

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/04/2020.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patricia Milagros Maquera Huacho

**Descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol:
estudo in vitro das propriedades físico-química, antimicrobiana e citotóxica**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Patricia Milagros Maquera Huacho

**Descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol:
estudo in vitro das propriedades físico-química, antimicrobiana e citotóxica**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia – Araraquara, para obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Implantodontia

Orientadora:

Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

Araraquara

2018

Maquera Huacho, Patricia Milagros

Descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol: estudo in vitro das propriedades físico-química, antimicrobiana e citotóxica / Patricia Milagros Maquera Huacho.-- Araraquara: [s.n.], 2018

113 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

1. Biofilmes 2. Doenças periodontais 3. Titânio
4. Medicamentos fitoterápicos 5. Técnicas in vitro I. Título

Patricia Milagros Maquera Huacho

**Descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol:
estudo in vitro das propriedades físico-química, antimicrobiana e citotóxica.**

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador: Profa. Dra. Telma Blanca Lombardo Bedran

3º Examinador: Profa. Dra. Juliana Rico Pires

4º Examinador: Profa. Dra. Erica Dorigatti de Avila

5º Examinador: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 04 de Abril de 2018

DADOS CURRICULARES

Patricia Milagros Maquera Huacho

- NASCIMENTO** : 06 de Dezembro de 1986 – Moquegua – Perú
- FILIAÇÃO** : Braulio Maquera Ventura
Elsa Huacho de Maquera
- 2004-2008** : Graduação em Odontologia
Facultad de Odontologia
Universidad Católica de Santa María – Arequipa – Perú
- 2011-2013** : Especialização em Implantodontia
Fundação Bauruense de Estudos Odontológicos
Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB
Universidade de São Paulo – USP
- 2012-2014** : Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de concentração - Periodontia
Nível de mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp
- 2014-2018** : Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de concentração - Implantodontia
Nível de doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp
- 2016-2017** : Especialização em Periodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara, Unesp
- 2017-2018** : Estágio no Department of Oral Health Sciences –
Periodontology - University of Leuven
KU Leuven – Belgium
Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE)

Á Deus

Pela sua presença e perceptível amor, alicerce da minha busca pessoal. Por ser meu refugio e fortaleza, socorro bem presente na angústia, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar.

Muito obrigada por me agradecer com saúde e tantas realizações!

*“Dai-me a serenidade para
aceitar as coisas que eu não posso
mudar, coragem para mudar as coisas
que eu possa, e sabedoria para que eu
saiba a diferença: vivendo um dia a cada
vez, aproveitando um momento de cada
vez; aceitando as dificuldades como um
caminho...”*

Reinhold Niebuhr

Aos meus pais Braulio e Elsa

Principales pilares de mi vida, que con dedicación infinita, amor incondicional y a pesar de estar lejos siempre me apoyaron y no midieron esfuerzos para hacer todo lo que estaba a su alcance, tornando cada sueño posible. Ustedes son mi mayor fortaleza!. Gracias papis! Los amo!

Aos meus irmãos Walter e Daniel

Aunque lejos, siempre presentes en todas mis conquistas. Gracias por su amor, amistad, mis lindos sobrinos y su apoyo en todos los momentos! Los amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Denise M. Palomari Spolidorio

Pelos ensinamentos, por toda a paciência, disponibilidade e pelas oportunidades mas sobretudo pela sua amizade. Minha profunda admiração pelo excelente exemplo de dedicação e profissionalismo, por acreditar em mim, pelo entusiasmo, motivação e me mostrar o caminho da ciência. Serei eternamente grata por ter compreendido minhas limitações físicas, emocionais e intelectuais durante esse período.

Ao meu orientador em Leuven-Bélgica Wim Teughels

Não tenho palavras para descrever esta incrível pessoa e grande mestre. Um exemplo de pesquisador e humildade, que me recebeu de portas abertas e foi sempre atencioso. Obrigada por essa experiência inesquecível. Serei eternamente grata por tudo que aprendi com você e toda sua equipe.

