

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Marcelo Fernandes de Castro

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA
SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA E DA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE BIOFILME DE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE
TITÂNIO**

SÃO PAULO

2024

Marcelo Fernandes de Castro

**EFEITO ANTIMICROBIANO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA
SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA E DA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE BIOFILME DE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE
TITÂNIO**

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

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

SÃO PAULO

2024

C351e

Castro, Marcelo Fernandes de.

Efeito antimicrobiano do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica e da terapia fotodinâmica sobre biofilme de *Streptococcus gordonii* em discos de titânio / Marcelo Fernandes de Castro. – São Paulo, 2024.

68 p. : il., color.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Hiromi Tanaka.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Santo Amaro, 2024.
Bibliografia incluída.

1. *Streptococcus gordonii*. 2. Gases de plasma. 3. Terapia fotodinâmica 4. Clorexidina 5. Biofilme. I. Tanaka, Marcia Hiromi, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 617.6

Marcelo Fernandes de Castro

EFEITO ANTIMICROBIANO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA E DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE BIOFILME DE *Streptococcus gordonii* EM DISCOS DE TITÂNIO

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

São Paulo, 25 de novembro de 2024.

Banca Examinadora

1) Prof.^a Dr^a Marcia Hiromi Tanaka

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.^a Dr^a Renata Cristiane da Silva Molina

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.^a Dr^a Cristine Haralambos Bassoukou

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.^a Dr^a Fabiana Martins e Martins de Oliveira

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.^a Dr^a Luana Campos

Professora, doutora.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

CONCEITO FINAL: _____

Dedico este trabalho aos meus pacientes que no decorrer da minha jornada profissional foram os verdadeiros protagonistas. Dedico também aos meus funcionários, colegas e amigos pelo incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todo instante a Deus pela vida e pela oportunidade de trabalhar todo dia da minha vida com odontologia.

Agradecimento especial a minha esposa Luciana as minhas duas filhas Nicole e Mariane, mulheres fortes que me apoiaram muito nesta jornada.

Agradeço aos meus colaboradores e colegas que sempre me incentivaram a continuar estudando, mesmo quando tudo mostrava o contrário.

Meu sincero muito obrigado à Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito por gentilmente permitir que usássemos o maravilhoso Laboratório de Genoma da UNESP-SJC, e me dar a oportunidade de conviver e aprender com pessoas maravilhosas e competentes como à técnica de laboratório, Clélia Aparecida de Paiva, doutorando Diego Moraes da Silva e o técnico Eduardo do Valle Ricardo.

Agradeço a CAPES pelo suporte concedido, o qual tornou esta pesquisa viável financeiramente, e a Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José dos Campos por ceder as dependências do Laboratório Genoma e do Instituto de estudos do Mar (leMar-UNESP)

Queria dizer aos meus colegas do mestrado e doutorado da UNISA que nesses quase 5 anos me lembro de somente coisa boas, aprendi muito com todos vocês.

Sem palavras para expressar minha gratidão à Universidade Santo Amaro na pessoa do digníssimo reitor Prof. Dr. Eloi Francisco Rosa, por ter me proporcionado este tempo de aprimoramento profissional, intelectual e pessoal nas dependências desta tradicionalíssima instituição de ensino.

É com grande carinho que expesso meus sinceros agradecimentos a todos os professores do programa de pós-graduação em odontologia da Universidade Santo Amaro em especial a minha orientadora a Prof.^a Dr^a Marcia Hiromi Tanaka, pela paciência, competência e disponibilidade, sem Ela tudo seria muito mais difícil.

Gostaria muito de agradecer de uma forma única ao nosso coordenador do programa de pós-graduação da Universidade Santo Amaro, o Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, o verdadeiro Mestre.

RESUMO

A implantodontia tem alcançado elevado sucesso nas últimas décadas, refletido pelo aumento significativo no número de implantes instalados. Contudo, esse crescimento está associado a uma maior incidência de falhas, que variam desde problemas na instalação até o desenvolvimento de doenças peri-implantares. O principal desafio no tratamento peri-implantar reside na descontaminação eficaz da superfície dos implantes e dos tecidos de suporte comprometidos. Esse tratamento abrange tanto as abordagens convencionais para peri-implantite quanto métodos de descontaminação da superfície do implante. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos de diferentes tratamentos de descontaminação como: plasma de baixa temperatura sobre pressão atmosférica (P), terapia fotodinâmica (T) com azul de metileno a 0,01% na forma de aplicação pulverizada (Tp) e por imersão do disco na solução (Ti), Clorexidina (CX) a 0,12% e sem tratamento (C). Um total de 180 discos, 90 de superfície lisa (SL) e 90 de superfície tratada (ST) foram divididos em 2 grupos: (1) tratamento antimicrobiano sobre biofilme de *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) formado nos discos de titânio (tratamento depois-D) e (2) tratamentos antimicrobianos prévios sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme *S. gordonii* (tratamento antes-A). O efeito antimicrobiano destes tratamentos foi avaliado pela contagem da unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/ml) realizado em triplicata. As análises qualitativas destes grupos descritos acima, tanto na superfície do implante quanto no biofilme, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk, Levene, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de 5% para todos os testes. O grupo PD mostrou maior efeito antimicrobiano sobre o biofilme formado, tanto em SL como ST, em relação aos grupos TDi, TDp e CD ($p < 0,0001$), e sem diferença estatística comparando com CXD. No entanto, quando os discos de titânio de SL eram submetidos previamente aos tratamentos antimicrobianos, o biofilme que se formava após o tratamento, PA, este se mostrou maior em número de UFC/ml do que os outros tratamentos antimicrobianos ($p < 0,05$). O tratamento prévio não fez diferença na formação do biofilme na ST. As análises qualitativas das superfícies dos discos, tanto para a SL quanto ST, mostraram a presença de resíduos e alteração da superfície após os tratamentos com P e T. As análises do biofilme após os tratamentos mostram que a CX, P e T também modificaram em quantidade e tamanhos das bactérias presentes no biofilme. Conclui-se que o plasma teve efeito antimicrobiano sobre o biofilme formado de *S. gordonii* sendo mais uma opção na desinfecção da superfície do titânio, seguido dos tratamentos com CX e T. No entanto, quando os discos eram submetidos previamente aos tratamentos antimicrobianos, estes tratamentos não faziam diferença na formação do biofilme, ao contrário, no tratamento com o PA pode ter alterado a superfície dos discos, o que aumentou a adesão bacteriana. Os resultados indicam a necessidade de avaliar os impactos de cada tratamento a longo prazo.

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

ABSTRACT

Implantology has achieved great success in recent decades, reflected by the significant increase in the number of implants installed. However, this growth is associated with a higher incidence of failures, ranging from installation problems to the development of peri-implant diseases. The main challenge in peri-implant treatment lies in the effective decontamination of the implant surface and compromised supporting tissues. This treatment encompasses both conventional approaches to peri-implantitis and implant surface decontamination methods. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of different decontamination treatments such as: low-temperature plasma under atmospheric pressure (P), photodynamic therapy (T) with 0.01% methylene blue in the form of spray application (Tp) and by immersion of the disc in the solution (Ti), chlorhexidine (CX) at 0.12% and without treatment (C). A total of 180 discs, 90 smooth surfaces (SL) and 90 treated surfaces (ST) were divided into 2 groups: (1) antimicrobial treatment on *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) biofilm formed on the titanium discs (treatment after-D) and (2) previous antimicrobial treatments on the titanium discs before the formation of *S. gordonii* biofilm (treatment before-A). The antimicrobial effect of these treatments was evaluated by counting the colony forming unit per milliliter (CFU/ml) performed in triplicate. The topographic analyses of these groups described above, both on the implant surface and on the biofilm, were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The data were submitted to the Shapiro-Wilk, Levene, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, with a significance level of 5% for all tests. The PD group showed a greater antimicrobial effect on the biofilm formed, both in SL and ST, in relation to the TDi, TDp and CD groups ($p < 0.0001$), and with no statistical difference compared to CXD. However, when the SL titanium discs were previously subjected to antimicrobial treatments, the biofilm that formed after treatment, PA, was shown to be greater in number of CFU/ml than the other antimicrobial treatments ($p < 0.05$). The previous treatment did not make a difference in the formation of the biofilm in the ST. The topographic analyses of the surfaces of the discs, both for SL and ST, showed the presence of residues and surface alteration after treatments with P and T. The analyses of the biofilm after the treatments showed that CX, P and T also modified the quantity and size of the bacteria present in the biofilm. It was concluded that the plasma had an antimicrobial effect on the biofilm formed by *S. gordonii*, being another option in the disinfection of the titanium surface, followed by treatments with CX and T. However, when the discs were previously subjected to antimicrobial treatments, these treatments did not make a difference in the formation of the biofilm; on the contrary, the treatment with PA may have altered the surface of the discs, which increased bacterial adhesion. The results indicate the need to evaluate the impacts of each treatment in the long term.

