

UNIVERSIDADE SANTO AMARO - UNISA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

CRISTINE HARALAMBOS BASSOUKOU

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE DIFERENTES TRATAMENTOS
SOBRE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE TITÂNIO DE
SUPERFÍCIE LISA E SUPERFÍCIE TRATADA**

SÃO PAULO

2023

Cristine Haralambos Bassoukou

EFEITO ANTIMICROBIANO DE DIFERENTES TRATAMENTOS
SOBRE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE TITÂNIO DE
SUPERFÍCIE LISA E SUPERFÍCIE TRATADA

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação ***Strictu Sensu*** em Odontologia da Universidade Santo Amaro para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Hiromi Tanaka

SÃO PAULO

2023

B323e Bassoukou, Cristine Haralambos.

Efeito antimicrobiano de diferentes tratamentos sobre *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada / Cristine Haralambos Bassoukou. São Paulo, 2023.

51 p.: il., color.

Tese (Doutorado em Odontologia) — Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientadora: Prof.^a Me. Dr.^a Marcia Hiromi Tanaka.

1. Biofilme. 2. *Streptococcus gordonii*. 3. Gases de plasma. I. Tanaka, Marcia Hiromi, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CRISTINE HARALAMBOS BASSOUKOU

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE DIFERENTES TRATAMENTOS
SOBRE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE TITÂNIO DE
SUPERFÍCIE LISA E SUPERFÍCIE TRATADA**

Tese apresentada à Universidade Santo Amaro – UNISA, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Orientadora: Prof^a. Dra. Marcia Hiromi Tanaka.

São Paulo, 27 de novembro de 2023.

Banca Examinadora

1) Marcia Hiromi Tanaka

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Luana Campos

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Debora Pallos

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Ronilza Matos

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Alexander D'Alvia Salvoni

Professor, doutor.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

CONCEITO FINAL: _____

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, o autor da vida, por me permitir realizar este sonho. Dedico-o aos meus amados pais, exemplos de determinação e amor, que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. E dedico-o também aos meus queridos irmãos e família que sempre me incentivaram a trilhar novos caminhos e a voar novos voos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me conduzir, me orientar, e me dar discernimento e coragem nessa caminhada. “Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?” (Sl. 116:12).

Gratidão que não cabe no peito aos meus amados pais, meus exemplos de retidão e amor. “Pai, mãe, faltam-me palavras para expressar o quanto sou amada, edificada e abençoada por vocês diariamente.”

Agradeço aos meus irmãos, Ivy e Jean, por seu amor incondicional e incentivo constantes, e a toda a minha família pelas orações e carinho.

Ao meu amor, Olavo Hoehr, por ter me motivado a prestar o Doutorado, por me acalmar quando achei que não fosse dar conta e por se alegrar com minhas conquistas.

À minha equipe, por todo amor, orações e suporte na Clínica Bass, neste período bastante intenso da minha vida. Tayná Tieppo, Rita Dadamos e Eliana Lima, muito obrigada.

Agradeço imensamente à estimada Prof^a Dr^a Cristiane Yumi Koga-Ito por abrir as portas do Laboratório de Genoma da UNESP-SJC para mim, e me permitir realizar minha pesquisa neste local tão conceituado.

Gratidão à técnica de laboratório, Clélia Aparecida de Paiva, pela preciosa ajuda durante a execução do meu experimento, e pela amizade que guardarei para sempre.

Ao querido Diego Morais da Silva, minha gratidão, por me ensinar a operar o equipamento de Plasma e pela rica troca de conhecimentos.

À querida Aline Graça Sampaio, que me permitiu ajudar em seu experimento no Genoma Lab, o que me trouxe conhecimento e base para iniciar minha pesquisa,

Muita gratidão ao estimado Prof. Dr. Alexander Salvoni, por me inspirar e ensinar tanto, quando eu ainda engatinhava na Implantodontia.

Às minhas amadas amigas-irmãs, Patricia Salvoni Cassoli, Fernanda Siliano Henderson, e Cinthia Leandro Pereira, pela caminhada juntas. Vocês foram e sempre serão importantes em minha jornada na Implantodontia e na vida.

A cada um dos meus colegas de Doutorado, agradeço imensamente o convívio juntos, a troca de experiências e principalmente a amizade que construímos. Em especial, aos queridos Jasiel Oliveira e Marcelo Castro, pelo convívio mais próximo na publicação de artigos, painéis e também pela ajuda em minha pesquisa.

Gratidão ao prezado Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, que me permitiu realizar este sonho, ao me aprovar no concurso de Doutorado, e à sua talentosa equipe de professores: Dra. Angelica Castro Pimentel, Dr. Caio Roman Torres, Dra. Débora Pallos, Dra. Fabiana Martins e Martins de Oliveira, Dra. Heloisa Fonseca Marão, Dra. Leticia Cidreira Boaro, Dra. Luana de Campos, Dr. William Cunha Brandt e Dra Yeon Jung Kim.

Expresso aqui minha grande admiração e eterna gratidão à minha amada orientadora, Prof^a Dr^a Marcia Hiromi Tanaka, que soube dosar perfeitamente firmeza e doçura, na condução desse trabalho. “Obrigada Professora Marcia, pelos ensinamentos, pela paciência, por confiar em mim e por literalmente segurar na minha mão, quando a microbiologia ainda me assustava. Obrigada pelas conversas e pela amizade que construímos, a qual espero levar por toda a vida.”

Agradeço à Universidade de Santo Amaro, pela bolsa concedida. Que minha pesquisa possa honrar o nome desta casa, onde me graduei, e que 20 anos depois me acolheu como aluna de Doutorado.

Minha gratidão à CAPES por todo apoio nessa pesquisa.

RESUMO

Os implantes dentários são parte indispensável da odontologia clínica. Embora a taxa de sobrevivência dos implantes dentários tenha sido relatada como sendo acima de 90%, algumas condições levam ao fracasso dos implantes e põem em risco as altas taxas de sucesso atuais. Os implantes podem falhar devido a fatores associados à remodelação óssea ou a fatores associados às bactérias, como por exemplo, o *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) que é um dos colonizadores primários na formação do biofilme bacteriano na superfície dos implantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar, imediatamente e num acompanhamento de 48 horas, diferentes tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* formado em discos de titânio. Um total de 99 discos, divididos em 2 grupos, superfície lisa (SL) e superfície tratada (ST) e subdivididos em 6 subgrupos, de acordo com o tratamento antimicrobiano: plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA), BlueM® (B), terapia fotodinâmica (PDT), clorexidina (CX), Chimiolux® (CH) e um grupo controle (CT), sem tratamento. O biofilme de *S. gordonii* foi submetido aos tratamentos acima citados por 5 minutos. Após os tratamentos, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) em meio específico, de cada subgrupo avaliado, em metade das amostras. A outra metade das amostras foi mantida em meio específico por mais 48 hs, para posterior contagem das UFC/ml. Na contagem imediata, o grupo PBTPA apresentou a maior atividade antimicrobiana em comparação com todos os subgrupos avaliados ($p < 0,001$), tanto em SL quanto em ST. No acompanhamento de 48 hs., o grupo PBTPA apresentou a menor atividade antimicrobiana em comparação com todos os subgrupos avaliados, tanto em SL quanto em ST. Concluiu-se que, dentre os tratamentos antimicrobianos avaliados, o PBTPA parece ter um efeito antimicrobiano imediato promissor, porém seus efeitos num acompanhamento de 48 hs. sobre superfície de titânio devem ser melhor estudados.

Palavras-chave: *Streptococcus gordonii*; Gases de Plasma; Terapia Fotodinâmica; Clorexidina; Biofilme.

ABSTRACT

Dental implants are an indispensable part of clinical dentistry. Although the survival rate of dental implants has been reported to be over 90%, some conditions lead to implant failure and jeopardize the current high success rates. Implants can fail due to factors associated with bone remodeling or factors associated with bacteria, such as *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), which is one of the primary colonizers in the formation of bacterial biofilm on the surface of implants. The aim of this study was to evaluate different antimicrobial treatments on *S. gordonii* biofilm formed on titanium disks, both immediately and after 48 hours. A total of 99 discs were divided into 2 groups, smooth surface (SL) and treated surface (ST) and subdivided into 6 subgroups according to the antimicrobial treatment: low temperature plasma under atmospheric pressure (PBTPA), BlueM® (B), photodynamic therapy (PDT), chlorhexidine (CX), Chimiolux® (CH) and a control group (CT), untreated. The *S. gordonii* biofilm was subjected to the above treatments for 5 minutes. After the treatments, the colony-forming units per milliliter (CFU/ml) of each subgroup evaluated were counted in half of the samples. The other half of the samples were kept in the specific medium for a further 48 hours for subsequent counting of CFU/ml. In the immediate count, the PBTPA group showed the highest antimicrobial activity compared to all the subgroups evaluated ($p < 0.001$), both in SL and ST. At 48-hour follow-up, the PBTPA group showed the lowest antimicrobial activity compared to all the subgroups evaluated, both in SL and ST. It was concluded that, among the antimicrobial treatments evaluated, PBTPA seems to have a promising immediate antimicrobial effect, but its effects at a 48-hour follow-up on the titanium surface should be better studied.

Keywords: *Streptococcus qagordonii*; Plasma Gases; Photodynamic Therapy; Chlorhexidine; Biofilm.

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Revisão de Literatura	14
2.1	Clorexidina	14
2.2	BlueM®	16
2.3	Terapia Fotodinâmica	18
2.4	Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica	21
3	Objetivo	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivo específico	24
4	Materiais e Métodos	25
4.1	Avaliação do efeito dos tratamentos antimicrobianos sobre células planctônicas	25
4.2	Avaliação do efeito dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> sobre os discos de titânio	26
4.2.1	Seleção dos discos de titânio para cada grupo de tratamentos antimicrobianos	26
4.2.1.1	Formação do biofilme de <i>S. gordonii</i> em disco de titânio	26
4.2.2	Efeito dos tratamentos antimicrobianos sob o biofilme formado	30
4.2.2.1	Tratamento imediato	30
4.2.2.2	Acompanhamento após 48 horas do tratamento	36
5	Análise Estatística	38
6	Resultados	39
6.1	Efeito dos produtos antimicrobianos sobre células planctônicas	39

6.2 Efeito dos produtos antimicrobianos sobre biofilme formado de <i>S. gordonii</i> em diferentes superfícies de discos de titânio em diferentes tempos de tratamento	40
6.2.1 Superfície lisa	40
6.2.1.1 Tratamento imediato	40
6.2.1.2 Acompanhamento após 48 horas do tratamento	41
6.2.2 Superfície tratada	43
6.2.2.1 Tratamento imediato	43
6.2.2.2 Acompanhamento após 48 horas do tratamento	44
7 Discussão	45
8 Conclusão	50
Referências	51

1. Introdução

Terapias com implantes dentais são modalidades de tratamento bem estabelecidas e que proporcionam benefícios para pacientes parcial ou totalmente edêntulos. Espera-se que o mercado mundial de implantes dentários alcance US\$ 13 bilhões em 2023. Embora a taxa de sobrevivência dos implantes dentários tenha sido relatada como sendo acima de 90%, algumas condições levam ao fracasso dos implantes e põem em risco as altas taxas de sucesso atuais.^{1,2}

Os implantes dentais podem falhar em diferentes pontos no tempo, a partir do momento em que são instalados. Trauma cirúrgico, tipo de conexão implante-*abutment*, desconexão e reconexão do pilar, presença de *microgap*, bem como mal posicionamento do implante, pertencem ao grupo de fatores associados à remodelação óssea. Reações inflamatórias causadas pelo excesso de cimento nas restaurações protéticas cimentadas, mobilidade do *abutment* resultante de falhas protéticas, e a progressiva perda óssea causada pela peri-implantite, pertencem ao segundo grupo de fatores associados às bactérias.²

A periimplantite pode ser influenciada pela colonização microbiana progressiva da superfície e pela formação de comunidades microbianas denominadas biofilmes.³

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas incorporadas em substâncias poliméricas extracelulares. Essa matriz de substâncias funciona como um escudo contra riscos externos, e pode aumentar a resistência aos antibióticos em 5 mil vezes.⁴ A composição do biofilme peri-implantar é mais complexa quando comparada ao biofilme periodontal.²

O mecanismo de formação do biofilme e o papel do microbioma peri-implantar são componentes centrais na prevenção da maioria das complicações biológicas. As descobertas microbiológicas nos implantes dentários, ou seja, a interação com o biofilme oral que é específico para implantes dentários e o que é conhecido em relação ao biofilme como um fator de risco para estágios específicos do tratamento com implantes, foram amplamente descritas na literatura.^{5,6}

A cavidade oral é habitada por mais de 700 diferentes espécies bacterianas.⁷ A maioria dessas bactérias são habitantes comensais inofensivos, desde que a homeostase microbiana esteja mantida.⁸

Streptococcus gordonii (*S. gordonii*) é uma bactéria comensal da cavidade oral, e como colonizador primário ele inicia a formação do biofilme através da adesão aos dentes e superfície dos implantes⁹⁻¹¹, proporcionando então sítios de acoplamento para as espécies bacterianas que são colonizadoras secundárias e tardias.