Aos meus queridos amigos do coração: Grace R., Adriana C., Vinicius P., Tiago F., Mariela C., Nathalia L., Laura G., Jhoel P, Alejandra A., Ricardo Ch.

Aos que conheço à muitos anos e aos que nem faz tanto tempo assim, mas que já moram no meu coração, apesar da distância, agradeço por dividirem comigo momentos agradáveis e difíceis, por estar sempre presentes me apoiando e incentivando. Aos que estão mais perto agradeço o convívio diário e principalmente os segredos compartilhados com tanta cumplicidade, carinho e confiança. Saudades de tudo vivido com cada um de vocês, amo em especial todos vocês.

Á minha família brasileira na Bélgica: Jardel M. Danieli B., Isabela B., Lohanna F., Lívia C., Bernardo C. Danilo S.

Obrigada por ter tornado minha estadia em Leuven mais leve. Aprendi, chorei, ri (quanto a gente riu) e principalmente amadureci com vocês, sorri com vocês e fui muito muito feliz com a companhia de cada um. Obrigada pela amizade, carinho, os abraços, as jantas e por todos os momentos convvidos. O tempo junto foi curto, mas o suficiente para se tornar inesquecível. As lembranças jamais se apagarão!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP na pessoa da Ilma. Diretora ***Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato.***

Ao coordenador do curso de Pós Graduação ***Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli*** e a todos os professores do curso de Pós Graduação em Implantodontia e Periodontia a ***Profa. Dra. Rosemary Adriana C Marcantonio, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Profa. Dra. Silvana R P Orico, Profa. Dra. Daniela Zandim-Barcelos, Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio*** pela excelente formação e competência.

Aos amigos e professores que colaboraram de alguma forma com este trabalho ***Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Aline Z., Fernanda B., Marília F.*** Muito Obrigada pelos ensinamentos, paciência, colaboração e acima de tudo amizade.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior, pela colaboração com o desenvolvimento desta pesquisa, conhecimento transmitido, paciência e ter me recebido gentilmente de portas abertas no Departamento de Físico Química, Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP.

Ao Prof. Dr. Bart Van Meerbeek e Ben Mercelis, pela colaboração e ajuda, conhecimento transmitido, paciência e ter me recebido gentilmente de portas abertas no Departamento de biomateriais BIOMAT - KU Leuven.

À empresa Implacil de Bortoli e ao Centro de Tecnologia das Radiações – CTR / IPEN-CNEN/SP: Pela colaboração e doação do material necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

As ***Penélopes e Dick: Ester B, Caroline T, Renata F, Juliana Z., Wagner C.*** só tenho a agradecer pela oportunidade de trabalhar em uma equipe maravilhosa como esta.

Aos amigos do *Department of Periodontology e BIOMAT Ku Leuven: Martine P., Esteban R., Tim P. Siemon De Nys, Evelyn P., Xin L., Simon P., Ben M.* Muito Obrigada pelos ensinamentos, paciência, convívio e acima de tudo amizade. Dank u wel!!

À TODOS (sem distinção) companheiros de pós-graduação, por todos os momentos agradáveis e alegres convívios. A presença de vocês, com certeza, colaborou para meu crescimento científico e intelectual.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial as minhas amigas... *Dona Maria, Claudinha, Isabela e Suleima*, pelo carinho paciência e amizade. Vocês são muito especiais e queridas.

Aos meus queridos amigos *Zé Zuanon e Juliana Pirola* pela disposição, ensinamentos e pela amizade. Adoro vocês!

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia em especial a *Silvana e Carla* pela ajuda e disponibilidade.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara e em especial aos funcionários da biblioteca e da seção de pós-graduação.

Aos queridos *José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier*, pela acessibilidade e disponibilidade em atender toda e qualquer necessidade ainda de longe. Obrigada pela ajuda e paciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter parcialmente financiado este estudo. Processo No. 2015/08742-1

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho.