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

Lista de abreviaturas e/ou siglas

AM - Azul de metileno

Ar - Argônio

AT - Azul de toluidina

BHI - Brain Heart Infusion

CA - Controle antes

CD - Controle depois

Cel/ml - Células por mililitro

CO₂ - Gás carbônico

CX - Clorexidina

CXA - Clorexidina antes

CXD - Clorexidina depois

DO - Densidade óptica

ERs - Espécies reativas

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GAPDH - Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase

g/l - grama por litro

He - Hélio

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

leMar - Instituto de Estudos do Mar

AlGaInP - laser diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo

J - Joules

LED - Light Emiting Diode

MAIR-IR - Espectrometria de infravermelho de reflexão interna atenuada múltipla

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

$\mu\text{M/l}$ - Micro mol por litro

N_2 - Nitrogênio

O_2 - Oxigênio

P - Plasma de Baixa Temperatura sob Pressão Atmosférica

PA - Plasma antes

PCR-RT - Reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

PD - Plasma depois

SL - Superfície lisa

ST - Superfície tratada

T - Terapia fotodinâmica

TAi - Terapia fotodinâmica antes imersão

TAp - Terapia fotodinâmica antes pulverizado

TDi - Terapia fotodinâmica depois imersão

TDp - Terapia fotodinâmica depois pulverizado

UFC/ml - Unidade formadora de colônia por mililitro

Lista de Figuras e Gráficos

Figura 1: Desenho do estudo dos tratamentos antimicrobianos avaliados.....	28
Figura 2: Disco de titânio sendo retirado da embalagem estéril e colocado no poço...29	
Figura 3: Dois ml de inóculo de <i>S. gordonii</i> a 10 ⁶ cél/ml sendo depositado sobre o disco.....	30
Figura 4: Discos de SL e ST com biofilme formado	30
Figura 5: Laser sendo aplicado com auxílio do dispositivo de suporte	32
Figura 6: Configuração do P utilizado no estudo.....	32
Figura 7: Aplicação do P	33
Figura 8: Diluição seriada.....	34
Figura 9: placas sendo incubadas.....	35
Figura 10: Placas prontas para contagem de UFC/ml.....	35
Figura 11: Aparelho MEV.....	38
Figura 12: Desenho do estudo dos tratamentos antimicrobianos avaliados.....	39
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície lisa de disco de titânio (aumento de 7000x).....	50
Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície lisa de disco de titânio (aumento de 20000x).....	51
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície tratada de disco de titânio (aumento de 7000x).....	52
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície tratada de disco de titânio (aumento de 20000x).....	53
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> sobre superfície lisa de disco de titânio (aumento 7000x).....	54
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> sobre superfície lisa de disco de titânio(aumento de 20000x)	55

Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> sobre superfície tratada de disco de titânio (aumento 7000x).....	56
Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> sobre superfície tratada de disco de titânio (aumento 20000x).....	57
Gráfico 1: Tratamento antimicrobiano sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> formado nos discos de titânio (tratamento depois).....	43
Gráfico 2: Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme (tratamento antes).....	44
Gráfico 3: Tratamento antimicrobiano em superfície lisa.....	46
Gráfico 4: Tratamento antimicrobiano em superfície tratada.....	48

SUMÁRIO

1. Introdução -----	14
2 Revisão de Literatura -----	17
2.1 Clorexidina (CX) -----	17
2.2 Terapia Fotodinâmica (T) -----	19
2.3 Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (P) -----	22
3 Objetivo -----	26
3.1 Objetivo geral -----	26
3.2 Objetivos específicos -----	26
4 Materiais e Métodos -----	27
4.1 Seleção dos discos de titânio para cada grupo de tratamentos antimicrobianos -----	27
4.2 Tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio -----	29
4.2.1 Formação do biofilme de <i>S. gordonii</i> em discos de titânio -	29
4.2.2 Tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio -----	31
4.3 Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme -----	36
4.4 Análise qualitativa da SL e ST dos discos de titânio após os tratamentos e análise da superfície do biofilme formado sobre os discos após os tratamentos -----	38
4.4.1 Análise qualitativa dos discos de titânio de SL e ST após os tratamentos antimicrobianos, sem o biofilme -----	40
4.4.2 Análise qualitativa do biofilme formado sobre os discos de titânio de SL e ST após os tratamentos antimicrobianos -----	40
5 Análise Estatística -----	41
6 Resultados -----	42

6.1 Tratamento antimicrobiano sobre biofilme de <i>S. gordonii</i> formado nos discos de titânio	42
6.2 Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme	44
6.3 Superfície lisa	45
6.4 Superfície tratada	47
6.5 Análise qualitativa dos discos de titânio e do biofilme de <i>S. gordonii</i> após os tratamentos antimicrobianos	49
6.5.1 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre a SL dos discos de titânio	49
6.5.2 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre a ST dos discos de titânio	51
6.5.3 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre o biofilme de <i>S. gordonii</i> na SL dos discos de titânio	53
6.5.4 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre o biofilme de <i>S. gordonii</i> na ST dos discos de titânio	55
7 Discussão	58
8 Conclusão	62
9 Referências	63

1. Introdução

O aumento exponencial de implantes dentários instalados nas últimas décadas e a alta taxa de sobrevivência vem acompanhado na mesma proporção de casos de insucessos¹. Uma das principais causas de falhas tardias destes implantes são as doenças peri-implantares como a mucosite peri-implantar e a peri-implantite².

A peri-implantite é uma condição patológica associada ao biofilme oral, caracterizada por inflamação na mucosa peri-implantar e subsequente perda progressiva dos tecidos que suportam o implante³. Semelhante a periodontite, a peri-implantite, é uma condição inflamatória que pode ser influenciada pelo biofilme bacteriano oral devido a heterogeneidade e complexidade do microbioma⁴. A perda óssea decorrente da peri-implantite pode levar a exposição da superfície do implante acarretando problemas estéticos e funcionais que comprometem o sucesso a longo prazo dos tratamentos com implantes. Uma vez exposta a superfície do implante, suas características físicas como rugosidades e porosidades aumentam a susceptibilidade à colonização bacteriana e dificultam a remoção do biofilme^{5,6}.

Semelhante ao dente natural a colonização da superfície do implante se dá de uma forma rápida, seguindo a mesma dinâmica e após 3 meses apresenta a mesma composição do biofilme formado em dentes naturais⁷. O biofilme bucal é uma comunidade microbiológica complexa e dinâmica^{5,8} e a sua formação também acontece em várias etapas, inicialmente ocorre uma colonização por bactérias comensais como os *Streptococcus spp*, *Actinomyces spp*. O biofilme primário é colonizado por bactérias como *Veillonella parvula*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium spp.*, *Treponema spp*, em um estágio intermediário aparecem bactérias do tipo *Fusobacterium nucleatum* e em sua fase madura os colonizadores tardios, por exemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia*, *Eubacterium spp.*, *Treponema spp*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)⁹. Dentre os colonizadores primários, podemos destacar *Streptococcus gordinii* (*S. gordonii*), uma bactéria gram-positiva que faz parte do bioma bucal saudável, porém, em condições propícias este microrganismo desenvolve um papel importantíssimo na formação do biofilme bucal patogênico. O *S. gordonii* utiliza proteínas multifuncionais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para aumentar a adesão bacteriana. Estas enzimas também afetam o equilíbrio oxidado

reduzidor do hospedeiro, criando condições mais favoráveis as células bacterianas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelo *S. gordonii* também converte a oxiemoglobina em metemoglobina, tanto em condições micro aeróbicas quanto em condições anaeróbicas, ajudando a congregação do *P. gingivalis* bem como no processo proteolítico deste patógeno, desempenhando deste modo um papel importante nos estágios mais graves da peri-implantite¹⁰.