Na formação do biofilme oral, os colonizadores bacterianos primários como *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) são conhecidos por desempenharem um papel crucial na adesão bacteriana de colonizadores intermediários (*Fusobacterium nucleatum*) e colonizadores tardios (*Porphyromonas gingivalis*). Portanto, a eliminação dos colonizadores primários da superfície dos implantes dentários poderia ser decisiva para o sucesso dos implantes a longo prazo.¹²

Sendo assim é considerado imperativo que estudos futuros foquem na redução ou na eliminação do biofilme. Diversas técnicas para a descontaminação dos implantes têm sido estudadas ao longo dos anos, porém nenhuma delas com resultados ideais, o que ainda torna a descontaminação da superfície dos implantes uma tarefa desafiadora.¹³

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes tratamentos sobre *S. gordonii* em discos de titânio de diferentes superfícies.

2. Revisão de Literatura

Atualmente, os implantes dentários são uma parte indispensável da odontologia clínica, sendo um mercado que movimenta bilhões por ano.¹ A osseointegração dos implantes dentários é necessária para o seu sucesso a longo prazo. No entanto, a falta de higiene, a inflamação e a infecção ao redor dos implantes podem levar à peri-implantite.¹³ A prevalência de peri-implantite pode ocorrer em 20% dos pacientes durante o 5º ao 10º ano após a instalação do implante.¹⁴

A terapia cirúrgica tem sido defendida como uma forma de interromper a progressão da doença e restabelecer a saúde peri-implantar. No entanto uma das tarefas mais desafiadoras e cruciais no tratamento da peri-implantite é a remoção do biofilme para alcançar a re-osseointegração e a redução das bolsas peri-implantares.¹⁵

Em vista do apontado acima, esta revisão tem a finalidade de apresentar o que a literatura científica expõe acerca dos tratamentos avaliados neste estudo, quanto a sua eficiência antimicrobiana.

2.1 Clorexidina

A clorexidina (CX) é uma bisbiguanida que foi desenvolvida na década de 1940 no Reino Unido e comercializada como desinfetante geral. Na década de 1970, devido a sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, descobriu-se que essa atividade também tinha efeito antiplaca na cavidade bucal e, em 1976, estava disponível como enxaguante bucal antisséptico, sendo utilizada por dentistas e pelo público em geral para evitar o acúmulo de biofilme bacteriano. A disbiose desse microbioma bucal tem sido correlacionada como responsável pela patogênese de várias doenças bucais, incluindo halitose, cárie, gengivite e periodontite. Atualmente, o enxaguatório bucal com CX é o agente antimicrobiano mais utilizado e o padrão ouro na redução de microrganismos bucais. Na odontologia, diversos produtos com CX estão disponíveis e incluem formulações como enxaguatórios bucais, géis, chips e vernizes, em diferentes concentrações.^{16,17}

Ready et al. (2015)¹⁸ avaliaram a ação da clorexidina (CX) (0,2 e 2%) em diferentes tempos sobre biofilmes multi espécies (*Streptococcus sanguinis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) de 48hs e 168hs de maturação. Concluíram que a clorexidina a 2% foi o agente mais eficaz, dependendo do tempo de exposição e do estágio de desenvolvimento do biofilme. Já a clorexidina a 0,2% teve o menor efeito de eliminação contra as cepas dos biofilmes de 48 horas em todos os momentos.

Ryu et al. (2015)¹⁹ avaliaram o efeito antimicrobiano contra *S. gordonii* de diferentes tipos de superfícies de titânio: uma mistura ácida de 10% de ácido nítrico e 5% de fluoreto de hidrogênio (HNF), meio de jateamento reabsorvível (RBM), jateamento de areia e ataque ácido (SLA) e controle sem tratamento de superfície. Todas as superfícies foram expostas a 0,5% de CX por 1 minuto durante 5 dias. Concluíram que no teste de difusão, a liberação de CX, nos grupos SLA e o RBM, foram maiores e conseqüentemente apresentaram maior atividade antimicrobiana.

Podhorsky et al. (2016)²⁰ avaliaram a efetividade antimicrobiana de três produtos utilizados como selantes de dois sistemas de implante. As partes internas desses dois sistemas foram preenchidas com gel de clorexidina a 0,2%, silicone especial, massa de vedação e nenhum material. Os conjuntos pilar-implante foram incubados numa suspensão bacteriana de *Escherichia coli* durante 1 semana. Assim, a contaminação dos conjuntos pilar-implante foram avaliadas pela técnica de PCR (reação de polimerase em cadeia) quantitativa em tempo real. Os autores relataram que todos os agentes aplicados foram capazes de reduzir significativamente a carga bacteriana e a CX tiveram a menor contaminação dentre os produtos avaliados.

Krishnamoorthy et al. (2022)²¹ realizaram uma revisão de literatura sobre o efeito da CX nos osteoblastos e na topografia da superfície dos implantes dentários. Concluíram que o uso da clorexidina deve ser desencorajado como descontaminante de superfície pois pode alterar a topografia da superfície dos implantes dentários e causar citotoxicidade celular prejudicando o potencial de reosseointegração causando a falha do implante dentário.

Lee et al. (2019)²² realizaram um estudo para identificar os agentes de aplicação local remanescentes nas superfícies dos implantes após a aplicação de

vários métodos de limpeza. Após o preparo da superfície dos implantes, com jateamento de areia e ataque ácido, foram utilizados: gel de CX, solução de tetraciclina, dois tipos de agentes de cloridrato de minociclina e solução salina (controle). Concluíram que, na superfície dos implantes, foi observado a presença de resíduos destes agentes de liberação local, isto pode interferir na reintegração óssea e atuar como um reservatório de microrganismos.

Ye et al. (2023)²³ realizaram uma revisão sistemática e metanálise avaliando a eficácia da CX no tratamento não cirúrgico da peri-implantite/mucosite. Concluíram que as evidências sobre a eficácia da CX para a mucosite são conflitantes devido ao número limitado de estudos, e que parece não haver um impacto significativo da CX nos resultados da mucosite e peri-implantite.

2.2 BlueM[®]

A fórmula do BlueM[®] (B) foi desenvolvida pelo holandês Dr. Peter Blijdorp e uma equipe de especialistas. Sua ação é baseada no oxigênio ativo sendo liberado de forma controlada e direta para os tecidos lesionados. O contato do produto com as superfícies úmidas da mucosa, saliva e sangue geram uma reação de química, liberando oxigênio na forma de peróxido de hidrogênio para o meio. Em baixas concentrações (0,003% a 0,015%), o peróxido de hidrogênio liberado na quebra do perborato de sódio, apresenta uma ação antibacteriana e se mostra capaz de promover a angiogênese, aumento da síntese de colágeno, aumento do metabolismo celular, e fatores de crescimento liberados pelo organismo, melhorando a capacidade de transporte de oxigênio.²⁴⁻²⁶

Niveda & Kaarthikeyan em 2020, realizaram um ensaio clínico randomizado de boca dividida que compara o gel liberador de oxigênio (BlueM[®]) com o gel de clorexidina a 1%. Após a raspagem supra e sub-gengival, a medicação foi distribuída aleatoriamente. Concluíram que o grupo BlueM[®] apresentou melhor potencial na redução da profundidade de sondagem em comparação com o gel de CX a 1%.

Cunha et al. (2019)²⁶ analisaram a eficácia do Colgate Total[®] (CT) e do B em um modelo experimental de gengivite em 1, 12 e 18 semanas. Observou-se

contagens bacterianas mais baixas em ambos os grupos após uma semana de escovação dos dentes. Clinicamente, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os cremes em 1, 12 e 18 semanas para índice de placa e índice gengival. O estudo demonstrou que o B tem eficácia antiplaca e antigengivite comparável ao CT.

Deliberador et al. (2020)²⁵ realizaram um estudo *in vitro* para testar e comparar os efeitos do B sobre *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Foram avaliados: gel de oxigênio a 100% (B1), gel de oxigênio a 75% (B2), gel de oxigênio a 50% (B3) e solução de CX 0,12% a 100% (C1). O B em concentrações mais altas proporcionou um halo de inibição da *P. gingivalis* semelhante ao CX.

Mattei et al. (2020)²⁷ analisaram o efeito citotóxico do B sobre queratinócitos. Concluíram que concentrações mais baixas de B (1 µl/ml) aumentaram a proliferação celular, enquanto concentrações moderadas e mais altas apresentaram um efeito citotóxico.

O mesmo grupo²⁸ em 2021 avaliaram a redução de dor e inflamação pós-operatória com a utilização de B em forma de enxaguante bucal. Concluíram que o B influenciou positivamente na cicatrização dos tecidos, reduzindo a dor e o processo inflamatório, porém estudos clínicos randomizados seriam necessários para comprovar tais observações clínicas.

Shibli et al. (2021)²⁹ avaliaram atividade metabólica do biofilme e a citotoxicidade do B em um biofilme subgengival de 7 dias com 32 espécies relacionadas à periodontite. Foram adotados dois esquemas terapêuticos: (1) tratamento com B, clorexidina (CX) a 0,12% e grupo de controle negativo (sem tratamento) do dia 3 ao dia 6, duas vezes ao dia por 1 minuto de cada vez, totalizando 8 tratamentos e (2) um tratamento de 24 horas em um biofilme cultivado por 6 dias. Concluíram que o B reduziu a quantidade de espécies bacterianas em comparação com a CX durante a formação do biofilme subgengival, mas foi melhor do que a CX na redução das proporções de bactérias do complexo vermelho. Embora o B tenha reduzido os biofilmes subgengivais maduros multiespécies de 6 dias de formação, ele não modificou as proporções dos complexos bacterianos como a CX fez nos biofilmes mencionados acima.

Santos et al. (2023)³⁰ avaliaram a capacidade antimicrobiana do B contra *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e sua influência na expressão do gene de proteínas de ligação a glucanos A (*gbpA*), bem como seu efeito citotóxico em fibroblastos. Os resultados apontam para a eficácia antimicrobiana do B contra *S. mutans*, sua capacidade de modular a expressão do gene *gbpA* e sua baixa citotoxicidade, apoiando o potencial terapêutico do B como um agente alternativo para o controle do biofilme.

Hollaar et al. (2020)³¹ verificaram as evidências disponíveis sobre a eficácia do B. Na base de dados do PubMed foram encontrados 1 estudo controlado randomizado e 1 resumo de um estudo em que o produto B foi examinado. Os estudos de casos clínicos não atendem aos critérios do Case Report Statement and Checklist (CARE). Concluíram que não há evidências de que os produtos de higiene bucal da B sejam mais eficazes do que outros produtos de higiene bucal existentes no mercado.