Nos momentos de crise, não te abatas. Escuta.
Por nada te revoltas, nem te amedrontas. Ora.
Suporta a provação, não reclames. Aceita.
Não grites com ninguém, nem firas. Abençoa.
Lance de sofrimento, é o ensejo da fé. Silencia.
Deus sabe o instante de intervir!

Chico Xavier

Maquera-Huacho PM. Descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol: estudo in vitro das propriedades físico-química, antimicrobiana e citotóxica. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

A doença peri-implantar é um processo inflamatório de etiologia bacteriana. Diferentes tratamentos antimicrobianos disponíveis buscam reduzir a carga microbiana e eliminar a inflamação. Terapias alternativas com extratos naturais abrem novas perspectivas para controlar e reduzir a carga microbiana. Terpinen-4-ol e Carvacrol, principais constituintes naturais de óleos essenciais vêm se destacando por sua propriedade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi avaliar: I) as modificações físico-químicas em superfícies de titânio, adesão e proliferação de fibroblastos e osteoblastos; II) as propriedades antimicrobianas sobre biofilme de *P. gingivalis* e *F. nucleatum*; e citotóxicas em fibroblastos. III) efeito inibitório de biofilmes simples e multi-espécies de *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* e *V. parvula* a partir de concentrações não tóxicas em queratinócitos. Para isto: I) Discos de titânio foram descontaminados com T4ol e Carvacrol e a influência na modificação do ângulo de contato, energia livre de superfície, estrutura química por MEV-EDS, viabilidade e adesão celular de fibroblastos e osteoblastos pelo ensaio Alamar Blue foram avaliados. II) Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração mínima de inibição do biofilme (CMIB) por ensaio XTT, e biofilme em superfícies de titânio foi quantificada em UFC e por Microscopia de laser de varredura confocal (CLSM) e a citotoxicidade em fibroblastos foi avaliada pelo ensaio MTT. III) A citotoxicidade foi testada em queratinócitos orais por ensaio XTT, a inibição e erradicação do biofilmes simples foi analisada por cristal violeta e o efeito sobre biofilmes multi-espécie foi avaliado por qPCR. Resultados de MEV-EDS demonstraram presença de Na, O e Cl após o tratamento com T4ol e Carvacrol. Todas as superfícies apresentaram características hidrófilas e valores de Energia Livre de Superfície (ELS) entre 5,5 mN/m e 3,4 mN/m. Teste de viabilidade e microscopia de fluorescência não apresentaram diminuição da viabilidade celular e adesão. Os valores de CIM foram Carvacrol 0,007% e 0,002% respectivamente para *P. gingivalis* e *F. nucleatum* e T4ol 0,06% para ambos os microrganismos. Os valores de CBM foram semelhantes aos CIM. Os valores de CMIB foram Carvacrol 0,03%, 0,06% e T4ol 0,06%, 0,24%, respectivamente, para *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Observou-se por contagem de UFC e CLSM atividade antibiofilme usando Carvacrol (0,26%, 0,06%) e T4ol (0,95%, 0,24%) com atividade citotóxica semelhante à Clorexidina. T4ol 0.19% e Carvacrol 0.06% não afetaram a viabilidade das células epiteliais. Foi observada a inibição e erradicação de biofilmes simples e multi-espécie, especialmente em patógenos periodontais. Portanto, podemos concluir que T4ol e Carvacrol não alteram as propriedades da superfície do titânio e permitem interação adequada com células envolvidas no processo de re-osseointegração. Além disso, concentrações específicas destes compostos sem toxicidade sobre células humanas, reduziram o número de patógenos periodontais em biofilmes simples e multi-espécie.

Palavras-chave: Biofilmes. Doenças periodontais. Titânio. Medicamentos fitoterápicos. Técnicas in vitro.