A peri-implantite pode ser tratada com as terapias não cirúrgica ou cirúrgica. O método não cirúrgico é eficaz na redução da inflamação dos tecidos periodontais, porém em casos severos, o tratamento cirúrgico é frequentemente recomendado e pode ser dividido em três categorias: cirúrgico com retalho; terapia ressectiva e enxerto de tecido¹¹. Estas terapias podem ser associadas aos métodos de descontaminação da superfície do implante como o uso de jatos abrasivos, escovas rotativas com pedra-pomes¹², terapia fotodinâmica (T) e irrigação com ácido cítrico, delmopinol, H_2O_2 ou clorexidina⁴.

A clorexidina (CX) é o antisséptico mais usado para evitar e/ou diminuir a formação do biofilme, assim como na descontaminação de superfícies já infectadas^{13,14}. Por outro lado, existem estudos que comprovam efeitos colaterais como citotoxicidade, coloração extrínseca dos tecidos bucais e alterações temporárias do paladar associados à CX¹⁵⁻¹⁷, além de problemas gravíssimos de resistência antibiótica¹⁸.

Na busca de uma solução para os problemas acima citados, estudos recentes vêm demonstrando a eficácia de tratamentos físico-químicos no combate a formação de biofilme, como por exemplo, a T, onde um comprimento adequado de onda de luz ressonante é combinado a um agente fotossensível como o azul de metileno, se mostra capaz de neutralizar bactérias mesmo no interior do biofilme^{19,20}.

Outro tipo de tratamento físico-químico que tem se mostrado eficiente na diminuição do crescimento bacteriano, tanto em culturas planctônicas quanto na formação do biofilme bucal é o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (P)²¹⁻²⁴. Este tipo de tratamento de superfície já é utilizado em larga escala pela indústria alimentícia²⁵ e em medicina para tratamento cicatricial de feridas²⁶. Em odontologia o P se mostrou eficaz na inibição da formação e eliminação do biofilme em fios de sutura²¹ e superfície de discos de titânio²⁷.

No entanto, estes métodos de tratamento necessitam de mais estudos para que tenham uma padronização de uso sobre a pré-formação e sobre biofilme bucal já formado. Sabendo que o *S. gordonii* desempenha um papel fundamental na formação do biofilme peri implantar, o estudo desta bactéria é justificado. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano do P, da T e da CX em discos de titânio de superfície lisa (SL) e tratada (ST), sem e com biofilme de *S. gordonii*.

2. Revisão de Literatura

O biofilme dental é o principal fator etiológico da peri-implantite. A infecção bacteriana dos tecidos moles peri-implantares tem sido considerada a principal causa de perda óssea ao redor dos implantes após o período de remodelação óssea inicial com risco de peri-implantite para 1 a cada 5 implantes². Dentre os tratamentos da peri-implantite, 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 descontaminação da superfície dos implantes no intuito de se obter a redução das bolsas peri-implantares e uma re-osseointegração¹¹. Em recente revisão sistemática sobre a eficácia do uso de terapias auxiliares no tratamento da peri-implantite, foram analisados ensaios clínicos randomizados e estudos clínicos controlados que associaram o tratamento cirúrgico da peri-implantite a terapias físico-químicas e mecânicas para descontaminação da superfície de implantes. Os autores não conseguiram comprovar a eficiência destas terapias, devido à falta de estudos clínicos comparativos sobre estas modalidades de tratamento bem como a heterogeneidade dos poucos estudos encontrados²⁸.

Diante de uma gama de tratamentos usados para descontaminação da superfície dos implantes durante a terapia peri-implantar, o foco será o uso da CX, da T com laser vermelho com comprimento de onda 660 nanômetros (nm) associado ao azul de metileno a 0,01% e do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica como adjuvantes no tratamento da doença peri-implantar. Portanto, essa 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 (CX)

A CX ainda é considerada o padrão ouro na descontaminação da superfície dos implantes dentários com efeitos clínicos bem documentado na terapia periodontal. A CX é um antisséptico de largo espectro, tanto para bactérias Gram negativas e positivas assim como em fungos e alguns vírus. A molécula de CX é rapidamente atraída pelas cargas negativas da superfície celular bacteriana, causando a ruptura da membrana e por consequência a morte celular²⁹. Por outro lado, outros autores questionam a eficácia da clorexidina no tratamento peri-implantar¹¹, bem como seus

efeitos citotóxicos nas células do paciente^{15,16}. Sendo assim, muitos estudos comparam a ação de novos descontaminantes com a CX⁴.

Podhorsky et al. (2016)³⁰ avaliaram a efetividade antimicrobiana de três produtos utilizados como selantes para implantes. As partes internas dos implantes 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 reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (PCR-RT). Os autores relataram que todos os agentes aplicados foram capazes de reduzir significativamente a carga bacteriana, dos quais a CX teve a menor contaminação dentre os produtos avaliados.

Deliberador et al. (2020)³¹ também compararam o efeito antibacteriano da CX com outros agentes antissépticos usados em implantodontia. Os autores compararam o poder de inibição do crescimento bacteriano da CX a 0,12% com diferentes concentrações de um gel de oxigênio ativo em 3 diferentes concentrações de oxigênio ativo, 50, 75 e 100%. O raio de inibição do crescimento de *P. gingivalis* foi duas vezes maior para clorexidina a 0,12% em relação o gel de oxigênio nas concentrações de 75 e 100%.

Visando esclarecer a eficácia do uso de CX na terapia peri-implantar³², em um estudo clínico randomizado associando o uso de irrigadores orais com CX no tratamento da mucosite peri-implantar. Os pacientes foram divididos em três grupos: o grupo 1 foi instruído a fazer a higiene oral convencional, o grupo 2 foi instruído a usar o irrigador com 50 ml de água após a higiene oral noturna e o grupo 3 foi instruído a usar o irrigador com 50 ml de solução de CX 0,06% após a higiene oral noturna. Os autores concluíram que o uso de irrigador + CX 0,06% reduziram a os sinais clínicos da mucosite peri-implantar. Após 12 semanas, a taxa de prevalência de mucosite peri-implantar foi de 30% em todos os implantes examinados. A menor taxa de prevalência da doença foi de 5% no grupo 3, seguido de 35% no grupo 2 e 50% no grupo 1.

Ye et al. (2023)³³ realizaram uma revisão sistemática e meta-análise sobre a eficácia da CX no tratamento não cirúrgico da mucosite perimplantar e da peri-implantite. Após analisarem 12 estudos clínicos randomizados e 2 estudos clínicos controlados que utilizaram somente a CX como agente desinfetante em pacientes

com mucosite peri-implantar (10 estudos) e peri-implantite (4 estudos). Os autores evidenciaram uma redução significativa somente na profundidade de sondagem em pacientes que usavam a CX como adjuvante no tratamento da peri-implantite e da mucosite peri-implantar. Foi concluído que as evidências sobre a eficácia da CX para a mucosite peri-implantar são conflitantes devido ao número limitado de estudos, e que parece não haver um impacto significativo da CX nos resultados do tratamento da mucosite peri-implantar e da peri-implantite.

Cheng et al. (2023)¹¹ analisaram na revisão sistemática e meta-análise sobre os tratamentos cirúrgicos como cirurgia de retalho aberto, tratamento resectivo e enxertos de tecidos moles com ou sem o uso de terapias adjuntas no processo de descontaminação da superfície do implante. Concluíram que os tratamentos que aumentam o volume de tecido conjuntivo apresentaram bons resultados no ganho de tecido ósseo, contudo os autores não encontraram evidencia que o uso de terapias coadjuvantes como T, CX e outros fizessem diferença nos resultados.

