícies de titânio, através de métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Serão utilizados como corpos-de-prova 120 discos padronizados de titânio comercialmente puro (Ti cp) com 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura de superfícies lisas e com tratamento de duplo condicionamento ácido ou jateamento com óxido de alumínio). O preparo das suspensões microbianas será realizado através da técnica do microcosmo, onde a saliva dos pacientes periodontais serão preparadas e armazenadas em ágar nutriente, então ocorrerá a formação in vitro de biofilme sobre as superfícies lisa e rugosa de Ti cp. As substâncias antisépticas PerioGard (Cloroxidina 0,12%), Trihydral (Cloramina-T), Plax (Triclosan) e Listerine (Óleos essenciais) serão preparadas e aplicadas sobre as superfícies de Ti, sendo mantidas em contato com os agentes anti-sépticos por 60s. Posteriormente será feita a avaliação quantitativa das células viáveis do biofilme, seguido por diluições seriadas e método do espalhamento em placa (plaqueamento em superfície), para que então a análise das superfícies de Ti cp seja feita, por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os dados serão analisados estatisticamente usando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação anti-séptica na redução do biofilme bacteriano sobre as superfícies de titânio, através de métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta riscos aos sujeitos e o benefício é de caráter científico, ou seja, testar substâncias eficazes para controle de biofilmes orais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa observacional, quantitativa, com 10 sujeitos pacientes, por meio de métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais do (s) participante (s) foi (ram) garantido (s) no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do (a) pesquisador (a) e das instituições envolvidas estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Recomendações:

SEM RECOMENDAÇÕES.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PASSO FUNDO, 31 de Outubro de 2012

Assinador por:
Nadir Antonio Pichler
(Coordenador)

ARTIGO A SER SUBMETIDO

Submission Confirmation

Your submission is now complete. Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Your manuscript has been given the following ID. Please make a note of this ID and use it to refer to your manuscript in any communications:

JMM/2014/080614

You may check on the status of your submission at any time by visiting your [author area](#).

You can direct any other inquiries regarding this submission to submit.jmm@sqm.ac.uk.

Online Submission Feedback

[\[Send us your comments\]](#)

**Antibacterial effect of antiseptics on microcosm biofilm
on titanium surfaces**

Running title: Effect of antiseptics on microcosm biofilm

Contents category: Oral microbiology

Georgia Verardi,^{1*} Maximiliano Sérgio Cenci,² Tamires Maske,²

Luciana Ruschel dos Santos¹

¹Universidade de Passo Fundo, Brazil.

²Dental School, Universidade Federal de Pelotas, Brazil.

* Corresponding author: Dr. Georgia Verardi. E-mail:
geverardi@yahoo.com.br Tel: +55 54 33168395 Fax: +55 54
33168409

List of abbreviations: AESS – acid-etched smooth surface; ANOVA – analysis of variance; DMM – defined medium mucin; Ra – average roughness; SBAES – sand-blasted and acid-etched surface; SBS – sand-blasted surface; SS – smooth surface

Abstract

Oral rehabilitation with osseointegrated implants is a way to restore esthetics and masticatory function in edentulous patients, but bacterial colonization around the implants may lead to mucositis or peri-implantitis and consequent implant loss. Peri-implantitis is the main complication of oral rehabilitation with dental implants and, therefore, it is necessary to take into account the potential effects of antiseptics such as chlorhexidine, chloramine T, triclosan, and essential oils on bacterial adhesion and on biofilm. To assess the action of these substances, we used the microcosm technique, in which the oral environment and periodontal conditions are simulated *in vitro* on titanium discs with different surfaces (smooth surface - SS, acid-etched smooth surface - AESS, sand-blasted surface - SBS, and sand-blasted and acid-etched surface - SBAES). Roughness measurements yielded the following results: SS: 0.47 μm , AESS: 0.43 μm , SB: 0.79 μm , and SBAES: 0.72 μm . Bacterial counts were higher on SB, SBAES, and SS than on AESS, without statistical significance. No statistical difference was noted between antiseptics in the groups treated with triclosan, chlorhexidine, essential oils, and chloramine T. Different antiseptics reduce bacterial count around implants. However, the current gold

standard (chlorhexidine) did not outperform the other antiseptics tested. There was significant difference between titanium surfaces and antiseptics, but no statistical significance was observed in the interaction between the factors.