2.3 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy* - PDT) é uma forma moderna e não invasiva de terapia, utilizada no tratamento de doenças não oncológicas, bem como em cânceres de vários tipos e localizações. A PDT baseia-se na aplicação local ou sistêmica de um composto fotossensível - o fotossensibilizador, que é intensamente acumulado nos tecidos patológicos. As moléculas do fotossensibilizador absorvem a luz do comprimento de onda apropriado, iniciando os processos de ativação que levam à destruição seletiva das células inadequadas. A PDT também é usada no tratamento da inflamação crônica e é uma alternativa interessante no tratamento de infecções bacterianas resistentes a medicamentos.³²

Na PDT clássica, é administrado sistemicamente ou de forma tópica um fotossensibilizador (FS) ao paciente. Após a retenção seletiva do FS nos tecidos-alvo, eles são irradiados com luz para que ocorra a reação fotoquímica com a destruição seletiva dos tecidos danificados. Portanto, o fotossensibilizador é o principal componente da PDT, sendo sensível à luz de um comprimento de onda específico.³³

Wang et al. (2023)³⁴ compararam a eficácia de três abordagens de descontaminação: CX combinado com laser (Er:YAG), terapia fotodinâmica (PDT) e somente CX sobre biofilme bucal formados em superfícies de titânio fixados em aparelhos intra-orais. A CX combinada com o Er:YAG foi superior à CX combinada com a PDT, e a CX sozinha foi melhor do que o controle. Concluíram então que a CX combinada com laser Er:YAG é um método válido para reduzir a vitalidade do biofilme bucal em discos de titânio.

Cai et al. (2019)³⁵ avaliaram a eficácia da desinfecção da aplicação combinada de antissépticos (CX a 0,2% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%) com PDT no biofilme de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) formado em discos de titânio (Ti) com diferentes rugosidades de superfície (polida ou tratada). Concluiu-se que todos os métodos de desinfecção tiveram redução significativa na unidade formadora de bactérias em comparação com o grupo de controle, independente do tipo de superfície. Adicionalmente, a combinação de CX ou H₂O₂ com PDT foi ainda mais eficaz na redução de *S. aureus* em comparação com qualquer um dos tratamentos isoladamente, sugerindo que o uso combinado de antissépticos com PDT poderia ser um método mais eficiente para o tratamento da peri-implantite. Num outro estudo, este mesmo grupo realizou o mesmo experimento com biofilme de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Concluíram que o protocolo combinado (CX + PDT) também foi o mais eficaz na redução de *P. gingivalis* em superfície lisa e em superfície tratada.³⁶

Huang et al. (2019)³⁷ avaliaram o efeito antimicrobiano e os níveis de lipopolissacarídeo residual (LPS), dependente da dose (50, 100 e 200 µg/mL), do pH (4, 7 e 10) do azul de metileno (AM) e o tempo de irradiação do PDT (0, 30 e 60 s) em bactérias Gram-negativas (*P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*) e em bactéria Gram-positiva (*S. mutans*) em uma liga de titânio tratada com jateamento de areia e ataque ácido. Concluíram que o PDT apresentou melhor eficácia antibacteriana com maior concentração de AM associado em um ambiente de pH mais alto com maior tempo de irradiação para as 3 bactérias estudadas, além da redução significativa na concentração de LPS de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

Kim et al. (2017)³⁸ avaliaram o efeito antimicrobiano do PDT no biofilme de *A. actinomycetemcomitans* e *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) formado em discos de titânio com superfície tratada. Os biofilmes formados nos corpos de prova foram subdivididos em: laser de diodo por 60 segundos, azul de metileno (AM) mantido por 60 segundos sem aplicação de laser, PDT 60 segundos e PDT 120 segundos. Concluíram que o PDT 60 e 120 segundos foram mais eficientes na redução da viabilidade do biofilme das duas bactérias analisadas sobre a superfície de titânio.

Decker et al. (2017)³⁹ compararam três abordagens convencionais de PDT (PDT1: Azul de toluidina (AT)+LED de 630 nm, PDT2: AT+ laser de 635 nm, PDT3: Azul de metileno (AM) + laser de 665 nm) e uma abordagem modificada com fotossensibilizador (AT ou AM) com o suplemento de peróxido de hidrogênio a 3% (PDTplus) em cultura planctônica e biofilme de seis patógenos periodontais. Concluíram que o PDTplus apresentou a maior atividade antimicrobiana sinérgica para sistemas baseados em AT, tanto em patógenos planctônicos quanto em biofilme. O PDTplus baseado em MB foi superior principalmente em biofilme. Em comparação com a PDT convencional, a PDTplus apresentou eficácia antibacteriana superior com base em seu efeito sinérgico, prometendo amplas possibilidades de aplicação.

Giannelli et al. (2017)⁴⁰ avaliaram o efeito antimicrobiano do PDT com 0,1% de azul de metileno (AM) laser de diodo (λ 635 nm) e do LED azul-violeta (λ 405 nm) por 1 e 5 minutos em biofilme de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em discos de titânio. Os resultados mostraram que tanto o PDT quanto o LED azul-violeta reduziram o número de bactérias viáveis, de até -99 e -98% (5 minutos), respectivamente. Além do efeito antimicrobiano, a PDT e o LED azul-violeta inibiram a bioatividade do LPS em até -42%. Concluíram que o LED azul-violeta, assim como o PDT, teve efeito antimicrobiano sobre biofilme de *S. aureus* e que pesquisas clínicas serão necessárias para comprovar estes resultados promissores.

De Paula et al. (2021)⁴¹ estudaram o efeito da PDT sobre biofilme oral de microrganismos de colonização inicial (*S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis*), usando o fotossensibilizador azul de metileno (AM) associando as nanopartículas de β -ciclodextrina com diferentes fontes de luz vermelha (laser ou LED com $\lambda = 660$ nm). Em conclusão, relatam que a PDT mediada por β -ciclodextrina encapsulada com

azul de metileno irradiada por laser ou LED foi eficaz na redução do biofilme composto por microrganismos de colonização primária.

2.4 Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica

O plasma considerado como o quarto estado da matéria, é um gás ionizado, encontrado em várias formas na natureza e que pode ser gerado artificialmente. O gás de alimentação que forma esse plasma pode ser o argônio ou hélio, e os subprodutos são as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. O plasma formado em temperaturas inferiores a 40 °C em condições de baixa pressão é conhecido como plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA). Esse PBTPA é capaz de inativar bactérias, fungos e vírus dependendo do gás utilizado, dos parâmetros do equipamento, da dose e do tempo de aplicação. Apesar dos resultados positivos ainda são necessários mais estudos clínico/laboratoriais para compreensão de seus efeitos antimicrobianos.⁴²

Koban et al. (2011)⁴³ avaliaram o efeito antimicrobiano de três dispositivos de PBTPA sobre o biofilme de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e de biofilme multiespécies de saliva humana, cultivados sobre discos de titânio. Os dispositivos utilizados foram: jato de plasma de pressão atmosférica (kINPen 09), um eletrodo de descarga de barreira dielétrica oca (HDBD), uma descarga de barreira dielétrica de volume (VDBD) e digluconato de clorexidina 0,1% (CX). Concluíram que no menor tempo de aplicação o kINPen 09 teve maior efeito antimicrobiano do que os outros equipamentos e que após 10 minutos de aplicação, todos os dispositivos de PBTPA em comparação a CX tiveram uma redução significativa de *S. mutans* e de microrganismos de saliva humana em superfície de titânio.

Idlibi et al. (2013)⁴⁴ avaliaram o efeito antimicrobiano de um protótipo de PBTPA sobre biofilmes formados por 72 horas *in situ* em discos de titânio (Ti). Este protótipo foi comparado com laser de diodo, abrasão a ar e clorexidina 0,2%. Concluíram que o protótipo mostrou uma redução significativa de microrganismos presentes no biofilme *in situ* sem causar dano na superfície do disco de titânio em comparação as

outras técnicas. Sugere que este protótipo pode ser utilizado antes ou depois de uma descontaminação mecânica assegurando a desinfecção da superfície de titânio.

Preissner et al. (2016)⁴⁵ investigaram a eficiência antimicrobiana do PBTPA sobre biofilme de *S. mitis* formados sobre a superfície tratada de implantes de titânio. Foi utilizado 2 tempos de aplicação do PBTPA (60 e 120 segundos), laser de diodo por 60 segundos e controle negativo. O PBTPA reduziu significativamente as unidades formadoras de colônia (UFC), em comparação ao grupo controle, porém sem diferenças significativas entre o tratamento 60 e 120 segundos.

Abonti et al. (2016)⁴⁶ avaliaram os efeitos esterilizantes do PBTPA com diferentes tipos de gases (oxigênio, nitrogênio e argônio) sobre placas de ágar com cultura de *S. mutans*, *Lactobacillus fermentum* (*[L. fermentum]*) e *A. actinomycetemcomitans*, separadamente. O PBTPA foi aplicado a uma distância de 2 e 20 mm com tempos de 10 e 60s sobre os microrganismos. Somente o PBTPA de oxigênio reduziu significativamente a UFC dos 3 microrganismos analisados em todos os parâmetros utilizados.

Yang et al. (2018)⁴⁷ avaliaram o efeito antimicrobiano de diferentes tempos de aplicação (2, 4 e 6 minutos) do PBTPA em placa contendo *P. gingivalis*. O PBTPA mostrou um efeito antimicrobiano significativo sobre o *P. gingivalis*, com maior efeito no tempo de 6 minutos.

Carreiro et al. (2019)⁴⁸ avaliaram o efeito antimicrobiano do tempo de aplicação com PBTPA (1 e 3 minutos) sobre biofilme de *P. gingivalis* formado em discos de titânio de superfície tratada. Concluíram que independente do tempo de aplicação, o uso do PBTPA teve redução no UFC/ml comparado ao controle. No entanto, a CX teve uma redução maior do que nos diferentes tempos de aplicação do PBTPA analisado.

Lee et al. (2019)²² investigaram o efeito de diferentes tempos de aplicação (0, 3 e 5 minutos) do PBTPA com gás hélio sobre biofilmes de *P. gingivalis* em discos de titânio de superfície tratada. Os autores observaram que a quantidade de *P. gingivalis* diminuiu, conforme o tempo de aplicação do PBTPA aumentou. Concluiu-se que o PBTPA foi eficaz na remoção do biofilme de *P. gingivalis* em discos de titânio.

Zhou et al. (2022)⁴⁹ avaliaram em animais o efeito do uso combinado do PBTPA com gás hélio e o desbridamento mecânico cirúrgico (DMC) na peri-implantite (PI). Os grupos foram: DMC + irrigação de CX a 2% (grupo controle) e DMC + PBTPA. Os resultados apontaram uma melhora significativa em índice de sangramento, profundidade de sondagem e altura óssea no grupo PBTPA, comparado ao grupo de controle após três meses do tratamento. Concluíram que o PBTPA em conjunto com o DMC para o tratamento da PI pode aumentar a formação óssea ao redor do implante, inibindo a resposta inflamatória.

Lima et al. (2021)⁵⁰ fixaram as configurações (fluxo do gás, frequência, amplitude e distância da superfície a ser tratada) do PBTPA com gás hélio e analisaram o tempo de aplicação (1,3,5 e 7 minutos) sobre *Streptococcus gordonii* e *P. gingivalis*. O diâmetro do halo de inibição aumentou proporcionalmente ao tempo de exposição, ao contrário da contagem de UFC/mL, o qual após 5 minutos de aplicação, não teve redução significativa com 7 minutos de exposição ao tratamento.

Hui et al. (2021)⁵¹ compararam a eficácia da descontaminação da superfície com abrasão a ar (AA), plasma atmosférico frio (PBTPA) e ambas modalidades (AA+PBTPA) sobre biofilme de saliva de pacientes com peri-implantite sobre implantes de titânio. Todos os tratamentos proporcionaram uma descontaminação expressiva da superfície dos implantes, com valores muito próximos ao controle negativo para AA e AA+PBTPA. Concluíram então que a descontaminação com AA, com ou sem PBTPA foi eficiente na remoção do biofilme dos implantes.

Florke et al. (2022)⁵² compararam a eficiência do PBTPA (3 minutos), da PDT com azul de toluidina (40 segundos) e da descontaminação química com ácido fosfórico a 35% (AF) sobre superfícies de implantes de titânio contaminados com *E. faecalis*. O PBTPA proporcionou redução significativa do número de microrganismos sobre PDT e controle. O PDT teve um aumento no número de UFC/ml comparado ao controle. Não houve diferença no número de UFC/ml nos tratamentos PBTPA e AF.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes tratamentos sobre *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada.