Em uma revisão de literatura sobre o efeito da CX nos osteoblastos e na topografia da superfície dos implantes dentários, Krishnamoorthy et al. (2022)¹⁶ concluíram que o uso da CX como descontaminante da superfície do implante deve ser desencorajado pois, pode alterar a topografia da superfície dos implantes dentários e causar citotoxicidade prejudicando o potencial de reosseointegração do implante dentário.

Deste modo fica evidente que mais estudos devem ser desenvolvidos para avaliar a eficácia e segurança do uso de CX nos tratamentos peri-implantares.

2.2. Terapia Fotodinâmica (T)

A T é a associação de uma fonte de luz com um agente fotossensibilizador como, por exemplo, o azul de metileno (AM). Assim, o comprimento de onda adequado estimula o agente fotossensibilizador a liberar espécies reativas de oxigênio (EROs) que oxidam os microrganismos³⁴.

Os efeitos da T sobre biofilme de colonizadores primários como *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foram estudados por De Paula et al. (2021)³⁵, no estudo foi usado uma associação de AM e nanopartículas de β -ciclodextrina como agente fotossensibilizador. Concluíram que a T, mediada por β -ciclodextrina encapsulada

com AM e irradiada por laser ou LED foi capaz de reduzir a formação do biofilme multiespécies presentes nos estágios iniciais da doença peri-implantar.

Perumal et al. (2024)³⁴ analisaram os resultados de diversos ensaios clínicos que usaram a T com o AM como agente fotossensibilizador e laser de diodo com comprimento de onda de aproximadamente 660nm no tratamento da doença periodontal. Foi concluído que esta modalidade de tratamento oferece vantagens como redução nos índices de sangramento e profundidade de sondagem dentre outros parâmetros periodontais

Focando na descontaminação da superfície do titânio, Cheng et al. (2023)¹¹ realizaram uma revisão sistemática e meta análise sobre os resultados dos tratamentos periodontais cirúrgicos com ou sem o uso de terapias adjuntas no processo de descontaminação da superfície do implante (T, antibioticoterapia local e ozonoterapia). Os autores concluíram que os tratamentos que aumentam o volume de tecido conjuntivo tiveram bons resultados no aumento ósseo, contudo, os parâmetros de controle de inflamação dos tecidos gengivais se mostraram semelhantes aos obtidos com a terapia cirúrgica.

Por outro lado, Nemezio et al. (2017)²⁹ estudaram o efeito da T com AM a 0,01% sobre o biofilme de *S. mutans* em discos de acrílico. Os autores comparam os resultados obtidos com a CX a 0,12% como controle positivo e solução salina como controle negativo. Os discos com biofilme dos grupos controles foram tratados duas vezes ao dia, em seguida foi realizado a contagem de UFC/ml. Os discos com biofilme do grupo teste, ficaram em contato com o AM a 0,01% por 5 min em ambiente escuro antes de receberem a irradiação com laser de diodo por 90 segundos para cada lado do disco. Os autores anotaram que a T com AM a 0,01% e laser de diodo, conseguiu reduzir consideravelmente a contagem de UFC/ml, contudo, a CX apresentou melhores resultados. Os autores concluíram que nas condições testadas a T pode ser considerada um eficiente método para o controle do biofilme.

Um outro tipo de agente fotossensibilizador, a cúrcuma, foi usado por Ahrari F et al. (2024)³⁶, nesse experimento foram usadas soluções de cúrcuma nas concentrações de 1.5 g/L, 3 g/L, a nano-cúrcuma 3 g/L, e eritrosina a 100 µM/L e 250 µM/L em cultura planctônica e biofilme de *S. mutans*. Um diodo emissor de luz azul com comprimento de onda central de 450 nm serviu como fonte de luz. Os autores

conferiram que a T chegou a ser superior que a CX na eliminação do biofilme quando usada a cúrcuma a 3g/L e a eritrosina a 250 µM/L, os autores chegaram à conclusão qde que a T é um tratamento eficiente na desinfecção do biofilme de *S. mutans*.

Mang et al. (2016)¹⁹, em um estudo in vitro os autores comprovaram a eficácia da T na desinfecção de biofilme de *F. nucleatun* em discos de titânio e prismas de germânio. Após a formação do biofilme, os discos e os primas ficaram imersos por 30 minutos em uma solução de porfímero sódico. Em seguida foi aplicado o laser de diodo com ondas de 630nm, 150mW/cm² na potência de 25, 50 e 100J/cm². A eficiência de cada experimento foi comprovada fazendo a contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml), espectrometria de infravermelho de reflexão interna atenuada múltipla (MAIR-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As bactérias sofreram danos morfológicos significativos causados pelo estresse oxidativo das espécies reativas liberadas pela T, diminuindo a capacidade de agregação em biofilme. Contudo os autores afirmam que neste estudo a eficácia da T foi dose dependente. Os autores recomendam o debridamento para remoção mecânica de bactérias mortas e biofilme danificado após o tratamento com T de maneira a melhorar a eficácia clínica do tratamento.

Cai et al. (2019)³⁷, também testaram a T na eliminação do biofilme de *P gingivalis* em discos de titânio. O biofilme de *P gingivalis* foi tratado com aplicação de azul de toluidina (AT) e laser de diodo de 630nm e por 60 segundos com densidade de energia de saída de 31,5 J/cm². Foram utilizados 32 discos distribuídos em 4 grupos controle sem tratamento; grupo CX, discos imersos em CX0,2% por 1 min; grupo TF, discos cobertos com 100 µg/mL de AT a 0.01% por 1 min e irradiados por 1 min e grupo CX +T, tratamento com CX primeiro e depois com T. A eficácia dos tratamentos foi comprovada com a contagem de UFC/ml, MEV e microscopia confocal de varredura a laser para verificar a viabilidade bactéria pelo teste vivo/morto. Os autores afirmam que não encontraram diferença entre o tratamento do biofilme com T ou CX separadamente, contudo, a aplicação da T após o tratamento com CX apresentou uma diferença estatística significativa quando comparada aos tratamentos isolados.

Este mesmo grupo em um estudo diferente, Cai Z et al. (2019)³⁸ também testaram a desinfecção do biofilme de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) formado em

discos de titânio de superfície lisa e tratada. O experimento foi composto de um grupo controle (sem tratamento), CX a 02%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%, T e uma solução de CX 0,2% + H₂O₂ a 3%. Os autores chegaram à conclusão de que todos os métodos de desinfecção reduziram significativamente a contagem de unidade formadora de colônia (UFC/ml) em comparação ao grupo controle independentemente do tipo de superfície. Contudo a combinação de CX ou H₂O₂ com F 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 poderia ser um método mais eficiente para o tratamento da peri-implantite.

2.3. Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (P)

O P é gerado por uma descarga elétrica e um gás nobre como hélio (He) e Argônio (Ar) ou molecular como oxigênio (O₂) e nitrogênio (N₂)³⁹. O P é composto de partículas neutras, como átomos, moléculas e neutrons; partículas carregadas como: íons, elétrons e diversas espécies reativas (ERs). As ERs podem ter vida longa como as espécies reativas de nitrogênio (ERN) ou vida curta como as espécies reativas de oxigênio (ERO). O P também é referido como plasma não térmico, plasma frio, plasma físico e plasma de gás⁴⁰.

Mahasneh et al. (2011)⁴¹ testaram o efeito antimicrobiano do P de hélio sobre *P. gingivalis* nos tempos de 5,7,9 e 11 segundos de exposição. Os autores aplicaram o P diretamente nas placas de cultura inoculada com *P. gingivalis* e comparam com placas controle, onde somente o fluxo de gás hélio foi usado. Após o tratamento as placas foram incubadas e o halo inibitório foi medido em centímetros. Os resultados mostram diferença estatística entre o grupo controle, onde não houve inibição, e entre os grupos testes de acordo com o tempo, quanto maior o tempo de exposição maior o halo inibitório. Os autores afirmam que o P foi eficiente na inativação deste tipo de bactéria, porém, seu efeito é tempo dependente. Os autores sugerem que o *P. gingivalis* exigiu um tempo considerável de exposição devido a sua capacidade de produção de superóxido dismutase, enzima que neutraliza os efeitos das espécies reativas de oxigênio produzidas pelo P de hélio. Os autores salientam que a estrutura morfológica desta bactéria pode também ser a razão da necessidade de longas exposições do P de hélio para sua inativação. O *P. gingivalis* é uma bactéria anaeróbica, gram-negativa não formadora de esporos que possuem algumas

semelhanças com bactérias gram-positivas, sabidamente mais resistentes aos efeitos do P. A camada externa de peptidoglicanas, única do *P. gingivalis*, seria responsável por sua maior resistência.