Keywords: Peri-implantitis; Biofilm; Microcosm; Antiseptic.

INTRODUCTION

Dental implants offer an alternative so that patients' rehabilitation and esthetic needs be met, but failures have been reported and attributed to peri-implantitis (Ferreira *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2010). Described as an inflammatory disease that affects tissues in the vicinity of the osseointegrated implant, peri-implantitis leads to bone loss (Pier-Francesco *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2007) and subsequent implant loss (Gonçalves *et al.*, 2009; Grössner-Scheiber *et al.*, 2009), but bacterial adhesion and biofilm accumulation are the major causes of this disease (Bürgers *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

The basic treatment for periodontitis and peri-implantitis consists of debridement of the affected surface (dental implant) (Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008). Implant surfaces are highly microstructured and macrostructured so that they increase osseointegration, but rough surfaces facilitate microbial adhesion and formation of complex biofilms, hindering the debridement of implant surfaces (Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008; Bürgers *et al.*, 2010). Additional therapy with antibiotics and antiseptics has been proposed for the removal of pathogenic biofilms and improvement of nonsurgical

treatment outcomes (Roos-Jansaker *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2007; Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008).

The healing potential of peri-implant defects after suppression of peri-implant microbial biofilm has been reported, but treatment recommendations and the most appropriate chemical agent for decontamination of implants are yet unclear (Klinge *et al.*, 2002; Roos-Jansaker *et al.*, 2003; Lindhe & Meyle, 2008; Renvert *et al.*, 2008).

Gosau *et al.* (2010) investigated the effects of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, chlorhexidine digluconate, citric acid, essential oils, and triclosan on *in vivo* biofilms in healthy individuals, concluding that antiseptics had bactericidal effects on microbial adhesion, but interindividual variations hampered the interpretation of results. Moreover, the microbiota on teeth or implants under healthy conditions has qualitative and quantitative differences from those observed on sites affected by peri-implantitis or periodontitis (Leonhardt *et al.*, 1999; Leonhardt *et al.*, 2003).

Filoche *et al.* (2007a) used the microcosm technique to assess biomass and bacterial viability after oral antiseptic treatments, concluding that biomass was reduced by all tested solutions, but viability remained unchanged. Other authors have used this technique with patients' saliva because it simulates the oral cavity, being appropriate for investigations in the field of cariology and for tests with antiseptic substances (Sissons *et al.*, 1991; Sissons, 1997; Filoche *et al.*, 2008; Leite, 2009; Zaura *et al.*, 2011).

In the present study, we assessed the effect of four antiseptics against microcosm biofilm on titanium surfaces with different treatments.

METHODS

The study protocol (no.135.946) was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Passo Fundo.

Titanium specimens. Sterile titanium specimens were donated by Titanium Fix (São José dos Campos, São Paulo, Brazil), in discs measuring 5.5 mm in diameter and 2 mm in thickness. The following

types of surface were analyzed: smooth surface, acid-etched smooth surface, sand-blasted surface, and sand-blasted and acid-etched surface.

Surface roughness measurement. Surface roughness was measured by a SurrCode SE1200 profilometer (Kosakalab, Tokyo, Japan), calibrated with V 200, H 25 mm/ λc and λc 0,25 mm, and average roughness (Ra) was considered to be that provided by the equipment.

Microcosm biofilm formation. For *in vitro* biofilm formation by the microcosm technique, we used the model described by Van de Sande *et al.* (2011). Saliva was collected from a non-smoking volunteer with periodontal disease who had not taken antibiotics in the previous month, who had abstained from oral hygiene in the past 24 h, and who had fasted for 2 h prior to collection, and was then processed. This patient signed a written informed consent form, authorizing his participation in the study. 90 mL of saliva stimulated with paraffin (Parafilm®) was collected into a sterile graded collector and transported to the laboratory under refrigeration, stored in a sterile vessel and homogenized in a vortex mixer (Filoche *et al.*, 2007b). After collection, the patient was

referred to free-of-charge periodontal treatment at the Dental School of Universidade Federal de Pelotas.