3.2 Objetivo específico

Avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes tratamentos (gel de oxigênio ativo (BlueM[®]), Terapia Fotodinâmica (PDT), Chimolux (CH) e Clorexidina (CX) sobre células planctônicas de *S. gordonii*.

Avaliar o efeito antimicrobiano imediato de diferentes tratamentos (BlueM[®], PDT, CH, CX e PBTPA) sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada.

Avaliar o efeito antimicrobiano, num acompanhamento de 48 hs., de diferentes tratamentos (BlueM[®], PDT, CX e PBTPA) sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada.

4. Materiais e métodos

Esta pesquisa foi integralmente realizada no Laboratório de Genoma da UNESP, em São José dos Campos – S.P. O experimento foi realizado em cabine de fluxo laminar e todos os materiais utilizados eram estéreis de fábrica ou foram esterilizados em autoclave.

4.1 Avaliação do efeito dos tratamentos antimicrobianos sobre células planctônicas

A avaliação do efeito dos produtos antimicrobianos selecionados foi feita com a cepa padrão de *Streptococcus gordonii* ATCC 10558. Esta cepa foi cultivada em ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C e 5% de CO₂, por 48 horas. O inóculo de *S. gordonii* foi preparado a 10⁷ cél/ml num comprimento de onda (λ) 600 nm com densidade óptica (DO) de 0,520 \pm 0.02 em solução salina. Após a padronização do inóculo, este foi diluído 1:10 em BHI com concentração final de 10⁶ cél/ml e pipetado 100 μ l em cada poço de uma placa de 96 poços. Em cada poço foi pipetado 100 μ l dos seguintes produtos antimicrobianos selecionados:

- BlueM® (Bluem Europa Ltda, Zwolle, Overijssel, Holanda).
- Azul de metileno a 0,01% (Chimuilux® DMC - São Carlos – SP).
- Clorexidina Gel 0,2% (Perioxidin®, Lacer, Barcelona, Espanha).⁵³

A avaliação da Terapia fotodinâmica (PDT) com azul de metileno a 0,01% (Laser Therapy EC – DMC / Chimiolux® DMC - São Carlos - SP), foi realizada em placa separada, com boa distância entre a posição dos discos nos poços, para que não houvesse interferência da irradiação do laser em um disco sobre os demais discos.

Em células planctônicas não se avaliou o efeito do Plasma de Baixa Temperatura sob Pressão Atmosférica (PBTPA) pois já se sabia de seus efeitos sobre estas células a partir do trabalho de Lima et al. (2021).⁵⁰

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂, após este período foi realizada leitura visual e posterior subcultura desta placa para leitura após 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

4.2 Avaliação do efeito dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* sobre os discos de titânio

4.2.1. Seleção dos discos de titânio para cada grupo de tratamentos antimicrobianos

Neste estudo, foram utilizados 99 discos (6mm de diâmetro com 3 mm de espessura) de titânio comercialmente puro (grau IV – mesmo material utilizado para confecção de implantes), 54 discos com a superfície lisa (SL - não tratada), e 45 discos com superfície tratada (ST - duplo ataque ácido), do sistema S.I.N. Implant System (São Paulo, São Paulo, Brasil).

Os discos de titânio, para cada tipo de superfície, foram assim divididos em 4 grupos de acordo com os produtos utilizados:

- Grupo B- BlueM[®] - (Oxigênio ativo 0,015%) - n=9
- Grupo CH - Chimiolux DMC[®]: Gel de azul de metileno 0,01% - n=9
- Grupo PDT - Terapia Fotodinâmica (Chimiolux DMC[®]: Gel de azul de metileno 0,01% em associação ao Laser Vermelho (InGaAlP) - n=9
- Grupo CX - Clorexidina 0,2 % (Lacer[®]) - n=9
- Grupo PBTPA - plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA de gás Hélio / Protótipo UNESP SJC – Lima et al, 2021) - n=9
- Grupo C – Controle (sem nenhum tipo de tratamento) - n=9

4.2.1.1 Formação do biofilme de *S. gordonii* em disco de titânio

Para obtenção do biofilme monoespécie, *culturas frescas de S. gordonii*, ATCC 10558 foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. O *S. gordonii* foi cultivado em ágar BHI a 37°C e 5% de CO₂, por 48 horas.⁵⁰

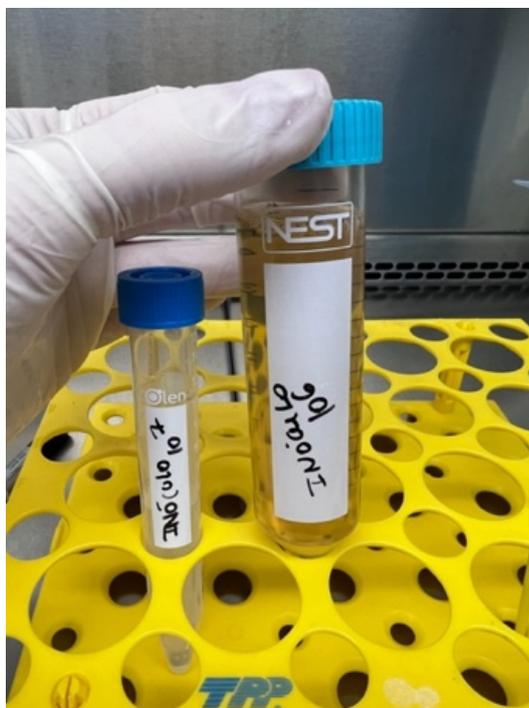
Para o preparo do inóculo de 10^7 cél/ml coletou-se *S. gordonii* da placa de ágar BHI com alça coletora estéril, e as bactérias foram depositadas em tubo Falcon contendo soro fisiológico, o qual passava por vórtex de 10 segundos. Então era coletado com pipeta 1 ml dessa solução, que era depositada numa cubeta para realizar-se a espectrofotometria. O inóculo deveria atingir a absorvância de $\lambda = 600$ nm.^{3,50} e $DO = 0,52 \pm 0,02$.⁵⁰

Figura 1- Espectrofotômetro (Micronal, S.A., São Paulo, S.P.) demonstrando a absorvância do inóculo



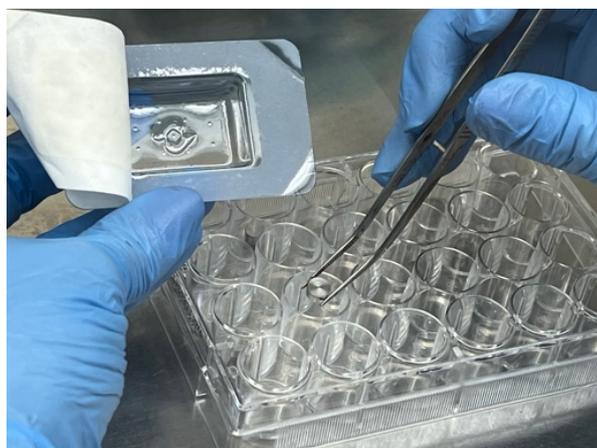
Atingida a absorvância ideal (figura 1) procedia-se para o preparo do inóculo de 10^6 cél/ml na quantidade necessária para o experimento, utilizando-se 1 (uma) parte do inóculo de 10^7 cél/ml para 9 (nove) partes de caldo BHI (figura 2).

Figura 2- Inóculo de 10^6 cél/ml preparado a partir do inóculo de 10^7 cél/ml



Os discos de titânio (superfície lisa e superfície tratada) foram colocados nos poços das placas estéreis de 24 poços, e divididos de acordo com os respectivos grupos testados (figura 3).

Figura 3- Discos de titânio sendo colocados nos poços com pinça estéril



Foi pipetado 2 ml de inóculo de *S. gordonii* a 1×10^6 cél/ml por poço contendo os discos (figura 4).

Figura 4- Inóculo sendo pipetado nos poços



As placas foram então incubadas por 24hs a 37°C e 5% CO₂ (figuras 5 A e B).

Figura 5- Placa com discos e inóculo pronta (A) e Estufa a 37°C e 5% CO₂ (B)



4.2.2 Efeito dos tratamentos antimicrobianos sob o biofilme formado

4.2.2.1 Tratamento Imediato

Os discos de titânio (SL e S) com biofilme formado foram retirados do meio BHI com pinça estéril, exatamente na mesma posição em que se encontravam no poço. Cada disco, um a um, era lavado 2 vezes com 1 ml de soro fisiológico estéril, e então apoiados na parte interna de uma placa de Petri. Os discos foram então submetidos aos tratamentos antimicrobianos da seguinte forma:

- BlueM[®]

À ponta da seringa de BlueM[®] era acoplada uma ponta aplicadora plástica estéril (figura 6A), e então o gel do produto era aplicado sobre a face superior dos discos, até recobrir completamente os mesmos (figura 6B). O produto permanecia agindo por 5 minutos na superfície dos discos, e um cronômetro era acionado para controle do tempo.

Figura 6- BlueM[®] pronta para aplicação (A) e disco de titânio com gel de BlueM[®] (B)



- Chimiolux[®]

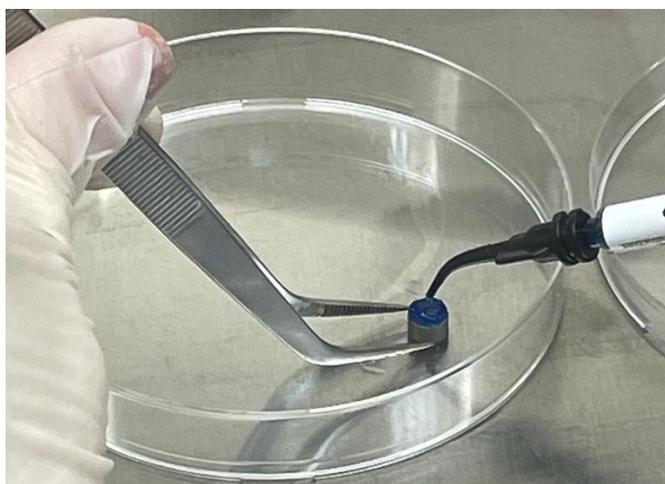
A aplicação do gel de azul de metileno a 0,01% foi realizada acoplando-se uma ponta aplicadora plástica estéril à ponta da seringa de Chimiolux[®]. Então, o gel do

produto era aplicado sobre a face superior dos discos, até recobri-los completamente. O produto permanecia agindo nos discos por 5 minutos, com o auxílio de um cronômetro, conforme recomendação do fabricante.

- Terapia Fotodinâmica

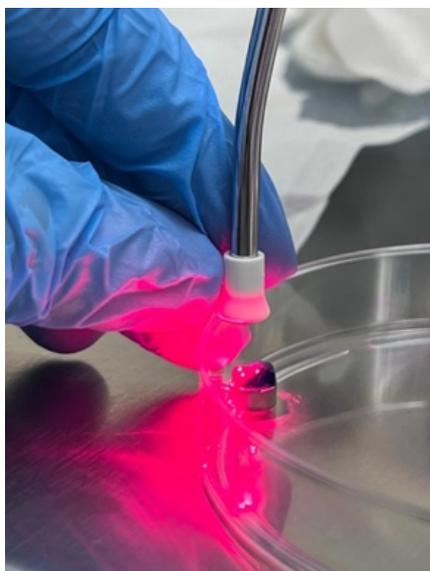
A ponta da seringa de Chimiolux® era acoplada uma ponta aplicadora plástica estéril, e então o gel do produto era aplicado sobre a face superior dos discos, até recobrir completamente os mesmos (figura 7). O produto permanecia agindo por 5 minutos na superfície dos discos, conforme recomendação do fabricante, e um cronômetro era acionado para controle do tempo.