Lee et al. (2019)⁴² estudaram o efeito do gás hélio e do P de He sobre biofilme de *P. gingivalis* em superfície tratada de discos de titânio em 3 e 5 minutos de aplicação. Foi analisada a viabilidade bacteriana após o tratamento com P através de exames de microscopia confocal de varredura a laser. Possíveis danos estruturais e morfológicos nas bactérias foram analisados com microscopia eletrônica de varredura (MEV). A redução do número de UFC/ml com os tratamentos de gás He e P de He aumentou proporcionalmente ao tempo de tratamento, contudo a aplicação do P de He foi superior ao uso do gás somente. Não foram observadas células intactas no centro e na periferia dos discos de titânio onde foi realizada a aplicação do P de He tanto em 3 quanto em 5 minutos.

Hong et al. (2022)⁴³, analisaram o efeito do P de argônio (Ar) puro e da mistura de Ar + 1% de oxigênio sobre o biofilme de *P. gingivalis* formado sobre discos de aço cirúrgico. O P foi aplicado logo após a formação do biofilme para verificar sua ação bactericida. Foi analisado também o aumento da susceptibilidade do biofilme recuperado de *P. gingivalis* a outros tipos de agentes antimicrobianos. Após tratamento com P, o biofilme foi novamente cultivado sob estresse antimicrobiano e produtos à base de peróxido. Os autores concluíram que o P foi eficaz na destruição do biofilme e na prevenção de nova formação de biofilme sobre os discos, além de potencializar a ação de outros agentes desinfectantes. Também ficou demonstrado que a adição de 1% de oxigênio aumentou em 80 % a eficiência do tratamento devido a maior produção de ERO. Contudo os autores salientam que a efetividade do P depende da estrutura do biofilme e do tempo de aplicação, por exemplo, o tratamento foi mais eficaz no biofilme de 3 dias do que no biofilme de 5 dias, sugerindo que a estrutura mais complexa do biofilme maduro são mais resistentes.

Em um estudo in vitro, Yoo et al. (2015)²⁷, avaliaram as mudanças químicas na ST de discos de titânio produzidas pela aplicação do P de nitrogênio. Os discos foram tratados previamente a formação do biofilme de *S. mutans* e *S. aureus* por 30,60 e 120 minutos. Os autores constataram, através de espectrometria de fotoelétrons excitados por Rx, que as superfícies previamente tratadas com P sofreram uma

diminuição de espécimes de carbono e aumento de espécimes de oxigênio como hidroxilas e carboxilas. O pré-tratamento do titânio resultou na formação de ERs de vida longa na superfície do titânio as quais provocaram alterações morfológicas, mostradas pelo MEV. Conseqüentemente, diminuição da capacidade de adesão *S. mutans* e *S. aureus* na superfície tratada. Houve também uma diminuição do número de *S. mutans* e *S. aureus*, o que mostra o poder bacteriostático do P sobre a proliferação bacteriana.

Lee et al. (2019)²⁴, também avaliaram as possíveis modificações produzidas por um P de ar comprimido na superfície de discos de titânio, e a influência destas modificações na formação do biofilme de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores constataram que as alterações nas propriedades da superfície do titânio, como energia superficial, composição química e potencial redutor induzidos pelo tratamento com P, levaram a um número significativamente menor de bactérias aderidas e uma menor taxa de formação de biofilme. Interessante ressaltar que o efeito foi maior em bactérias Gram-negativas, os autores afirmam que o potencial redutor deixado pelo plasma na superfície do titânio causam maior oxidação das bactérias Gram-negativas devido às diferenças estruturais da sua parede bacteriana.

Kamionka et al. (2022)⁴⁴ comparou a associação do P de ar comprimido e jatos abrasivos na desinfecção do biofilme bucal formado sobre discos de titânio de superfícies jateada/ácido e anodizadas. Após a formação do biofilme formado por bactérias coletadas de bolsas periodontais, o estudo comparou 5 modalidades de tratamentos descontaminantes de superfícies: jateamento com glicina, jateamento com eritritol, jateamento com glicina + P, jateamento com eritritol + P e somente P. Os autores concluíram que nem o jateamento sozinho e nem o P sozinho foram totalmente eficazes na remoção do biofilme, porém a combinação dos agentes foi eficiente no tratamento do biofilme. Esta melhora pode ser associada à ação das ERs geradas pelo P. Quando comparado os efeitos de acordo com o tipo de superfície dos discos, melhores resultados foram obtidos nos grupos onde se aplicou jateamentos associados ao P na ST. Os autores associam isso ao fato que a anodização forma túneis onde os microrganismos se abrigam, dificultando a ação das micropartículas do jateamento.

Lima et al. (2021)²³ Em um estudo in vitro e in vivo, atestaram o poder de inibição do plasma de He sobre o crescimento planctônico e na formação de biofilme de *S. gordonii* e *P. gingivalis*. O biofilme foi tratado com P de gás hélio nos tempos de aplicação de 1,3,5 e 7 minutos. O diâmetro do halo de inibição aumentou proporcionalmente ao tempo de exposição. A contagem de unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml) não teve diferença significativa entre os tempos de 5 e 7 minutos de exposição. Neste mesmo estudo os autores também constataram a não toxicidade do P de He em cultura de fibroblastos gengivais o que foi comprovado também no estudo in vivo, com uma melhora significativa dos tecidos periodontais de ratos no grupo onde o tratamento com P foi aplicado duas vezes.

Gert et al. (2021)¹⁴ realizaram uma revisão sistemática sobre estudos in vitro do uso do P em patógenos associados às doenças bucais. Após analisarem 54 estudos, os autores concluíram que uso do P é eficiente no combate ao biofilme oral. O P foi considerado um tratamento promissor, já que foi capaz de reduzir significativamente o número de bactérias. Os autores também observaram que os tempos de aplicação do P utilizados nos estudos são perfeitamente adaptáveis para o uso clínico no campo da cariologia, endodontia, periodontia e implantodontia. Contudo os autores alertam que mais estudos devem ser feitos com uso de biofilmes compostos por associação de bactérias específicas a fim de se estabelecer parâmetros para o uso do P, antes de estudos clínicos serem realizados.

Como foi exposto acima, os métodos físico-químicos são ótimas opções como tratamentos adjuvantes na terapia peri-implantar. Contudo, a heterogeneidade dos trabalhos encontrados na literatura, alertam para a necessidade de mais estudos laboratoriais, de modo a se definir protocolos de aplicação destes tratamentos. Neste estudo, testamos o AM na forma pulverizada, pois esta forma de aplicação facilita sua aplicação clínica, como por exemplo na cirurgia peri-implantar.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

Avaliação do efeito antimicrobiano e análise qualitativa dos diferentes tratamentos sobre *S. gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito antimicrobiano no biofilme de 24 horas com os diferentes tratamentos (P, T e CX) sobre biofilme de *S. gordonii* em discos de titânio de SL e ST.

Análise qualitativa do biofilme de *S. gordonii* sobre os discos de titânio de SL e ST após os tratamentos antimicrobianos (PA, T e CX) analisados.

Avaliar o efeito antimicrobiano na formação do biofilme de *S. gordonii* nos discos de titânio (SL e ST) previamente tratados com P, T e CX

Análise qualitativa dos discos de titânio (SL e ST) após os tratamentos com P, T e CX.