Maquera-Huacho PM. Decontamination of titanium surfaces with Terpinen-4-ol and Carvacrol: in vitro study of physical-chemical, antimicrobial and cytotoxic properties. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Peri-implant disease is an inflammatory process of bacterial etiology. Different antimicrobial treatments available seek to reduce microbial load and eliminate inflammation. Alternative therapies with natural extracts open new perspectives to control and reduce microbial burden. Terpinen-4-ol and Carvacrol, the main natural constituents of essential oils; has been notable for its antimicrobial property. The objective of this study was to evaluate: I) physico-chemical modifications on titanium surfaces, adhesion and proliferation of fibroblasts and osteoblasts; II) the antimicrobial properties of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* biofilm; and cytotoxic effects on fibroblasts. III) Inhibitory effect of single and multi-species biofilms of *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* and *V. parvula* from non-toxic concentrations in keratinocytes. For this: I) Titanium discs were decontaminated with T4ol and Carvacrol and the influence on the modification of contact angle, surface free energy, chemical structure by MEV-EDS, viability and cellular adhesion of fibroblasts and osteoblasts by the Alamar Blue assay were evaluated. II) Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), minimum concentration of biofilm inhibition (MBIC) by XTT assay, and biofilm on titanium surfaces was quantified in CFU and by Confocal Scanning Laser Microscopy (CLSM), and fibroblast cytotoxicity was evaluated by the MTT assay. III) Cytotoxicity was tested in oral keratinocytes by XTT assay, inhibition and eradication of single biofilms was analyzed by crystal violet and the effect on multi-species biofilms was evaluated by qPCR. SEM results showed the presence of Na, O and Cl after treatment with T4ol and Carvacrol. All surfaces showed hydrophilic characteristics and surface free energy (SFE) values between 5.5 mN/m and 3.4 mN/m. Viability test and fluorescence microscopy showed no decrease in cell viability and adhesion. MIC values were Carvacrol 0.007% and 0.002% respectively for *P. gingivalis* and *F. nucleatum* and T4ol 0.06% for both microorganisms. MBC values were similar to MICs. The MBIC values were Carvacrol 0.03%, 0.06% and T4ol 0.06%, 0.24%, respectively, for *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. Anti-biofilm activity using Carvacrol (0.26%, 0.06%) and T4ol (0.95%, 0.24%) was observed through CFU and CLSM and showed cytotoxic activity like Chlorhexidine. T4ol 0.19% and Carvacrol 0.06% did not affect the viability of epithelial cells. Inhibition and eradication of simple and multi-species biofilms were observed, especially in periodontal pathogens. Therefore, we can conclude that T4ol and Carvacrol do not alter the surface properties of Ti surfaces and allow an adequate interaction with cells involved in the re-osseointegration process; and specific concentrations of these compounds without toxicity to human cells, reduced the number of periodontal pathogens in single and multi-species biofilms.

Key words: Biofilms. Periodontal diseases. Titanium. Phytotherapeutic medicines. In vitro techniques.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 PROPOSIÇÃO	25
3 PUBLICAÇÕES	26
3.1 Publicação 1.....	26
3.2 Publicação 2.....	43
3.3 Publicação 3.....	67
4 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES.....	93
ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um sistema dinâmico continuamente colonizado por microrganismos, e a relação entre doença periodontal e biofilme dental já está bem estabelecida. A literatura relata a ocorrência de mais de 700 espécies microbianas, que podem colonizar diferentes tipos de superfícies naturais (dentes, mucosa) ou artificiais (prótese, implantes dentários)¹. Aproximadamente 415 espécies presentes no biofilme dental subgengival podem ser encontrados em diferentes casos de periodontite e doença peri-implantar, e a presença de microrganismos específicos e o acúmulo de biofilme bacteriano podem induzir à resposta inflamatória^{2,3}.