Figura7- Chimiolux® na face superior do disco de titânio



Passados os 5 minutos, os discos eram suspensos com a pinça e posicionados na borda de numa nova placa de Petri, para que o topo da placa servisse de *stop* da distância exata entre a ponteira do laser vermelho e a superfície do disco (1,5 cm). Foi aplicado 9 Joules de laser vermelho (InGaAlP) (DMC®), eram aplicados sobre os discos, totalizando 90 segundos de aplicação (também segundo recomendação do fabricante) e mantendo-se a distância de 1,5 cm (figura 8).

Figura 8- Laser aplicado a 1,5 cm do disco



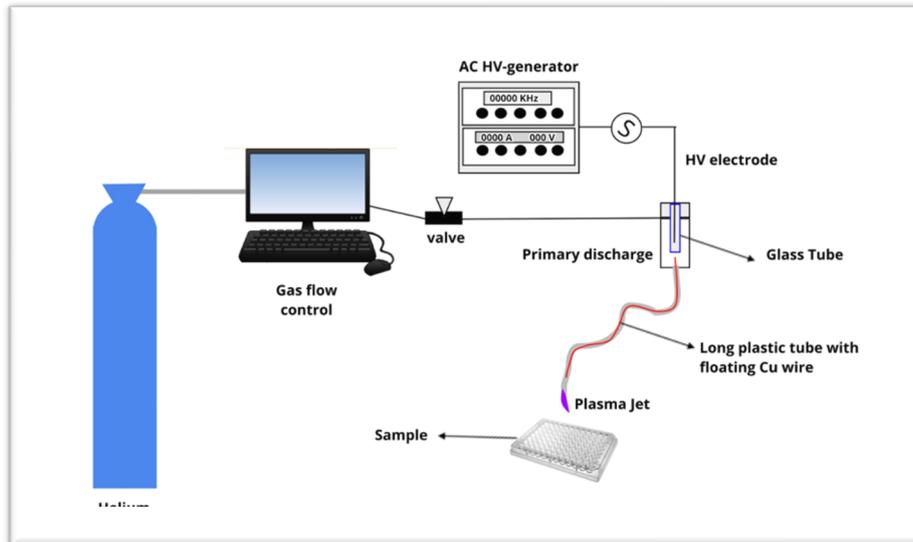
- Clorexidina

O tubo de Clorexidina a 0,2% (Lacer®) veio com uma ponta própria que permitiu a aplicação do gel sobre a face superior dos discos, até recobrir completamente os mesmos. Com o auxílio de um cronômetro o produto permanecia agindo por 5 minutos na superfície dos discos. Optou-se por padronizar a aplicação do BlueM e também da Clorexidina em 5 minutos, uma vez que o Chimiolux permanecia 5 minutos por recomendação do fabricante e o jato de plasma permanecia por 5 minutos em conformidade com o trabalho de Lima et al, 2021.⁵⁰

- Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica

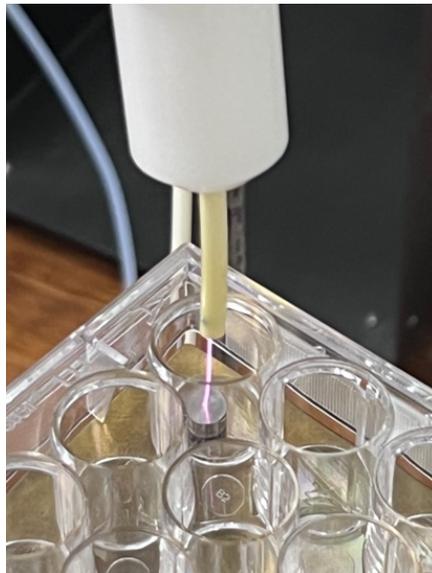
A configuração experimental utilizada neste estudo foi descrita anteriormente por Borges et al. (2018), Borges et al. (2019) e Lima et al. (2021) (figura 9).^{50,54,55}

Figura 9- Configuração do PBTPA utilizado no estudo (Lima et al., 2021).



Os discos eram centralizados no poço de uma placa estéril de 24 poços, para que se realizasse a aplicação do PBTPA (figura 10).

Figura 10- Aplicação do PBTPA.



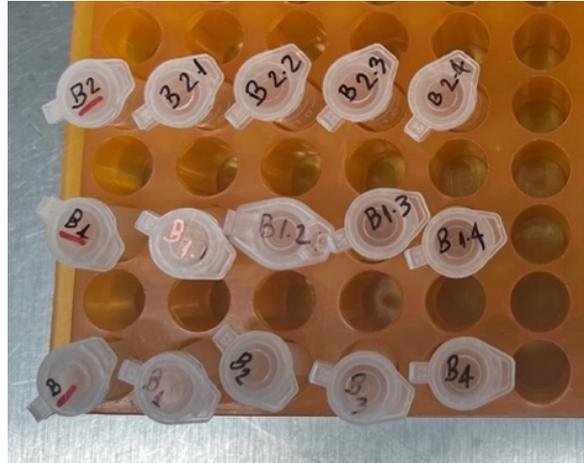
O jato de plasma foi aplicado no centro de cada disco a uma distância de 15 mm, por 5 minutos, conforme metodologia descrita por Lima et al, 2021.⁵⁰ A potência média de descarga calculada nestas condições foi de 0,6 W.

Após 5 minutos de tratamento, os discos eram suspensos com a pinça e recebiam 2 jatos de 1 ml de soro fisiológico estéril na face que recebeu o tratamento. Feito isso cada disco era inserido num microtubo contendo 1 ml de soro fisiológico estéril e passavam por vórtex de 30 segundos (figura 11).

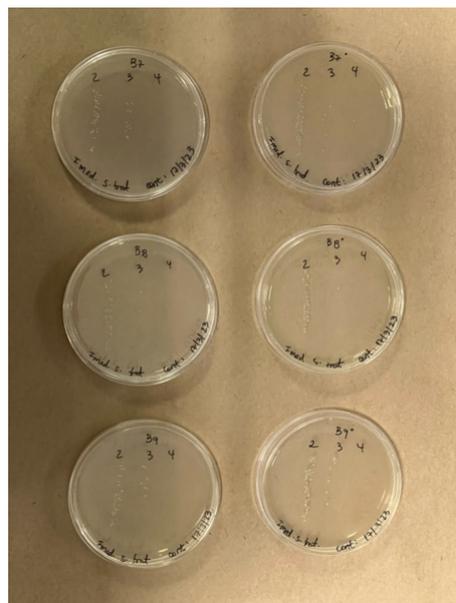
Figura 11- Vórtex de 30 segundos



Após o vórtex foi realizada a diluição seriada do microtubo contendo o corpo de prova da seguinte forma: 100 microlitros eram pipetados do microtubo contendo o corpo de prova para outro microtubo contendo 900 microlitros de soro fisiológico estéril. Esse novo tubo era também misturado por 10 segundos e dele também era colhido 100 microlitros de soro para ser colocado num novo microtubo com mais 900 microlitros de soro estéril. E assim sucessivamente até atingir 4 diluições (-1, -2, -3, -4) (figura 12).

Figura 12- Diluição seriada

Dez microlitros eram pipetados dos microtubos com as diluições -2, -3 e -4, e gotejados na placa (em duplicatas). A placa era inclinada para a formação das "gotas" e após secagem, eram incubadas por 24hs a 37°C e 5% CO₂ (Figura 13).

Figura 13- Placas em duplicata prontas para contagem

Após 24 horas era realizada a contagem das UFC/ml em cada placa, utilizando-se lupa e retro iluminação. Os dados foram inseridos numa planilha para posterior análise estatística (figura 14).

Figura 14- Contagem das UFC/ml



4.2.2.2 Acompanhamento após 48 hs do tratamento.

Após os tratamentos e lavagens descritos acima nos grupos do tratamento imediato, as amostras dos grupos de acompanhamento 48 hs, de todos os tratamentos analisados retornaram novamente para a estufa, por 24hs a 37°C e 5% CO₂, em meio BHI.

Para todos os grupos, após 24 horas, os discos eram transferidos para uma nova placa de 24 poços estéril, com novo meio BHI em cada poço, e então voltavam para a estufa a 37°C e 5% CO₂ por mais 24 horas, completando então 48 hs de tratamento nos discos.

Ao final das 48 horas de tratamento, os discos de cada grupo foram lavados 2 vezes com 1 ml de soro fisiológico, foi feita a diluição seriada até 10^{-4} e plaqueados pela técnica da gota, como descrito anteriormente. A contagem foi realizada após 24 horas e os dados foram inseridos numa planilha para posterior análise estatística.

5. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Após o teste de normalidade e homocedasticidade, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados não normais foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5%.

6. Resultados

6.1 Efeito dos produtos antimicrobianos sobre células planctônicas

O resultado do experimento inicial para avaliação do efeito do uso dos produtos antimicrobianos sobre células planctônicas de *S. gordonii* demonstrou que B, CX e CH apresentaram efeito sobre as células planctônicas. (figura 15). Na PDT, realizou-se a técnica na concentração 100% do CH com aplicação do laser em cultura planctônica mantida em microtubo e placa de 96 poços, os quais foram irradiados na tampa e no fundo do microtubo ou placa (figura 16). Observamos que não houve inibição do crescimento da cultura planctônica no PDT (concentração 100% CH + laser).

Este resultado foi controverso pois o uso somente do CH teve efeito e o resultado esperado era que o PDT fosse mais eficiente do que só o fotossensibilizador. Portanto, o PDT e o CH foram testados em superfície lisa com biofilme de *S. gordonii*.

Figura 15- Efeito dos produtos antimicrobianos sobre células planctônicas de *S. gordonii*

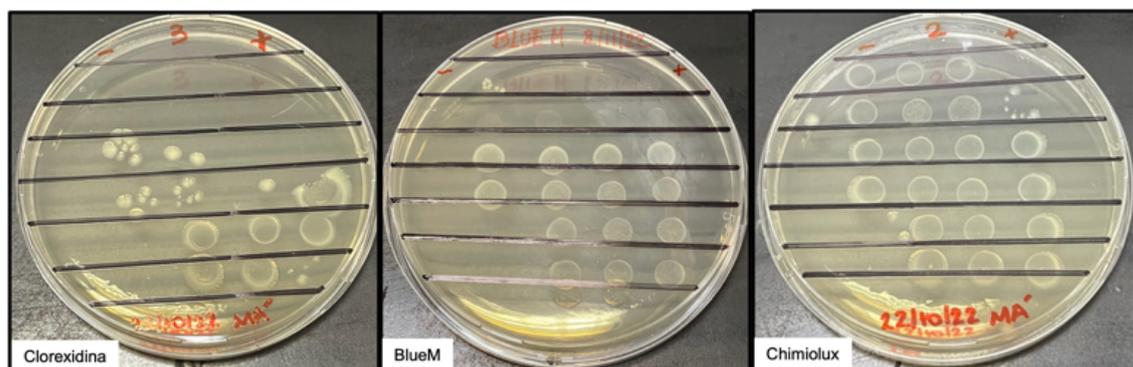
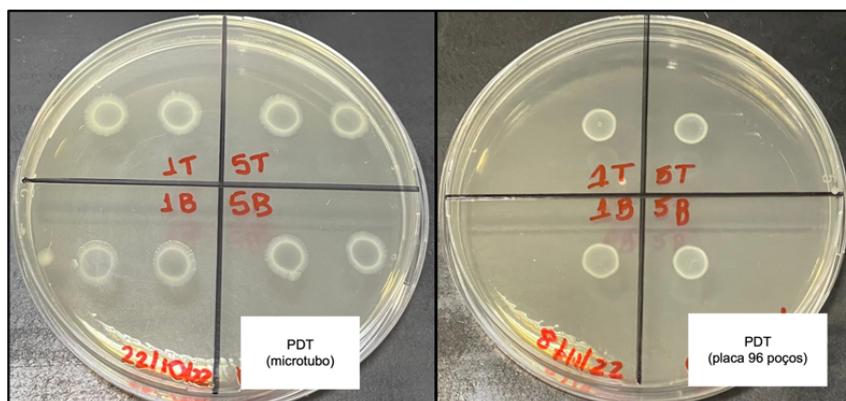


Figura 16- Efeito do PDT sobre células planctônicas de *S. gordonii*, em microtubo e em placa de 96 poços