4. Materiais e métodos

Esta pesquisa foi 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. Seleção dos discos de titânio para cada grupo de tratamentos antimicrobianos

Neste estudo, foram utilizados discos (6mm de diâmetro com 3 mm de espessura) de titânio comercialmente puro (grau IV – mesmo material utilizado para confecção de implantes), discos com a superfície lisa (SL - não tratada), e 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 divididos em 2 grupos: (1) tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio (tratamento depois) e (2) tratamentos antimicrobianos prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme (tratamento antes). Assim, de acordo com os tratamentos realizados (Figura 1), cada grupo com 10 subgrupos (5 subgrupos de SL e 5 subgrupos de ST) serão descritos a seguir:

Grupo 1. Tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio [tratamento depois (D)]

- Subgrupo TDp - Terapia Fotodinâmica com disco pulverizado com AM a 0,01% (Fórmula e Ação Farmácia, São Paulo SP Brasil) associado ao laser vermelho de comprimento de onda de 660 nm, AlGaInP (Laser Therapy EC[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) por 90s (9J) sobre biofilme formado (n=9);

-Subgrupo TDi - Terapia Fotodinâmica com imersão do disco em AM a 0,01% (Fórmula e Ação Farmácia, São Paulo SP Brasil) associado ao laser vermelho de comprimento de onda de 660 nm, AlGaInP (Laser Therapy EC[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) por 90s [9 Joules(J)] sobre biofilme formado (n=9);

- Subgrupo PD - plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (Plasma de gás Hélio / Protótipo UNESP SJC – Lima et al, 2021) sobre biofilme formado (n=9).

- Subgrupo CXD - Clorexidina 0,12% (Periogard[®], Colgate-Palmolive industrial LTDA, São Bernardo do Campo, São Paulo Brasil) sobre biofilme formado (n=9);

- Subgrupo CD- Controle (sem nenhum tipo de tratamento) sobre biofilme formado (n=9);

Grupo 2. Tratamentos antimicrobianos prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme [tratamento antes (A)]

- Subgrupo TAp - Terapia Fotodinâmica com disco pulverizado com AM a 0,01% (Fórmula e Ação Farmácia, São Paulo SP Brasil) associado ao laser vermelho de comprimento de onda de 660 nm, AlGaInP (Laser Therapy EC[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) por 90s (9J) previamente a formação do biofilme (n=9);

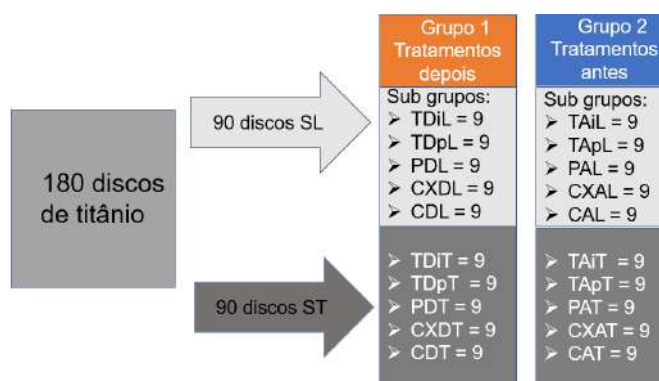
- Subgrupo TAI - Terapia Fotodinâmica com imersão do disco em AM a 0,01% (Fórmula e Ação Farmácia, São Paulo SP Brasil) associado ao laser vermelho de comprimento de onda de 660 nm, AlGaInP (Laser Therapy EC[®], DMC, São Carlos, SP, Brasil) por 90s (9J) previamente a formação do biofilme (n=9);

- Subgrupo PA - plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (Plasma de gás Hélio / Protótipo UNESP SJC – Lima et al, 2021) previamente a formação do biofilme (n=9);

- Subgrupo CXA - Clorexidina a 0,12% (Periogard[®], Colgate-Palmolive industrial LTDA, São Bernardo do Campo, São Paulo Brasil) previamente a formação do biofilme (n=9);

- Subgrupo CA- Controle (sem nenhum tipo de tratamento) previamente a formação do biofilme (n=9).

Figura 1- Desenho do estudo dos tratamentos antimicrobianos avaliados



4.2. Tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio

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

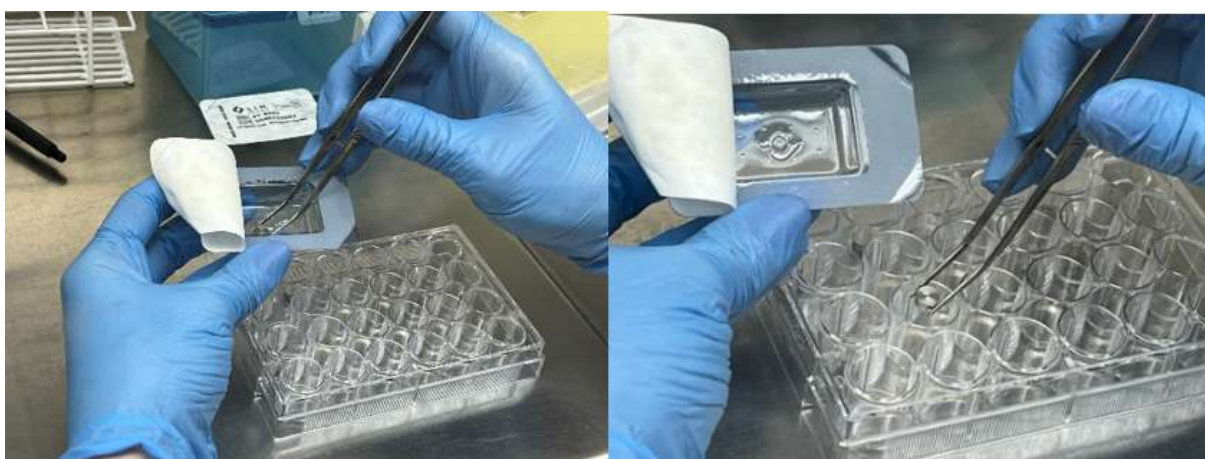
Para a formação do biofilme *S. gordonii*, foi utilizado a cepa padrão ATCC 10558 em placa de ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas.

Após a incubação as células foram coletadas da placa com uma alça estéril e depositadas em um tubo de Falcon contendo soro fisiológico estéril, para o preparo do inóculo de 10⁷ cel/ml. Após a dispersão das células com o auxílio do vórtex, 1 ml dessa solução foi pipetada e depositada numa cubeta para realizar-se a espectrofotometria, visando atingir a absorvância de $\lambda = 600$ nm e densidade óptica (DO) = 0,52 ± 0,02.

Atingida a absorvância ideal, 1 (uma) parte deste inóculo de *S. gordonii* 1x10⁷ cel/ml foi diluída em 9 (nove) partes de caldo BHI para a formação do inóculo de a 1x10⁶ cel/ml.

Os discos de titânio de SL e ST foram retirados de suas embalagens estéreis com o auxílio de uma pinça clínica (SSWithe Duflex São Cristóvão, Rio de Janeiro, Brasil) também estéril e depositados nos poços das placas estéreis de 24 poços, e divididos de acordo com os respectivos grupos testados (figura 2).

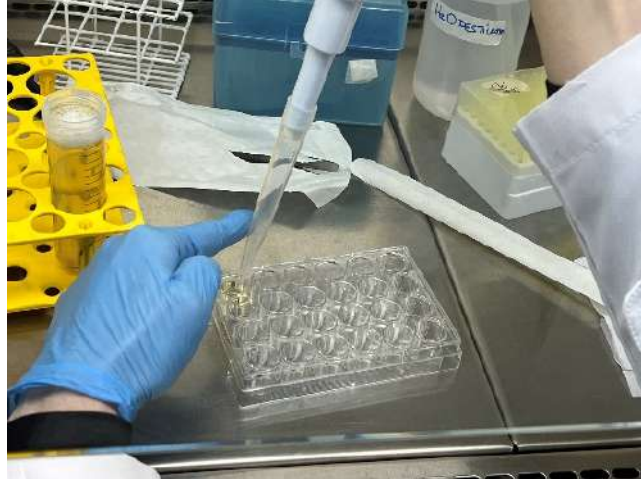
Figura 2- Disco de titânio sendo retirado da embalagem estéril e colocado no poço



Fonte: Bassoukou, (2023)⁴⁵.

Sobre cada disco foi depositado 2 ml de inóculo de *S. gordonii* a 10^6 cél/ml por poço (figura 3).