A doença periodontal é uma doença inflamatória multifatorial⁴ caracterizada clinicamente por inflamação, sangramento à sondagem e pronunciada perda de inserção e possui como fator etiológico o biofilme dental⁵. Assim como a periodontite, a doença peri-implantar se desenvolve quando ocorre um desequilíbrio entre a reposta do hospedeiro e a microbiota e, conseqüentemente, as alterações inflamatórias peri-implantares se iniciam como resultado do acúmulo de biofilme com predominância de microrganismos anaeróbios como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tanarella forsythus*^{6,7}. A colonização bacteriana nas superfícies de implantes e nos tecidos gengivais pode ocorrer minutos após a instalação dos implantes dentários^{8,1} e a composição da microbiota ao redor dos novos implantes instalados, após 10 dias, torna-se semelhante à microbiota de dentes comprometidos com doença periodontal⁹. No entanto, o padrão de colonização em implantes dentários parece ser inicialmente mais lento do que em dentes naturais¹.

No processo de formação do biofilme, superfícies naturais e de implantes dentários são imediatamente recobertos por mucoproteínas salivares formando a película adquirida, a qual é um fator imperativo para a adesão bacteriana¹⁰. Colonizadores primários no biofilme são predominantemente Gram-positivos do gênero *Streptococcus* (até 80%) e *Actinomyces*^{11,12} e as camadas subsequentes de bactérias se aderem pelo processo denominado coagregação¹³. Como a população bacteriana aumenta dentro do biofilme o conteúdo de oxigênio torna-se empobrecido, tornando o ambiente mais adequado para a colonização de bactérias anaeróbias. Esta depleção leva à proliferação dos colonizadores secundários predominantemente anaeróbios Gram-negativos e organismos filamentosos^{14,11}.

Fusobacterium nucleatum é considerado um microrganismo intermediário entre os colonizadores primários e secundários devido a sua capacidade de adesão e coagregação com todas as outras espécies dentro do biofilme¹⁵⁻¹⁷. Finalmente, as espiroquetas tais como *Treponema denticola*, devido a sua motilidade, ajudam na proliferação e invasão do biofilme aos tecidos adjacentes^{14,11}.

A presença de microrganismos é um fator importante para o desenvolvimento de peri-implantite e os tratamentos disponíveis buscam reduzir a carga microbiana, eliminar a inflamação da mucosa peri-implantar e descontaminar a superfície do implante com a finalidade de preservar o osso de suporte e, se possível realizar a regeneração óssea¹⁸. Superfícies de implantes de titânio podem ser descontaminadas utilizando-se meios mecânicos (curetas dentais, raspadores ultrassônicos, procedimentos abrasivos de ar-pó) e/ou químicos (ácido cítrico, H₂O₂, digluconato de clorexidina, e EDTA), geralmente associados com antibióticos locais ou sistêmicos^{19,20}. Desta forma, a antissepsia e o uso de antibióticos locais e sistêmicos como coadjuvantes são eficazes em curto prazo para a eliminação das bactérias⁶. Não existe consenso na literatura para o tratamento de infecções peri-implantares devido à heterogeneidade dos estudos e a variabilidade dos tipos de superfícies de implantes¹⁸. Entretanto, em alguns casos o tratamento aplicado parece não ser capaz de devolver ou manter a saúde peri-implantar, podendo ser explicado pela persistência ou recolonização de microrganismos²¹. Os diferentes tratamentos propostos para a peri-implantite combinam diferentes métodos, incluindo técnicas regenerativas e ressectivas, que envolvem ou não o uso de enxertos, membranas e implantoplastia²⁰. É comum em todos os tratamentos a necessidade da descontaminação da superfície afetada, o que é fundamental para alcançar a reosseointegração²². Contudo, é importante destacar que alguns desses métodos poderiam danificar as propriedades de superfície dos implantes ou promover a resistência bacteriana²³.

A reação das células e dos tecidos com os biomateriais depende das propriedades do material, topografia superficial, composição e seu comportamento em contato com os fluidos corporais²⁴. Na adesão celular, a energia livre de superfície pode desempenhar um papel importante não só sobre a adsorção de proteínas, mas também em relação à adesão das células e ao posterior espalhamento destas^{25,26}. De acordo com Colvin et al.²⁷, as superfícies, quando hidrofóbicas, diminuem a quantidade de proteínas aderidas na superfície do

material. As mudanças físicas da superfície alteram a expressão dos sítios ligantes das mesmas que, conseqüentemente, irão interagir com os receptores celulares. Por conseguinte, é possível afirmar que as características físicas, tais como rugosidade e energia livre de superfície, assim com as propriedades químicas das mesmas, podem contribuir positivamente para a adesão de células epiteliais e conjuntivas^{28,29}.