6.2 Efeito dos produtos antimicrobianos sobre biofilme formado de *S. gordonii* em diferentes superfícies de discos de titânio em diferentes tempos de tratamento

6.2.1 Superfície lisa

6.2.1.1 Tratamento imediato

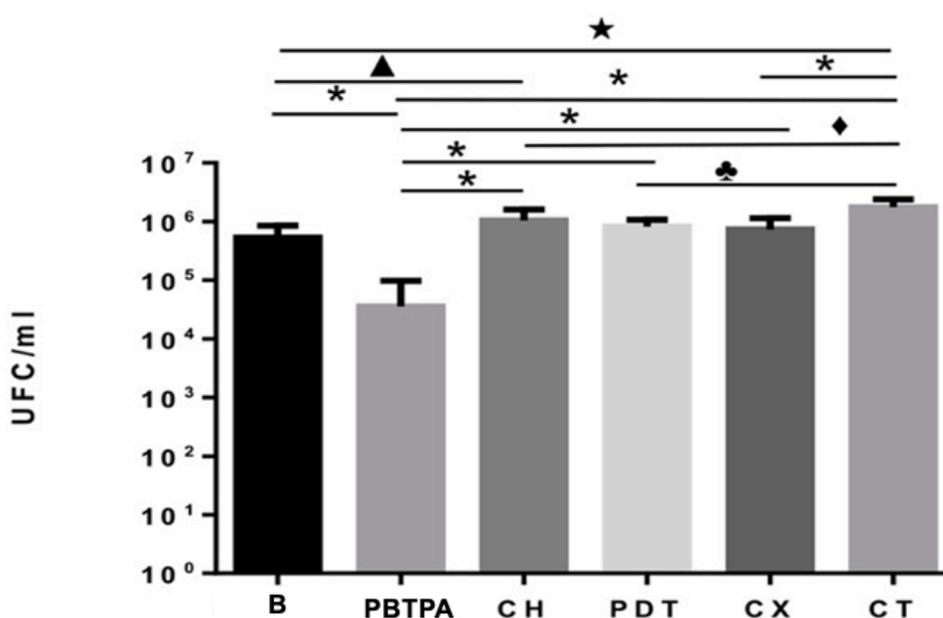
No tratamento imediato realizado em discos de titânio de superfície lisa (gráfico 1) observou-se que o tratamento com BlueM (B) sobre o biofilme diminuiu o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) com uma diferença estatística em comparação ao grupo controle (CT) ($p=0,002$) e grupo Chimiolux (CH) ($p=0,0124$).

O tratamento com o Plasma de Baixa Pressão Atmosférica (PBTPA) sobre o biofilme apresentou uma diminuição na contagem das UFC/ml em comparação com grupo CT e com todos os tratamentos analisados ($p<0,0001$).

O tratamento com o Chimiolux (CH) não teve diferença estatística com a Terapia Fotodinâmica (PDT). No entanto, estes dois tratamentos tiveram uma diminuição maior de UFC/ml em comparação ao grupo CT (CHxCT – $p=0,0197$; PDTxCT – $p=0,0019$).

A Clorexidina (CX) como grupo padrão teve efeito no biofilme com uma diminuição significativa em comparação ao grupo CT ($p < 0,0001$) e só foi menos eficaz sobre o biofilme em comparação ao grupo PBTPA ($p < 0,0001$).

Gráfico 1 – Efeito imediato dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa



B (BlueM®); PBTPA (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica); CH (Chimiolux®); PDT (Terapia fotodinâmica); CX (Clorexidina); CT (controle).
 Valor de p * $p < 0,0001$; ▲ $p = 0,0124$; ★ $p = 0,0002$; ♣ $p = 0,0197$; ♠ $p = 0,0019$

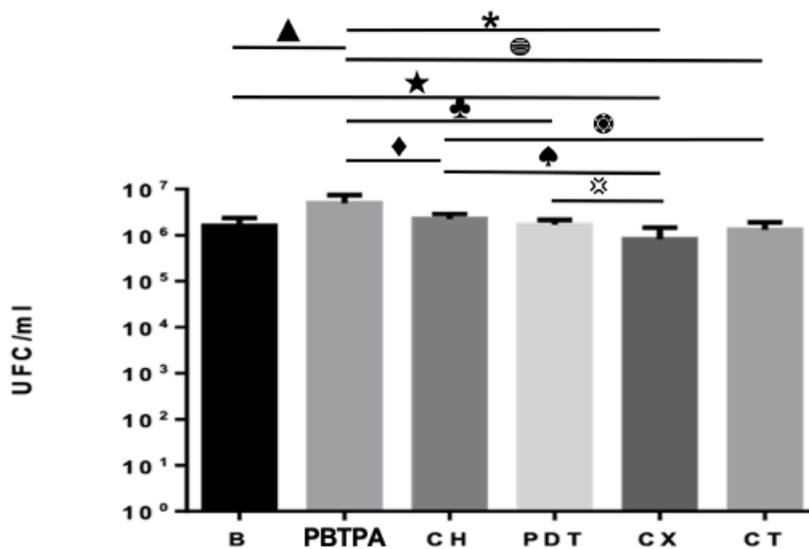
6.2.1.2. Acompanhamento após 48 horas do tratamento.

Nos tratamentos de 48 hs em discos de titânio de superfície lisa (gráfico 2) observou-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa no número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) nos grupos CX, B, CH e PDT quando comparados ao grupo do PBTPA ($p < 0,0001$, $p = 0,0007$, $p = 0,005$ e $p = 0,0005$), respectivamente.

O grupo PBTPA apresentou uma maior formação de UFC/ml em comparação ao grupo CT ($p = 0,0002$). O Grupo CX foi estatisticamente superior aos grupos B, PDT

e CH, apresentando menos UFC/ml ($p=0,0044$, $p=0,0021$ e $p=0,0004$), respectivamente. O grupo CH apresentou maior quantidade de UFC/ml que o próprio grupo CT ($p=0,0096$). O grupo CH (azul de metileno 0,01%) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo PDT (azul de metileno 0,01% + laser vermelho) sobre o biofilme formado em discos de titânio de superfície lisa. Sendo assim optou-se por excluir o grupo CH da continuidade do estudo sobre seu efeito em biofilme formado nos discos de titânio de superfície tratada, permanecendo no estudo apenas o grupo PDT.

Gráfico 2 – Efeito em 48 hs dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa



B (BlueM®); PBTPA (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica); CH (Chimiolux®); PDT (Terapia fotodinâmica); CX (Clorexidina); CT (controle).

Valor de p: * $p<0,0001$; ▲ $p=0,0007$; ★ $p=0,0044$; † $p=0,005$; ‡ $p=0,0005$; ● $p=0,0002$; ◆ $p=0,0004$; ⊕ $p=0,0096$; ✕ $p=0,0021$

6.2.2 Superfície tratada

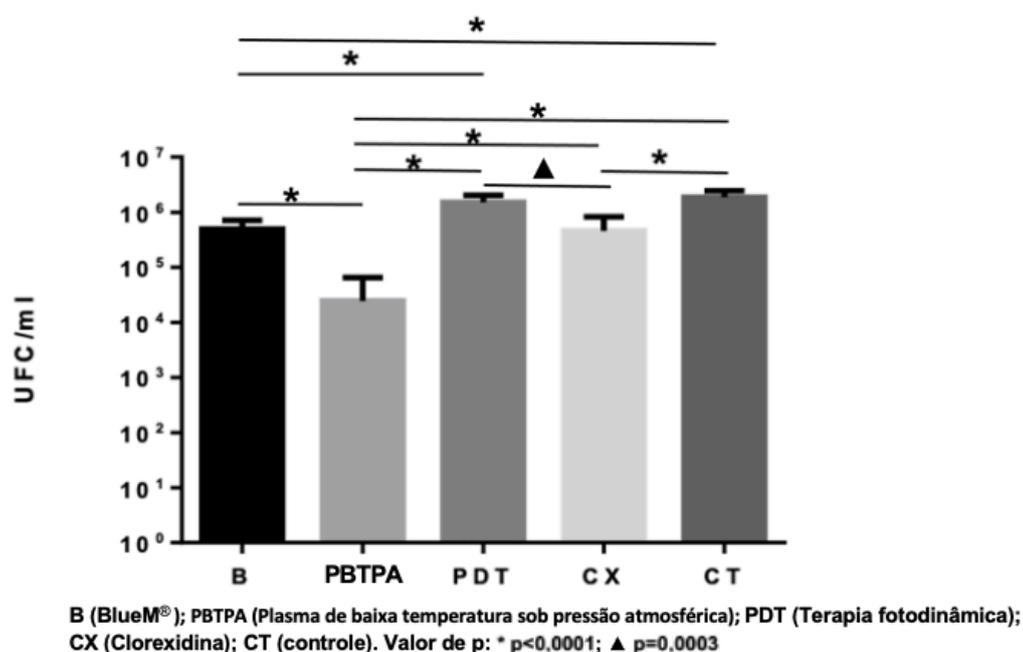
6.2.2.1 Tratamento imediato

Nos tratamentos imediatos realizados em discos de titânio de superfície tratada (gráfico 3) observou-se que o tratamento com o PBTPA sobre o biofilme apresentou resultados estatisticamente superiores quando comparado aos demais grupos (B, PDT, CX e CT), no que diz respeito à quantidade de UFC/ml ($p < 0,0001$).

O tratamento com BlueM (B) sobre o biofilme, também teve resultados estatisticamente superiores em relação aos grupos PDT e CT, apresentando uma diminuição na contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) ($p < 0,0001$).

O grupo CX foi estatisticamente superior ao grupo PDT, com menor formação de UFC/ml ($p = 0,0003$). O grupo PDT foi o único que não apresentou diferença estatística em relação ao grupo CT.

Gráfico 3 – Efeito imediato dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície tratada

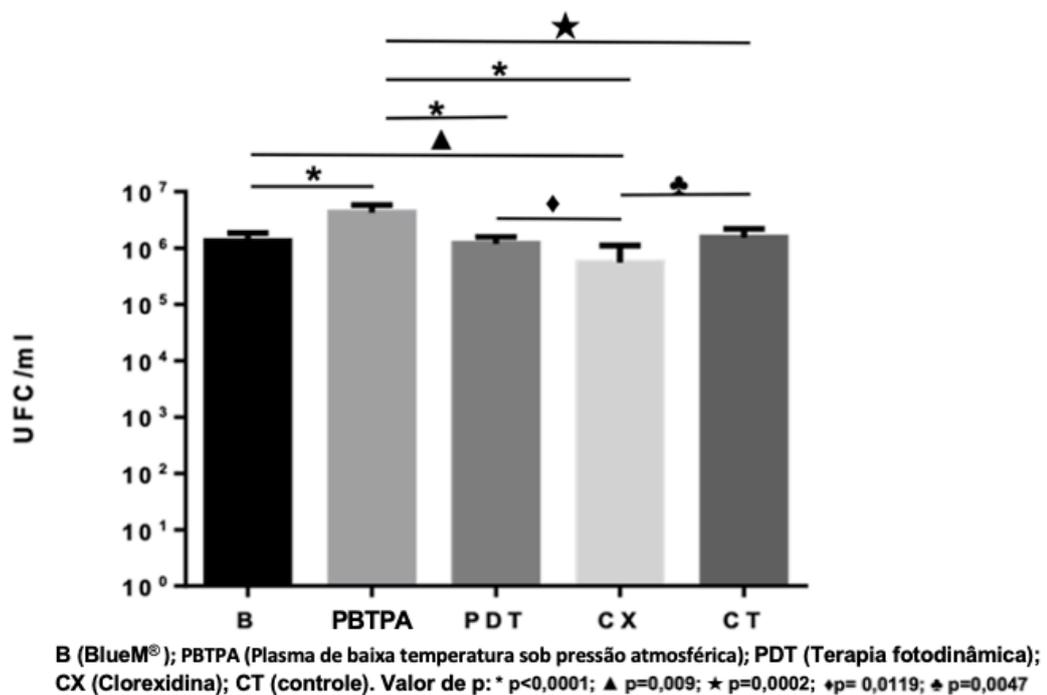


6.2.2.2 Acompanhamento após 48 hs do tratamento

Nos tratamentos de 48 hs em discos de titânio de superfície tratada (gráfico 4), o grupo tratado com PBTPA mostrou um número maior de UFC/ml em comparação com o grupo CT ($p=0,0002$) e com os tratamentos com B, PDT e CX ($p<0,0001$).