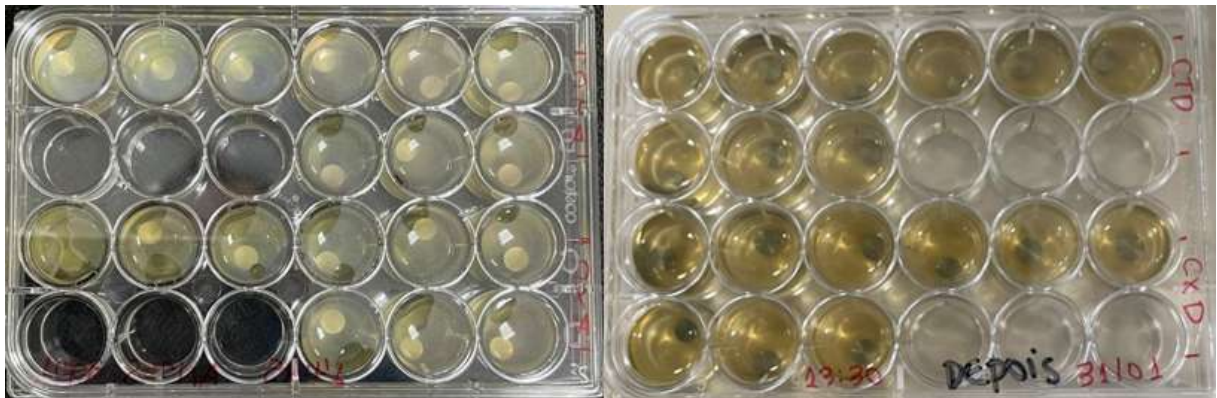
Figura 3- Dois ml de inóculo de *S. gordonii* a 10^6 cél/ml sendo depositado sobre o disco



Fonte: Bassoukou, (2023)⁴⁵

As placas foram então incubadas por 24hs a 37°C e 5% CO₂ para a formação do biofilme (figura 4).

Figura 4- Discos de SL e ST com biofilme formado



Fonte: O autor

4.2.2. Tratamento antimicrobiano sobre biofilme formado nos discos de titânio

Os discos de titânio SL e ST com biofilme formado foram retirados do meio BHI com pinça estéril, exatamente na mesma posição em que se encontravam nos poços. Cada disco, um a um, foi lavado com 2 ml de soro fisiológico estéril, a fim de remover células planctônicas, antes de serem submetidos aos tratamentos antimicrobianos que serão descritos a seguir:

- Terapia fotodinâmica com disco pulverizado (spray) com AM a 0,01% Depois (TDp).

Os discos de titânio de SL e ST com biofilme formado foram lavados com 2 ml de soro fisiológico e transferidos para um poço vazio de placa de 24 poços, foi pulverizado o AM 0,01% sobre a superfície do disco com biofilme. O produto foi mantido por 5 minutos contado com a ajuda de um cronômetro. Após este período, os discos foram suspensos com a pinça e posicionado em uma placa de Petri na mesma posição que estavam para aplicação do laser. O aparelho de laser vermelho foi instalado em um dispositivo desenvolvido pelo autor para padronização da distância do laser até a superfície do disco de titânio (Figura 5), de modo que sua ponteira ficasse posicionada a 1 mm da superfície do disco. Foi aplicado 9 J de laser vermelho sobre os discos, totalizando 90 segundos de aplicação (segundo recomendação do fabricante). Os discos foram lavados com 1 ml de soro para remoção do excesso do produto. Em seguida os discos eram transferidos para um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico para a próxima etapa.

- Terapia Fotodinâmica com imersão do disco em AM a 0,01% Depois (TDi).

Os discos de titânio de SL e ST com biofilme formado foram lavados com 2 ml de soro fisiológico e transferidos para um poço de uma placa de 24 poços contendo 1 ml de AM a 0,01% com as luzes da câmara de fluxo laminar desligadas. Os discos foram mantidos imersos no produto por 5 minutos contados com cronômetro, então os discos foram suspensos com a pinça e posicionados em uma placa de Petri estéril e receberam o tratamento com laser da mesma maneira que no experimento anterior, em seguida, os discos foram lavados com 1 ml de soro e transferidos para um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico para a próxima etapa.

Figura 5 – Laser sendo aplicado com auxílio do dispositivo de suporte

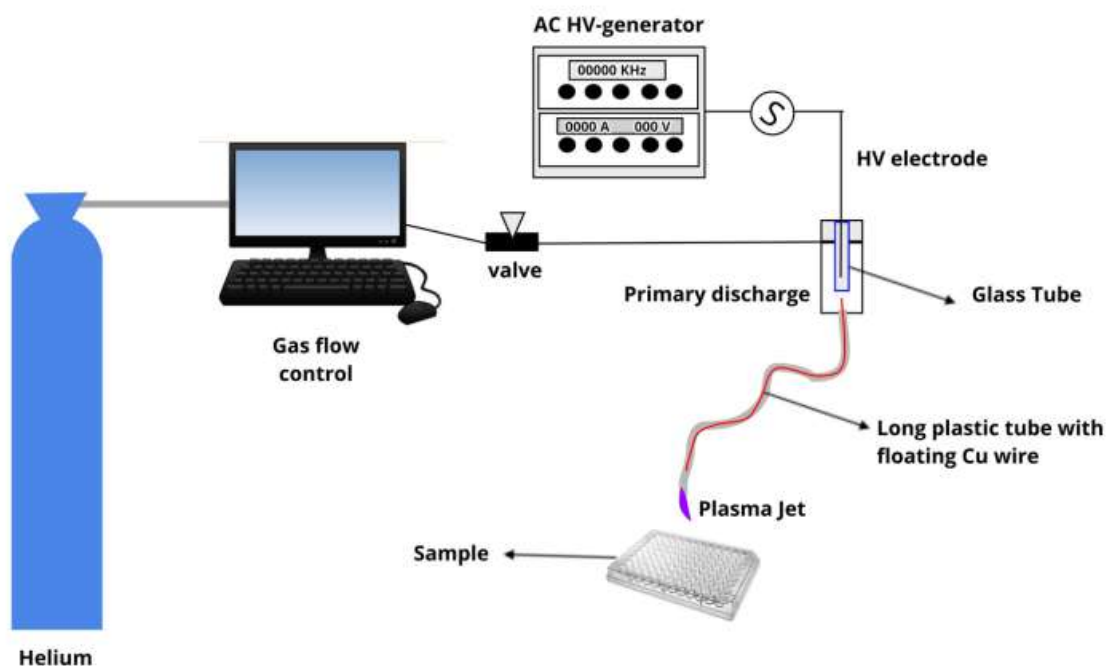


Fonte: O autor

- Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois (PD)

Este experimento foi realizado por protótipo instalado no Laboratório Genoma da UNESP em São Jose dos Campos SP, cuja configuração experimental utilizada neste estudo foi descrita anteriormente por Lima et al., 2021²³ (figura 6).

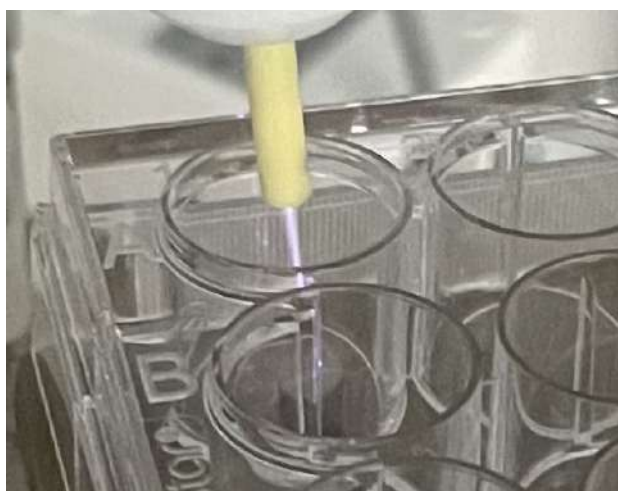
Figura 6 - Configuração do P utilizado no estudo



Fonte: Lima et al. (2021)²³

Os discos com o biofilme formada foram retirados do meio com o auxílio de uma pinça clínica na mesma posição que se encontravam, foram lavados com 2 ml de soro fisiológico para remoção de células planctônicas e depositados no poço de uma nova placa estéril de 24 poços para realização da aplicação do P (figura 7).