Artificial saliva (DMM) preparation. The defined medium mucin (DMM) was obtained as proposed by Wong & Sissons (2001), consisting of porcine gastric mucin (2.5g/l), urea (1.0 mmol/l), salts in mmol/l (CaCl₂: 1.0; MgCl₂: 0.2; KH₂PO₄: 3.5; K₂HPO₄: 1.5; NaCl: 10.0; KCl: 15.0; NH₄Cl: 2.0), 21 free amino acids, 17 vitamins and growth factors. The medium contains amino acids for the protein/peptide equivalent (in mmol/l), whose concentrations are based on that of human saliva: alanine (1.95), arginine (1.30), asparagine (1.73), aspartic acid (1.52), cysteine (0.05), glutamic acid (5.41), glutamine (3.03), glycine (1.95), histidine (1.08), isoleucine (2.38), leucine (3.68), serine (3.46), threonine (1.08), tryptophan (0.43), tyrosine (2.17), valine (2.38), and casein (5.0 g/l).

Biofilm growth. The patient's saliva was inoculated onto microplated titanium specimens using 400 µL per well and incubated in an oven at 37°C for 1 h. Thereafter, the saliva was aspirated from the well bottoms and 1.8 mL of artificial saliva was added to each microplate. The plates

were incubated at 37°C for 24 h in anaerobic jars (Anaerobac®) and biofilms were formed independently on titanium specimens. After that, the specimens were transferred with sterile tweezers to a new plate containing DMM and kept under anaerobic conditions (Anaerobac® jar) and allowed to rest for 24 h.

Treatment with antiseptic substances. After 48 h of incubation, the specimens were transferred with sterile tweezers to a new plate containing 2 mL of each antiseptic and maintained in contact for 60 s. The tested antiseptics were: chlorhexidine 0.12% (Periogard - Colgate-Palmolive Company), chloramine T (Trihydral – Perland Pharmacos Ltda), triclosan (Plax - Colgate-Palmolive Company), and essential oils containing eucalyptol, thymol, methyl salicylate, and menthol (Listerine - Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda). Saline solution 0.9% was used for the control group.

Quantification of viable cells. After treatment with antiseptic substances, the specimens were removed from the wells with sterile tweezers, and non-adherent cells were washed off with 2 mL of sterile saline solution in microplates. The specimens, following the order of

treatment of surface and of antiseptic, were placed in Eppendorf tubes with 1 mL of saline solution, stored on ice, homogenized in a vortex mixer and sonicated at 30 W and at a range of 5%, using three pulses of 10 s at a 5-second interval in order to obtain a homogenous biofilm suspension (Stefenon, 2012).

The suspensions were diluted in saline solution up to 10^{-7} and inoculated in duplicate in blood agar for the count of total microorganisms, under anaerobic conditions (Anaerobac®) at 37°C for 96 h. Colony-forming units were counted and the results were expressed in CFU/specimen area (Arthur *et al.*, 2013).

Statistical analysis. The CFU data were analyzed using two-way ANOVA at a 5% significance level and the data between the groups were compared by Tukey's test.

RESULTS AND DISCUSSION

The following surface roughness values were obtained: 0.47 μm for smooth surface (SS), 0.43 μm for acid-etched smooth surface (AESS), 0.79 μm for SBS, and 0.72 μm for sand-blasted acid-etched surface

(SBAES). Bacterial counts were higher on sand-blasted surface (SBS), on SBAES, and on SS than on AESS, without statistical difference. After 48 h of biofilm growth, a thick biomass formed on all surfaces, regardless of their roughness.

Berglundh *et al.* (2007) investigated SBAES in spontaneous progression of peri-implantitis in dogs and concluded that progression of peri-implantitis is more pronounced on rough surfaces than on smooth ones. In this context, Pongnarisorn *et al.* (2007) assessed the effects of different surface treatments on the transmucosal area of implants (machined, acid-etched, and anodized) and suggested that the development of implant-associated inflammation is not dependent upon the type of surface or roughness, but rather upon the presence of bacterial plaque. The authors also mention that the type of surface does not interfere with the quality of the inflammatory infiltrate, with predominance of T cells in all cases, and does not interfere with the microbiota around the implant, although the presence of notches in the subgingival area predisposes to plaque accumulation, thereby increasing the inflammatory infiltrate.