O grupo CX apresentou menor formação de UFC/ml quando comparado aos grupos B ($p=0,009$), PDT ($p=0,0119$) e CT ($p=0,0047$).

Gráfico 4 – Efeito em 48 hs dos tratamentos antimicrobianos sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de superfície tratada



7. Discussão

Os tratamentos antimicrobianos testados nesta pesquisa demonstraram eficácia sobre o *S. gordonii*, tanto na forma planctônica quanto em biofilme. Porém, sabe-se que os biofilmes são mais tolerantes e resistentes que as culturas planctônicas.^{4,56}

Em superfície lisa, o tratamento imediato no grupo BlueM® (B) e no grupo Clorexidina (CX) sobre o biofilme teve um efeito antimicrobiano em comparação ao grupo controle (CT). Estes achados corroboram com Deliberador et al. (2020)²⁵, onde B e CX apresentaram resultados antimicrobianos semelhantes. A literatura científica disponível, indexada em bases de dados confiáveis, acerca da utilização do B em Implantodontia é escassa, tanto no que diz respeito à sua efetividade sobre biofilme, quanto sobre seu potencial na alteração da superfície de implantes, e até mesmo sobre aspectos de segurança como citotoxicidade.³¹

Deve-se considerar também que, com exceção do PBTPA, todos os produtos estudados são em gel e entram em íntimo contato com a superfície do titânio; a presença de resíduos destes agentes de liberação local na superfície dos implantes pode interferir na reintegração óssea e atuar como um reservatório de microrganismos.²²

Apesar da CX ter reduzido significativamente as UFC/ml em comparação ao grupo CT, sendo apenas menos eficaz que o grupo PBTPA em tratamento imediato de SL, deve-se considerar seu possível efeito citotóxico, além de sua capacidade de alterar a topografia dos implantes o que pode desencorajar seu uso como descontaminante de superfície.²¹

Em contrapartida, os resultados de Carreiro et al. (2019)⁴⁸ demonstraram que o PBTPA apresentou uma redução significativa de UFC/mL de *P. gingivalis* em comparação com o controle negativo, porém não tão eficaz quanto a CX 0,2%. Adicionalmente, em análise morfológica o grupo PBTPA teve um menor dano celular em epitélio gengival comparado ao grupo com CX, porém observaram uma baixa citotoxicidade e alta viabilidade celular nos grupos tratados com CX também.⁴⁸

No presente estudo o tratamento imediato com o PBTPA sobre o biofilme em SL obteve melhor efeito antimicrobiano do que os outros produtos utilizados. Tal resultado corrobora com os achados de Koban et al. (2011)⁴³, que demonstraram que a aplicação de PBTPA foi muito mais eficaz do que a CX contra biofilme de *Streptococcus mutans* e de biofilmes multiespécies de saliva humana fazendo-nos ponderar que a utilização mais rotineira de dispositivos de PBTPA para o tratamento clínico da mucosite peri-implantar pode ser proveitosa. Já Theinkom et al. (2019)⁵⁷ encontraram resultados semelhantes entre o PBTPA e a CX, na redução bacteriana em biofilme de 24 horas.

A literatura estudada relata que o PBTPA pode ser considerado como um método eficaz para reduzir o biofilme nas superfícies dos implantes^{22,48,57,58}, sendo seguro para o epitélio gengival⁴⁸, podendo inclusive estar associado à reparação celular^{48,50}, apresentando baixa citotoxicidade.⁵⁴

Já no acompanhamento dos tratamentos após 48 hs, tanto em SL quanto em ST, o grupo PBTPA apresentou os piores resultados, com um maior número de UFC/ml quando comparado ao grupo C e aos demais grupos testados.

Esse achado pode estar relacionado ao potencial do PBTPA em alterar a superfície dos implantes⁴⁷, permitindo a proliferação e a adesão mais rápidas de células do tecido circundante na superfície de implantes com diferentes tratamentos de superfície⁵⁹, favorecendo a atividade dos osteoblastos através do condicionamento das superfícies dos implantes, levando a uma melhora na osseointegração.⁶⁰ Sendo assim, uma possível hipótese é que essa modificação de superfície promovida pelo PBTPA tenha favorecido uma maior agregação bacteriana nas 48 hs seguintes ao tratamento. No estudo de Preissner et al. (2016)⁴⁵, através de microscopia eletrônica de varredura, verificou-se ausência de alteração da superfície em implantes de titânio de superfície tratada após o tratamento com PBTPA por 60 e 120 segundos. Já no estudo de Yang et al. (2018)⁴⁷, o tratamento com PBTPA (2, 4 e 6 minutos) aumentou significativamente a rugosidade da superfície do titânio, sendo que quanto maior o tempo de tratamento, mais rugosa a superfície se tornava. No presente estudo o tratamento com PBTPA foi de 5 minutos, o que pode ter provocado rugosidades na superfície do titânio, impactando nos resultados do PBTPA no acompanhamento de

48 hs. As alterações na superfície do titânio promovidas pelo PBTPA parecem então favorecer o mecanismo de osseointegração^{59,60}, porém sugere-se a partir deste estudo, que a rugosidade da superfície do implante promovida pelo PBTPA pode favorecer a adesão bacteriana. A revisão sistemática de Alasqah (2019)⁶¹ conclui que os achados sobre alterações estruturais na superfície do titânio causadas pelo PDT são inconclusivos.

De Paula et al (2021)⁴¹ relatam resultados similares entre a CX e o PDT na redução de biofilme bacteriano multiespécie, sem superioridade de um sobre o outro.

No acompanhamento de 48 horas o grupo CX foi estatisticamente mais eficaz que grupos P, B, PDT e CH. Tal achado pode estar associado à característica de substantividade da clorexidina onde sua liberação é significativamente influenciada pelas modificações da superfície do titânio.¹⁹ Em nosso estudo o tratamento imediato com o Chimiolux (CH) em SL não apresentou diferença estatística com a Terapia Fotodinâmica (PDT), porém estes dois tratamentos tiveram uma diminuição maior de UFC/ml em comparação ao grupo CT. Em não havendo diferença significativa entre PDT e a aplicação isolada do CH, optou-se por remover o grupo CH do restante do estudo, permanecendo apenas o grupo PDT. No entanto, alguns autores obtiveram resultados diferentes desse, concluindo que a PDT mediada por azul de metileno poderia ser mais eficaz sobre biofilmes em comparação com o azul de metileno isoladamente.^{37,38}

Nos tratamentos imediatos em SL, o grupo PDT apresentou efeito antimicrobiano em comparação ao grupo CT. No entanto, em ST o grupo PDT não apresentou efeito antimicrobiano. Nos acompanhamentos de 48 hs tanto em SL quanto ST, o grupo PDT foi apenas superior ao grupo PBTPA.

No entanto Cai et al. (2019)³⁵ demonstram em seu estudo que tanto a PDT quanto a CX reduziram significativamente o número de *P. gingivalis* em comparação ao controle, mas que não houve diferença significativa na contagem de bactérias entre grupos (PDT x CX), onde ambos apresentaram a mesma efetividade. Concluíram também que a combinação de PDT + CX foi o método mais eficaz na erradicação de *P. gingivalis*, tanto em SL quanto em ST.

Neste mesmo sentido, de se realizar protocolos associativos, alguns estudos demonstram uma eficácia maior na erradicação de patógenos, quando há uma combinação de métodos, tanto a combinação de métodos químicos, mas também a combinação de métodos químicos com métodos mecânicos.^{15,34-36,49,58,60,62}

No caso do PDT, sua utilização em associação a outros métodos antimicrobianos químicos ou mecânicos (CX, escovas de titânio, abrasão a ar) parece apresentar resultados mais efetivos.^{35,36,39}

Neste estudo utilizamos a PDT conforme as recomendações do fabricante (azul de metileno a 0,01% - Chimiolux DMC +Laser Therapy EC - DMC / São Carlos - SP), no entanto diversos estudos^{34,35,37,38} apresentam diferenças nas metodologias, tanto no que diz respeito ao aparelho (meio condutor do laser de diodo, comprimento de onda, dosimetria) quanto no que diz respeito ao fotosensibilizador (tipo, concentração, veículo), o que pode levar a divergências de resultados.

Outro aspecto que deve ser considerado ao se analisar os resultados da PDT nesta pesquisa é o fato de que se utilizou o azul de metileno em gel, e nessa apresentação o produto formou um volume na face superior do disco, onde existe a hipótese de a luz do laser não ter conseguido penetrar adequadamente para que a reação química ocorresse. Estudos utilizando essa metodologia, porém com a utilização do azul de metileno na forma líquida, poderiam ser considerados para avaliar possíveis diferenças nos resultados.

Assim como no PDT, também observamos nos estudos que utilizaram o PBTPA, algumas diferenças metodológicas, como por exemplo o gás utilizado para formação do jato de plasma, o fluxo do gás, a potência de descarga, o tempo de aplicação, e a distância do mesmo em relação ao alvo.⁴⁴⁻⁴⁶

Uma padronização metodológica traria resultados mais consistentes e é um fator importantíssimo que deve ser considerado, tanto para o PBTPA, quanto para o PDT.

Apesar da pouca literatura disponível a respeito do B, o mesmo apresentou resultados superiores ao grupo CT, o que estimula a condução de novos estudos que possam confirmar sua efetividade e segurança clínica.

Os resultados encontrados no presente estudo acerca do efeito do PBTPA sobre biofilme em superfície de titânio são promissores. No entanto, por se tratar de um estudo *in vitro*, mais estudos em animais e estudos clínicos são necessários, para que se extrapole os resultados encontrados para o dia a dia clínico.

8. Conclusão

Conclui-se que em células planctônicas os tratamentos com B, CH e CX tiveram efeito antimicrobiano. Em relação ao tratamento imediato sobre biofilme de 24 horas de *S. gordonii*, o PBTPA teve efeito antimicrobiano superior aos demais tratamentos analisados (B, CX, CH e PDT), tanto em superfície lisa quanto em superfície tratada. No entanto este efeito antimicrobiano promissor do PBTPA não foi encontrado no acompanhamento de 48 horas.

Referências

1. Alghamdi HS, Jansen JA. The development and future of dental implants. *Dent Mater J*. 27 de março de 2020;39(2):167–72.
2. Romanos GE, Delgado-Ruiz R, Sculean A. Concepts for prevention of complications in implant therapy. *Periodontol 2000*. outubro de 2019;81(1):7–17.
3. Rath H, Feng D, Neuweiler I, Stumpp NS, Nackenhorst U, Stiesch M. Biofilm formation by the oral pioneer colonizer *Streptococcus gordonii*: an experimental and numerical study. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 1º de março de 2017 [citado 21 de agosto de 2023];93(3). Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1093/femsec/fix010>
4. Khoury AE, Johnson F, Lam K, Ellis B, Costerton JW. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER*. 1994;38.
5. Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grander U, Lang NP. The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 13 de dezembro de 2005;22(2):124–30.
6. Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease: Biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol*. março de 2011;38:203–13.
7. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol*. novembro de 2005;43(11):5721–32.
8. Zarco M, Vess T, Ginsburg G. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine: The oral microbiome. *Oral Dis*. março de 2012;18(2):109–20.
9. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, et al. Molecular Characterization of Subject-Specific Oral Microflora during Initial Colonization of Enamel. *Appl Environ Microbiol*. abril de 2006;72(4):2837–48.
10. Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic Biofilm Communities Develop

with *Porphyromonas gingivalis* and Initial, Early, and Late Colonizers of Enamel. *J Bacteriol.* 15 de novembro de 2009;191(22):6804–11.