A restauração da biocompatibilidade das superfícies de titânio contaminadas depende da preservação das propriedades de superfície do implante. As terapias utilizadas no tratamento das doenças peri-implantares assim como o biofilme residual induzem alterações nas propriedades químicas e físicas da superfície e, conseqüentemente, mudanças na camada de óxido relacionada ao pH, resultando assim em menor energia de superfície e, portanto, influenciando negativamente na adesão celular^{30,24,31,32}. Kotsakis et al.³³ mostraram que agentes químicos usualmente utilizados no tratamento da peri-implantite, tais como clorexidina 0,12%, ácido cítrico 20% e EDTA 24%-NaOCl 1.5% deixam resíduos que provocam alterações físico-químicas sobre as superfícies de titânio. Estes resíduos afetam negativamente a biocompatibilidade das superfícies assim como a resposta de células osteoblásticas, independente do seu efeito antimicrobiano. Os mesmos autores não recomendam a clorexidina para descontaminar superfícies de titânio pois produz efeitos citotóxicos nas superfícies descontaminadas e pode comprometer a biocompatibilidade das superfícies.

Grande atenção tem sido dada à identificação de potentes agentes antimicrobianos para a descontaminação da superfície do implante. A clorexidina tem sido utilizada amplamente no tratamento da redução do biofilme subgengival e controle da inflamação, devido a sua substantividade³⁴, propriedades biológicas e atividade antibacteriana de amplo espectro (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas)³⁵. Apresenta eficácia na diminuição da carga bacteriana sobre superfícies de titânio quando comparado a outros descontaminantes como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido cítrico³⁶.

Entretanto, a clorexidina apresenta desvantagens frequentemente observadas, tais como, coloração dos dentes e alteração do paladar³⁷. Segundo Gianelli et al.³⁸ a clorexidina pode induzir apoptose e necrose celular devido a perturbação da função mitocondrial, aumento intracelular de Ca^{2+} e estresse oxidativo. A clorexidina também mostrou inibir a proliferação celular e síntese de colágeno³⁹. Portanto, a aplicação direta da clorexidina durante a terapia regenerativa

no tratamento de doenças peri-implantares poderia exercer efeito tóxico sobre fibroblastos gengivais, células endoteliais e especialmente sobre osteoblastos alveolares, interferindo assim negativamente no reparo de infecções orais³⁸. Esses efeitos negativos poderiam explicar a redução das contagens bacterianas, mas nenhuma melhora significativa na cicatrização dos tecidos. Desse modo, a comunidade odontológica ainda está a procura de novas drogas terapêuticas para a prevenção e tratamento de biofilmes orais assim como doenças relacionadas^{40,41}.

Os esforços atuais para o controle do biofilme abrem novas perspectivas no uso de terapias alternativas. Diversos produtos de origem natural apresentam resultados significativos sobre patógenos bucais e controle da resposta inflamatória mostrando que agentes fitoterápicos podem ser veículos de prevenção e controle de doenças bucais infecciosas assim como uma alternativa eficaz para superar a resistência microbiana⁴²⁻⁴⁶. Desta forma, diferentes produtos naturais têm sido investigados como promissores agentes para prevenção e tratamento das doenças periodontais e peri-implantares^{40,46}. O Carvacrol, um monoterpene fenol (2-metil- 5-(1-metiletil) fenol) presente nos óleos voláteis de *Thymus vulgaris*, *Carum copticum* e *Oreganum spp.*, é o principal constituinte natural (70%) destas plantas aromáticas⁴⁷. Apresentam diferentes atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, antígeno-tóxica e hepatoprotetora, destacando sua atividade antimicrobiana de largo espectro sobre bactérias patogênicas e leveduras incluindo microrganismos formadores de biofilmes resistentes a drogas⁴⁰. Além disso, o Carvacrol possui efeito inibitório sobre diferentes microrganismos, sendo capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas liberando lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana^{48,49}, além de não possuir efeitos citotóxicos em baixas concentrações^{49,40}.