There was no statistical difference between antiseptics in the groups treated with triclosan, chlorhexidine, essential oils, and chloramine T (Table 1).

A significant difference was noted between titanium surfaces and antiseptics, but no statistical significance was observed in the interaction between the factors (Fig. 1).

Chlorhexidine was not so good as the other substances used. There was a significant difference concerning antiseptic agents ($p = 0.003$) and titanium surfaces ($p = 0.015$), but the interaction between these factors was not statistically significant ($p = 0.718$). For over three decades, chlorhexidine had been the gold standard, compared to other chemical agents, because it prevented the formation of dental biofilm (Charles *et al.*, 2004); however, the present study demonstrates that it is less efficient in reducing microbial colonization. One of the advantages of its use is its broad spectrum and its prolonged and continuous substantivity, even in the presence of blood and other bodily fluids (Rosenthal *et al.*, 2004). It produces adverse effects, but no systemic toxicity has been reported so far (Ciancio, 1995), as it is poorly absorbed by the

gastrointestinal tract. Nevertheless, its prolonged use may cause temporary clinical side effects, such as extrinsic staining of teeth, restorations, and tongue, desquamation of the oral mucosa and, occasionally, allergic reactions.

Hanke (1940), Sweet *et al.* (1978) and Rams *et al.* (1984) comment that chloramine T significantly reduces bacterial colonization, especially in peri-implantitis and in post-extraction bacteremia. In the present study, chloramine T was found to have the same microbial growth reduction as that provided by chlorhexidine (Table 2). The group treated with essential oils, on the other hand, had fewer bacterial counts than those treated with the other antiseptics, which is in line with the results obtained by Bugno *et al.* (2006), who found out that the antimicrobial and antifungal activity of essential oils was better than that of chlorhexidine. However, Monfrin & Ribeiro (2000) and Moreira *et al.* (2009) observed that Listerine was less efficient in reducing the microbiota in the saliva, which is inconsistent with Gonçalves *et al.* (2009), who mention that essential oils in long-term clinical trials were efficient and safe.

Even though there was no statistically significant difference between the assessed antiseptics, when an implantologist recommends a mouthwash solution, he/she may choose one that is good at reducing bacterial count and has no adverse effects in the long run. There appears to be consensus agreement that the use of prophylactic antiseptics should be a complement rather than a substitute for conventional mechanical methods, thus adding to and trying to eliminate the deficiencies of mechanical oral hygiene habits (Lindhe *et al.*, 2005).

Different antiseptics reduce the amount of bacteria on titanium implants, but chlorhexidine, the current gold standard, was not as good against microcosm biofilm formation as chloramine T and essential oils, which were efficient and had fewer side effects in the long run.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Titanium Fix for providing the titanium specimens used in this study.

REFERENCES

- Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Hara, A. T., Lippert, F., Eckert, G. J. & Zero, D. T. (2013)** A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res* **47**, 318–324.
- Berglundh, T., Gotfredsen, K., Zitzmann, N. U., Lang, N. P. & Lindhe, J. (2007)**. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res* **18**, 655–661.
- Bugno, A., Nicolletti, M.A., Almodóvar, A. A. B., Pereira, T. C. & Auricchio, M. T. (2006)**. Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *R Inst Adolfo Lutz* **65**, 40–45.
- Bürgers, R., Gerlach, T., Hahnel, S., Schwarz, F., Handel, G. & Gosau, M. (2010)**. *In vivo* and *in vitro* biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res* **21**, 156–164.
- Charles, C. H., Mostler, K. M., Bartels, L. L. & Mankodi, S.M. (2004)**. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* **31**, 878–884.

Ciancio, S.G. (1995). Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. *Periodontology* **8**, 75–86.