11. Ichioka Y, Derks J, Dahlén G, Berglundh T, Larsson L. In vitro evaluation of chemical decontamination of titanium discs. *Sci Rep.* 23 de novembro de 2021;11(1):22753.
12. Toma S, Behets C, Brex MC, Lasserre JF. In Vitro Comparison of the Efficacy of Peri-Implantitis Treatments on the Removal and Recolonization of *Streptococcus gordonii* Biofilm on Titanium Disks. *Materials.* 6 de dezembro de 2018;11(12):2484.
13. Dhaliwal JS, Abd Rahman NA, Ming LC, Dhaliwal SKS, Knights J, Albuquerque Junior RF. Microbial Biofilm Decontamination on Dental Implant Surfaces: A Mini Review. *Front Cell Infect Microbiol.* 8 de outubro de 2021;11:736186.
14. Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* outubro de 2012;23:67–76.
15. Monje A, Amerio E, Cha JK, Kotsakis G, Pons R, Renvert S, et al. Strategies for implant surface decontamination in peri-implantitis therapy. *Int J Oral Implant.*
16. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J.* junho de 2022;72(3):269–77.
17. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent.* dezembro de 2020;103:103497.
18. Ready D, Theodoridis G, Green I, Ciric L, Pratten J, Tay W, et al. In vitro evaluation of the antibiofilm properties of chlorhexidine and delmopinol on dental implant surfaces. *Int J Antimicrob Agents.* junho de 2015;45(6):662–6.
19. Ryu HS, Kim YI, Lim BS, Lim YJ, Ahn SJ. Chlorhexidine Uptake and Release From Modified Titanium Surfaces and Its Antimicrobial Activity. *J Periodontol.* novembro de 2015;86(11):1268–75.
20. Podhorsky A, Biscopig S, Rehmann P, Streckbein P, Domann E, Wöstmann

- B. Transfer of Bacteria into the Internal Cavity of Dental Implants After Application of Disinfectant or Sealant Agents In Vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. maio de 2016;563–70.
21. Krishnamoorthy G, Narayana A, Balkrishnan D. Chlorhexidine for the Treatment of Peri-Implantitis: Is it a Benison? *J Long Term Eff Med Implants*. 2022;32(1):19–23.
22. Lee JY, Kim KH, Park SY, Yoon SY, Kim GH, Lee YM, et al. The bactericidal effect of an atmospheric-pressure plasma jet on *Porphyromonas gingivalis* biofilms on sandblasted and acid-etched titanium discs. *J Periodontal Implant Sci*. 2019;49(5):319.
23. Ye M, Liu W, Cheng S, Yan L. Efficacy of Adjunctive Chlorhexidine in non-surgical treatment of Peri-Implantitis/Peri-Implant Mucositis: An updated systematic review and meta-analysis. *Pak J Med Sci [Internet]*. 25 de janeiro de 2023 [citado 21 de agosto de 2023];39(2). Disponível em: <https://www.pjms.org.pk/index.php/pjms/article/view/7253>
24. Makeeva IM, Tambovtseva NV. [Applying toothpaste and mouthwash BLUEM in complex oral care in patients with coronary heart disease]. *Stomatologiya (Sofia)*. 2014;93(3):18–20.
25. Deliberador TM, Weiss SG, Rychuv F, Cordeiro G, Cate MCLT, Leonardi L, et al. Comparative Analysis in Vitro of the Application of blue® Oral Gel versus Chlorhexidine on *Porphyromonas gingivalis*: A Pilot Study. *Adv Microbiol [Internet]*. 2020 [citado 21 de agosto de 2023];10(04):194–201. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/doi.aspx?doi=10.4236/aim.2020.104015>
26. Cunha EJ, Auersvald CM, Deliberador TM, Gonzaga CC, Esteban Florez FL, Correr GM, et al. Effects of Active Oxygen Toothpaste in Supragingival Biofilm Reduction: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Dent*. 1º de julho de 2019;2019:1–7.
27. Mattei BM, Imanishi SAW, Ramos GDO, Campos PSD, Weiss SG, Deliberador TM. Mouthwash with Active Oxygen (blue®) Induces Keratinocytes Proliferation. *Open*

J Stomatol. 2020;10(06):107–14.

28. Mattei BM, Imanishi SAW, De Oliveira Ramos G, De Campos PS, Weiss SG, Deliberador TM. Mouthwash with Active Oxygen (blue®m) Reduces Postoperative Inflammation and Pain. Kasaj A, organizador. Case Rep Dent. 31 de maio de 2021;2021:1–6.
29. Shibli JA, Rocha TF, Coelho F, De Oliveira Capote TS, Saska S, Melo MA, et al. Metabolic activity of hydro-carbon-oxo-borate on a multispecies subgingival periodontal biofilm: a short communication. Clin Oral Investig. outubro de 2021;25(10):5945–53.
30. Santos VCED, Maquera-Huacho PM, Imbriani MJM, Minhaco VMTR, Spolidorio DMP. Effects of BlueM® against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression. Braz Dent J. fevereiro de 2023;34(1):19–28.
31. Hollaar VRY. How effective is Blue®m? Ned Tijdschr Tandheelkd. 7 de fevereiro de 2020;127(02):79–82.
32. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomed Pharmacother. outubro de 2018;106:1098–107.
33. Prażmo E, Mielczarek A, Kwaśny M, Łapiński M. Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. Adv Clin Exp Med. 2016;25(4):799–807.
34. Wang J, Geng T, Wang Y, Yuan C, Wang P. Efficacy of antibacterial agents combined with erbium laser and photodynamic therapy in reducing titanium biofilm vitality: an in vitro study. BMC Oral Health. 19 de janeiro de 2023;23(1):32.
35. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, et al. Disinfect *Porphyromonas gingivalis* Biofilm on Titanium Surface with Combined Application of Chlorhexidine and Antimicrobial Photodynamic Therapy. Photochem Photobiol. maio de 2019;95(3):839–45.
36. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium

- surface. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* março de 2019;25:382–8.
37. Huang TC, Chen CJ, Ding SJ, Chen CC. Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces *in vitro*. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* março de 2019;25:7–16.
38. Kim SH, Park SH, Chang BS, Lee SY, Lee JK, Um HS. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using methylene blue and red color diode laser on biofilm attached to sandblasted and acid-etched surface of titanium. *Lasers Dent Sci.* dezembro de 2017;1(2–4):83–90.
39. Decker EM, Bartha V, Von Ohle C. Improvement of Antibacterial Efficacy Through Synergistic Effect in Photodynamic Therapy Based on Thiazinium Chromophores Against Planktonic and Biofilm-Associated Periodontopathogens. *Photomed Laser Surg.* abril de 2017;35(4):195–205.
40. Giannelli M, Landini G, Materassi F, Chellini F, Antonelli A, Tani A, et al. Effects of photodynamic laser and violet-blue led irradiation on *Staphylococcus aureus* biofilm and *Escherichia coli* lipopolysaccharide attached to moderately rough titanium surface: *in vitro* study. *Lasers Med Sci.* maio de 2017;32(4):857–64.
41. De Paula GS, Oliveira MC, Sales LS, Boriollo M, Rodrigues LKA, Nobre-dos-Santos M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy mediated by methylene blue coupled to β -cyclodextrin reduces early colonizing microorganisms from the oral biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* junho de 2021;34:102283.
42. Lackmann JW, Bandow JE. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol.* julho de 2014;98(14):6205–13.
43. Koban I, Holtfreter B, Hübner NO, Matthes R, Sietmann R, Kindel E, et al. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs *in vitro* - proof of principle experiment: Non-thermal plasma against dental biofilms. *J Clin Periodontol.* outubro de 2011;38(10):956–65.
44. Idlibi AN, Al-Marrawi F, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, et al. Destruction of oral biofilms formed *in situ* on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. *Biofouling.* abril de 2013;29(4):369–79.

45. Preissner S, Wirtz HC, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, et al. Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An *in-vitro* -study. *J Biophotonics*. junho de 2016;9(6):637–44.
46. Abonti TR, Kaku M, Kojima S, Sumi H, Kojima S, Yamamoto T, et al. Irradiation effects of low temperature multi gas plasma jet on oral bacteria. *Dent Mater J*. 2016;35(5):822–8.
47. Yang Y, Guo J, Zhou X, Liu Z, Wang C, Wang K, et al. A novel cold atmospheric pressure air plasma jet for peri-implantitis treatment: An *in vitro* study. *Dent Mater J*. 2018;37(1):157–66.
48. Carreiro AFP, Delben JA, Guedes S, Silveira EJD, Janal MN, Vergani CE, et al. Low-temperature plasma on peri-implant–related biofilm and gingival tissue. *J Periodontol*. maio de 2019;90(5):507–15.
49. Zhou X, Wu D, Liang D, Zhang W, Shi Q, Cao Y. Evaluation of modified cold-atmospheric pressure plasma (MCAP) for the treatment of peri-implantitis in beagles. *Oral Dis*. março de 2022;28(2):495–502.
50. Lima GDMG, Borges AC, Nishime TMC, Santana-Melo GDF, Kostov KG, Mayer MPA, et al. Cold Atmospheric Plasma Jet as a Possible Adjuvant Therapy for Periodontal Disease. *Molecules*. 15 de setembro de 2021;26(18):5590.
51. Hui WL, Perrotti V, Piattelli A, Ostrikov K, Fang Z, Quaranta A. Cold atmospheric plasma coupled with air abrasion in liquid medium for the treatment of peri-implantitis model grown with a complex human biofilm: an *in vitro* study. *Clin Oral Investig*. dezembro de 2021;25(12):6633–42.
52. Flörke C, Janning J, Hinrichs C, Behrens E, Liedtke KR, Sen S, et al. In-vitro assessment of the efficiency of cold atmospheric plasma on decontamination of titanium dental implants. *Int J Implant Dent*. dezembro de 2022;8(1):12.
53. Patil C, Agrawal A, Abullais SS, Arora S, Khateeb SU, Fadul A, Elagib M. Effectiveness of Different Chemotherapeutic Agents for Decontamination of Infected Dental Implant Surface: A Systematic Review. *Antibiotics*. 28 de abril de 2022;11(5):593.

54. Borges AC, Lima GDMG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. Nguyen MH, organizador. PLOS ONE. 27 de junho de 2018;13(6):e0199832.
55. Borges AC, Nishime TMC, De Moura Rovetta S, Lima GDMG, Kostov KG, Thim GP, et al. Cold Atmospheric Pressure Plasma Jet Reduces *Trichophyton rubrum* Adherence and Infection Capacity. *Mycopathologia*. outubro de 2019;184(5):585–95.
56. Marchi AP, Farrel Côrtes M, Vásconez Noguera S, Rossi F, Levin AS, Figueiredo Costa S, et al. Chlorhexidine susceptibility and Eagle effect in planktonic cells and biofilm of nosocomial isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. junho de 2023;42(6):787–92.
57. Theinkom F, Singer L, Cieplik F, Cantzler S, Weilemann H, Cantzler M, et al. Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms in vitro. Cartelle Gestal M, organizador. PLOS ONE. 26 de novembro de 2019;14(11):e0223925.
58. Hui WL, Perrotti V, Piattelli A, Ostrikov K, Fang Z, Quaranta A. Cold atmospheric plasma coupled with air abrasion in liquid medium for the treatment of peri-implantitis model grown with a complex human biofilm: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. dezembro de 2021;25(12):6633–42.
59. Wagner G, Eggers B, Duddeck D, Kramer FJ, Bourauel C, Jepsen S, et al. Influence of cold atmospheric plasma on dental implant materials — an in vitro analysis. *Clin Oral Investig*. março de 2022;26(3):2949–63.
60. Hui WL, Perrotti V, Iaculli F, Piattelli A, Quaranta A. The Emerging Role of Cold Atmospheric Plasma in Implantology: A Review of the Literature. *Nanomaterials*. 31 de julho de 2020;10(8):1505.
61. Alasqah MN. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy on dental implant surfaces: A systematic review of in vitro studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. março de 2019;25:349–53.
62. Matthes R, Jablonowski L, Pitchika V, Holtfreter B, Eberhard C, Seifert L, et al. Efficiency of biofilm removal by combination of water jet and cold plasma: an in-

vitro study. BMC Oral Health. dezembro de 2022;22(1):157.