Outro fitoterápico que vem se destacando é o Terpinen-4-ol (porção solúvel da *Melaleuca alternifolia*) que atua na indução da perda da membrana, interferindo na integridade e fisiologia da célula do microrganismo⁵⁰. O mesmo apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (antibacteriana, antiviral e antifúngica) e atividade anti-inflamatória⁵¹⁻⁵³. O Terpinen-4-ol é um monoterpene caracterizado por ser o principal composto da *Melaleuca alternifolia* e outras plantas tais como *Hajeb Layoun arborea* (Tunisia) e *Alpinia zerumbet* e, além das propriedades citadas acima, estudos indicam que possui efeito antitumoral^{50,54,53}.

Considerando que o Terpinen-4-ol e o Carvacrol possuem propriedades antimicrobianas, há poucos estudos na literatura avaliando esta propriedade sobre bactérias periodontopatogênicas. Além disso, estudos adicionais são necessários para entender o comportamento celular em resposta às superfícies de implantes descontaminadas com agentes de origem natural. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi analisar as modificações físico-químicas da descontaminação de superfícies de titânio com Terpinen-4-ol e Carvacrol e a resposta celular de fibroblastos e osteoblastos, assim como avaliar *in vitro* suas propriedades antimicrobianas e citotóxicas sobre biofilmes periodontais.

4 CONCLUSÃO

Com base nos achados do presente estudo, pode-se demonstrar que Terpinen-4-ol e Carvacrol usados durante a descontaminação de superfícies de titânio não afeta nas propriedades de superfície e permite uma adequada proliferação e adesão celular de células envolvidas no processo de re-osseointegração. Estes compostos mostraram atividade antimicrobiana, promovendo efeitos bactericidas, bacteriostáticos, antibiofilme e não citotóxica em baixas concentrações. Além disso, concentrações baixas e não citotóxicas de Terpinen-4-ol e Carvacrol podem inibir e erradicar patógenos periodontais tanto em biofilmes simples e multi-espécie. Devido a estas propriedades, ambos os monoterpenos podem representar uma abordagem promissora para prevenção e tratamento de doenças peri-implantes.

REFERÊNCIAS*

1. Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(1): 66-72.
2. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53: 167-81.
3. Malcolm J, Millington O, Millhouse E, Campbell L, Adrados Planell A, Butcher JP et al. Mast cells contribute to *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss. *J Dent Res.* 2016; 95(6): 704-10.
4. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planning. *J Clin Dent.* 2007; 18(2): 1-5.
5. Qin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YK, Zhou CN, Zhang ZG. Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2008; 43(2): 162-7.
6. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis: a review. *Head Face Med.* 2014 Sep 3; 10: 34.
7. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep.* 2014; 13(4): 6602.
8. Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res.* 2007; 18(4): 501-8.
9. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, Van Steeberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of “pristine” peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17(1): 25-37.
10. Kolenbrander PE1, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7): 471-80.
11. Teughels W, Quirynen M, Jakubovics N. Periodontal microbiology. In: Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F. *Clinical periodontology.* 11th ed. St Louis: Elsevier; 2012. p. 232-70.
12. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial ecology. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. *Oral microbiology and immunology.* 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2014. p. 97-102.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Eglund PG, Marquis RE. Oral microbial physiology. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Oral microbiology and immunology. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2014. p. 113-38.
14. Scannapieco FA. The oral environment. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Oral microbiology and immunology. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2014. p. 57-72.
15. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979; 25(2): 685-93.
16. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun*. 1996; 64(6): 2094-100.
17. Ebersole JL, Feuille F, Kesavalu L, Holt SC. Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. *Microb Pathog*. 1997; 23(1): 23-32.
18. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Solá-Ruiz MF, Ferrer-García JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(6): 869-76.
19. Norowski PA Jr, Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 88(2): 530-43.
20. Figuero E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2014; 66(1): 255-73.
21. Drisko CH. The use of locally-delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(11): 947-52.
22. Tastepe CS, Liu Y, Visscher CM, Wismeijer D. Cleaning and modification of intraorally contaminated titanium discs with calcium phosphate powder abrasive treatment. *Clin Oral Implants Res*. 2013; 24(11): 1238-46.
23. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012; 23(6): 643-58.
24. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden F. Influence of mechanical instruments on the biocompatibility of titanium dental implants surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2015; 26(7): 841-50.
25. Jansen JA, Den Braber ET, Walboomers XF, De Ruijter JE. Soft tissue and epithelial models. *Adv Dent Res*. 1999; 13: 57-66.

26. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AEF, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Impl Res.* 2006; 17 (Suppl. 2): 55-67.
27. Colvin RB. Fibrinogen–fibrin interactions with fibroblasts and macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 621-33.
28. Teng F, Ko C, Kuo H, Hu J, Lin J, Lou C et al. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012; 2012: 687291. Epub 2012 Jan 12.
29. Sardin S, Morrier J, Benay G, Barsotti O. In vitro streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. *J Oral Rehabil.* 2004; 31(2): 140-8.
30. Valderrama P, Blansett JA, Gonzalez MG, Cantu MG, Wilson TG. Detoxification of implant surfaces affected by peri-implant disease: an overview of non-surgical methods. *Open Dent J.* 2014; 8: 77-84.
31. Wheelis SE, Gindri IM, Valderrama P, Wilson TG Jr., Huang J, Rodrigues DC. Effects of decontamination solutions on the surface of titanium: investigation of surface morphology, composition, and roughness. *Clin Oral Implants Res.* 2016; 27(3): 329-40.
32. Kasemo B, Lausmaa J. Biomaterial and implant surfaces: a surface science approach. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1988; 3(4): 247-59.
33. Kotsakis GA, Lan C, Barbosa J, Lill K, Chen R, Rudney J, et al. Antimicrobial agents used in the treatment of peri-implantitis alter the physicochemistry and cytocompatibility of titanium surfaces. *J Periodontol.* 2016; 87(7): 809-19.
34. Suarez F, Monje A, Galindo-Moreno P, Wang HL. Implant surface detoxification: a comprehensive review. *Implant Dent.* 2013; 22(5): 465-73.
35. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000.* 1997; 15: 55-62.
36. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(8): 866-72.
37. Guggenheim B, Meier A. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011; 121(5): 432-41.
38. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro.* 2008; 22(2): 308-17.
39. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J.* 2010; 43(5): 430-5.

40. Ciandrini E, Campana R, Federici S, Manti A, Battistelli M, Falcieri E et al. In vitro activity of Carvacrol against titanium-adherent oral biofilms and planktonic cultures. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(8): 2001-13.
41. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SD. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res*. 2008; 22(9): 1162-7.
42. Abe S, Sato Y, Inoue S, Ishibashi H, Maruyama N, Takizawa T et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2003; 44(4): 285-91.
43. Almeida FC, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol*. 2000; 73(1-2): 53-60.
44. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(3): 327-32.
45. Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*. 2009; 80(6): 313-9.
46. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(3): 349-56.
47. Baser KH. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(29): 3106-19.
48. La Storia A, Ercolini D, Marinello F, Di Pasqua R, Villani F, Mauriello G. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Res Microbiol*. 2011; 162(2): 164-72.
49. Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto VJ. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*. 2009; 15(4): 164-7.
50. Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR et al. Use of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) oil in dentistry: perspectives on its use as alternative antimicrobial to infectious diseases of oral origin. *Rev Bras PI Med*. 2011; 13(4): 492-9.
51. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(3): 327-32.
52. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(4): 343-7.

53. Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1 β , IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflamm Res*. 2014; 63(9): 769-78.
54. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000; 49(11): 619–26.