Ferreira, R. C. Q., Kuguimya, R. N., Rodrigues, R. A., Lins, R. A. U., Dias, A. H. M. & Gade-Neto, C. R. (2006). Abordagem clínica da periimplantite. *Rev Bras Implantodon Prótese Implant* **13**, 150–154.

Filoche, S. K., Coleman, M. J., Angker, L. & Sissons, C. H. (2007a). A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiological Meth* **69**, 489–496.

Filoche, S. K., Soma, K. J. & Sissons, C. H. (2007b). Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 73–79.

Filoche, S. K., Soma, D., Van Bakkum, M. & Sissons, C. H. (2008). Plaques from different individuals yield different microbiota responses to oral-antiseptic treatment. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**, 27–36.

Gonçalves, E. M., Vasconcelos, A. M., Maia, C. R. N. P., Freitas, R. A., Carlos, M. X. & Lima, D. L. F. (2009). Investigação dos ingredientes ativos presentes nos colutórios e dentifrícios encontrados no mercado brasileiro. *R Periodontia* **19**, 52–57.

Gosau, M., Hanhel, S., Schwarz, F., Gerlach, T., Reichert, T. E. & Bürgers, R. (2010). Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on *in vivo* human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res* **21**, 866–872.

Grössner-Scheiber, B., Teichmann, J., Hannig, M., Döfer, C., Wenderoth, D. F. & Ott, S. J. (2009). Modified implant surfaces show different biofilm compositions under *in vivo* conditions. *Clin Oral Implants Res* **20**, 817–826.

Hanke, M. T. (1940). Studies on the local factors in dental caries. I. Destruction of plaques and retardation of bacterial growth in the oral cavity. *JADA* **27**, 1379–1393.

Heuer, W., Elter, C., Demling, A., Neumann, A., Suerbaum, S., Hannig, M., Heidenblut, T., Bach, F.W. & Stiesch-Scholz, M. (2007). Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. *J Oral Rehab* **34**, 377–382.

Klinge, B., Gustafsson, A. & Berglundh, T. (2002). A systematic review of the effect of anti-infective therapy in the treatment of periimplantitis. *J Clin Periodontol* **29**, 213–225.

- Lee, B.C., Jung, G.Y., Kim, D.J. & Han, J.S. (2011).** Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia *in vitro*. *J Adv Prosthodont* **3**, 81–844.
- Leite, F. H. V. S. (2009).** Desenvolvimento de um modelo de biofilme para avaliação de potencial anticariogênico de tratamentos e materiais restauradores. Master's Thesis. Universidade Federal de Pelotas, Dental School.
- Leonhardt, A., Bergstrom, C. & Lekholm, U. (2003).** Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clin Implant Dent Relat Res* **5**, 226–232.
- Leonhardt, A., Renvert, S. & Dahlen, G. (1999).** Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* **10**, 339–345.
- Lindhe, J., Karring, T. & Lang, N. P. (2005).** Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Lindhe, J. & Meyle, J. (2008).** Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol* **8**, 282–285.
- Lopes, A.C., Rezende, C. E. E., Fernandes, M. S. & Weinfeld. I. (2010).** Infiltração bacteriana na interface do Implante/pilar: Considerações ao implantodontista. *Rev Gaúcha Odontol* **58**, 239–242.

- Monfrin, R. C. P. & Ribeiro, M. C. (2000).** Avaliação *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. *R Assoc Paul Cir Dent* **54**, 401–407.
- Moreira, A. C. A., Pereira, M. H. Q., Porto, M. R., Rocha, L. A. P., Nascimento, B. C. & Andrade, P. M. (2009)** Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. *R Ci Med Biol* **8**, 153–161.
- Pier-Francesco, A., Adams, R. J., Waters, M. G. J. & Williams, D. W. (2006).** Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res* **17**, 633–637.
- Pongnarisorn, N. J., Gemmell, E., Tan A. E., Henry, P. J., Marshall, R. I. & Seymour, G. J. (2007).** Inflammation associated with implants with different surface types. *Clin Oral Impl Res* **18**, 114–125.
- Rams, T. E., Keyes, P. H. & Jenson, A. B. (1984).** Morphological effects of inorganic salts, chloramine-T, and citric acid on subgingival plaque bacteria. *Quintessence Int Dent Dig* **8**, 835–844.
- Renvert, S., Roos-Jansaker, A. M. & Claffey, N. (2008).** Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol* **35**, 305–315.

- Roos-Jansaker, A. M., Renvert, S. & Egelberg, J. (2003).** Treatment of periimplant infections: a literature review. *J Clin Periodontol* **30**, 467–485.
- Rosenthal, S., Spangberg, L., Safavi, K. & Conn, F. (2004).** Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**, 488–492.
- Schwarz, F., Bieling, K., Bonsmann, M., Latz, T. & Becker, J. (2007).** Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study. *Clin Oral Investig* **10**, 279–288.
- Sissons, C. H., Cutress, T.W., Hoffman, M. P. & Wakefield, J. S. J. (1991).** A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dental Res* **70**, 1409–1416.
- Sissons, C.H. (1997).** Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dental Res* **11**, 110–126.
- Stefenon, L. (2012).** Desenvolvimento de biofilme em superfície de titânio e esmalte. Master's Thesis. Universidade de Passo Fundo.
- Sweet, J. B., Gill, V. J., Chusid, M. J. & Elin, R. J. (1978).** Nitroblue tetrazolium and limulus assays for bacteremia after dental extraction: effect of tropical antiseptics. *JADA* **96**, 27–281.

- Van De Sande, F. H., Azevedo, M. S., Lund, R. G., Huysmans, M. C. D. N. J. M. & Cenci, M. S. (2011).** An *in vitro* biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* **27**, 1057–1063.
- Wong, L. & Sissons, C. H. (2001).** A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* **46**, 477–486.
- Zaura, E., Buijjs, M. J., Hoogenkamp, M. A., Ciric, L., Papetti, A., Signoretto, C., Stauder, M., Lingstrom, P., Pratten, J. & other authors (2011).** The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an *in vitro* caries model. *J Biomed Biotech.* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/135034>

Tables

Table 1 – Bacterial counts on titanium surfaces submitted to different treatments.

Surface	CFU/ mm ²	*
Sand-blasted	0.31	A
Sand-blasted and acid-etched	0.31	A
Smooth	0.24	AB
Acid-etched smooth	0.20	B

* Values in the column bearing the same letter are statistically similar ($p > 0.05$).

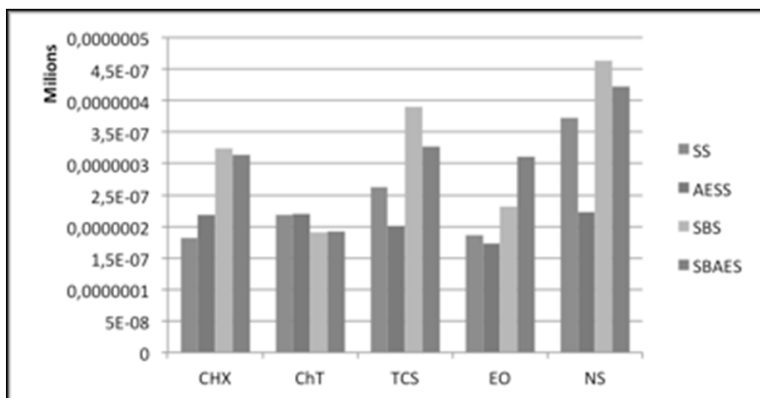
Table 2 – Bacterial counts on different titanium surfaces after antiseptic treatment.

Antiseptic	CFU/ mm²	*
Saline solution	0.37	A
Triclosan	0.28	Ab
Chlorhexidine	0.25	Ab
Essential oil	0.22	B
Chloramine T	0.25	B

* Values in the column bearing the same letter are statistically similar ($p > 0.05$).

Figure captions

Fig. 1 – Bacterial counts on titanium surfaces after antiseptic treatment.



AESS – acid-etched smooth surface; ChT – chloramine T; CHX – chlorhexidine; EO – essential oil; NS – normal saline; SBAES – sand-blasted and acid-etched surface; SBS – sand-blasted surface; SS – smooth surface; TCS – triclosan.