Figura7 - Aplicação do P



Fonte: O autor

O plasma foi aplicado no centro de cada disco a uma distância de 15 mm, por 5 minutos, conforme metodologia descrita por Lima et al, 2021.⁶ A potência média de descarga calculada nestas condições foi de 0,6 W.

Após 5 minutos de tratamento, os discos foram suspensos com a pinça e lavados com 1 ml de soro fisiológico estéril na face que recebeu o tratamento a fim de padronização. Então cada disco foi inserido em um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico estéril.

- Clorexidina a 0,12% Depois (CXD)

Após ser removido da placa e lavado com 2 ml de soro fisiológico, em seguida, cada disco foi depositado em um poço de uma placa de 24 poços contendo 1 ml de digluconato de clorexidina a 0,12% de modo que ficasse totalmente submerso, foi padronizado 1 ml, pois este é o volume necessário para cobrir totalmente o disco (figura 7). Individualmente cada disco permaneceu submerso pelo tempo de 5 minutos, contado com o auxílio de um cronômetro. Optou-se por padronizar a aplicação da CX e do Azul de Metileno em 5 minutos, uma vez que o azul de metileno permanecia agindo 5 minutos por recomendação do fabricante e a aplicação do P

permanecia por 5 minutos em conformidade com o trabalho de Lima et al, 2021²³. Após 5 minutos, os discos foram lavados com 1 ml de soro fisiológico e então transferidos para um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico para a próxima etapa.

- Controle Depois (CD)

Os discos de titânio de SL e ST com biofilme formado foram lavados com 2 ml de soro e transferidos para uma placa de 24 poços contendo 1 ml de soro fisiológico. O disco permaneceu submerso por 5 minutos contado com cronômetro. Após 5 minutos, os discos foram lavados com 1 ml de soro fisiológico. Os discos foram depositados em um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico para a próxima etapa.

Para todos os experimentos descritos acima, os micros tubos contendo os discos passaram pelo vórtex por 30 segundos para desagregação do biofilme. Em seguida foi realizada a diluição seriada do micro tubo contendo o corpo de prova da seguinte forma: 100 microlitros foram pipetados do micro tubo contendo o corpo de prova para outro micro tubo 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 micro tubo com mais 900 microlitros de soro estéril. E assim sucessivamente até atingir 4 diluições (-1, -2, -3, -4) figura 8.

Figura 8 – Diluição seriada



Fonte: Bassoukou, (2023)⁴⁵

Dez microlitros foram pipetados dos microtubos com as diluições -2, -3 e -4, e gotejados na placa com meio BHI (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 9).

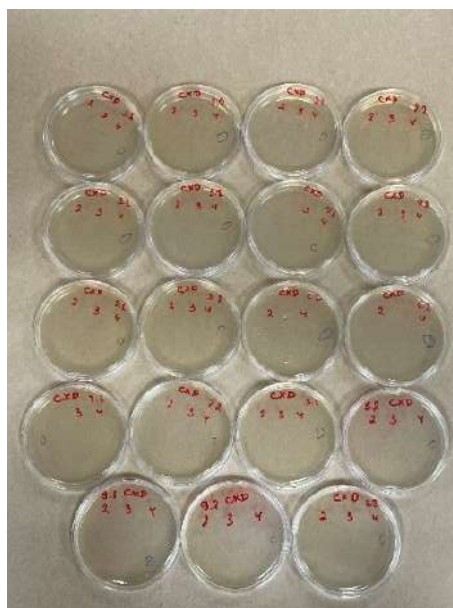
Figura 9 – placas sendo incubadas



Fonte: O autor

Após 24 horas foi realizada a contagem das UFC/ml em cada placa (figura 10), utilizando-se lupa e retro iluminação. Os dados foram inseridos numa planilha para posterior análise estatística.

Figura 10 - Placas prontas para contagem de UFC/ml



Fonte: O autor

4.3. Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme

Os discos de titânio de SL e ST foram retirados da embalagem estéreis e foram lavados com 2 ml de soro fisiológico estéril antes de receberem os tratamentos propostos.

- Terapia Fotodinâmica com disco pulverizado com AM a 0,01% Antes (TAp)

Após serem lavados, cada disco de titânio de SL e ST foi transferido para um poço de uma nova placa de 24 poços onde foi pulverizado o AM 0,01% (Fórmula e Ação Farmácia, São Paulo SP Brasil) sobre a superfície do disco. O produto foi mantido por 5 minutos contados com cronômetro. Após 5 minutos, os discos foram suspensos com a pinça e posicionados em uma placa de Petri estéril para aplicação do laser, como descrito anteriormente. Foi aplicado 9 J de laser vermelho sobre os discos, totalizando 90 segundos de aplicação, também segundo recomendação do fabricante. Os discos foram então lavados com 1 ml de soro fisiológico e transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 2 ml do inóculo na concentração de 10^6 células/ml de *S. gordonii* para que o biofilme fosse formado. Os discos foram incubados a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois do biofilme formado, cada disco foi removido da placa, lavado com 2 ml de soro e depositado no micro tubo contendo 1 ml de soro para diluição seriada e contagem de UFC/ml.

- Terapia Fotodinâmica com imersão do disco em AM a 0,01% Antes (TAi)

Após serem lavados, cada disco de titânio de SL e ST foi transferido para uma placa de 24 poços e submersos em 1 ml de AM 0,01% com as luzes da câmara de fluxo laminar desligadas. O produto foi mantido por 5 minutos contado com cronômetro. Em seguida, os discos foram suspensos com a pinça e posicionados em uma nova placa de Petri para aplicação do laser, como descrito anteriormente. Em seguida, os discos foram lavados com 1 ml de soro fisiológico e transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 2 ml do inóculo na concentração de 10^6 células/ml de *S. gordonii* para que o biofilme fosse formado. Os discos foram encubados a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois do biofilme formado, cada disco foi removido da placa, lavado com 2 ml de soro para remoção de células planctônicas e depositado no micro tubo contendo 1 ml de soro para diluição seriada e contagem de UFC/ml.

- Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica Antes (PA)

Após serem lavados, cada disco de titânio de SL e ST foi transferido para uma placa de 24 poços e receberam o tratamento com P da mesma maneira descrita anteriormente. Depois do tratamento cada disco foi depositado em um poço de uma placa de 24 poços contendo 2 ml de inóculo de *S. gordonii* a 1×10^6 cél/ml por poço e encubados por 24hs a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, os discos foram retirados com a pinça na mesma posição que estavam na placa e lavados com 2 ml de soro fisiológico para remoção de células planctônica. Feito isso cada disco foi inserido em um micro tubo contendo 1 ml de soro fisiológico estéril para a realização da diluição seriada e contagem de UFC/ml.

- Clorexidina Antes (CXA)

Após receber o jato de soro, cada disco de titânio de SL e ST foi transferido para uma placa de 24 poços e submersos em 1 ml de digluconato de clorexidina a 0,12%, com o auxílio de um cronômetro o produto permaneceu agindo por 5 minutos. Depois cada disco foi lavado com 1 ml de soro fisiológico. Os discos foram então transferido para uma nova placa de 24 poços contendo 2 ml do inóculo na concentração de 10^6 células/ml de *S. gordonii* para que o biofilme fosse formado. Os discos foram levados a estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois do biofilme formado, cada disco foi removido da placa, lavado com 2 ml de soro e depositado no micro tubo contendo 1 ml de soro para diluição seriada e contagem de UFC/ml.

- Controle Antes (CA)

Após serem lavados, cada disco de titânio de SL e ST foi transferido para uma placa de 24 poços e submerso em 1 ml de soro fisiológico. O soro foi mantido por 5 minutos contado com cronômetro. Após 5 minutos os discos foram lavados com 1 ml de soro e então transferido para nova placa contendo 2 ml do inóculo na concentração de 10^6 células/ml de *S. gordonii* para que o biofilme fosse formado. Os discos foram encubados a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois do biofilme formado, cada disco foi removido da placa, lavado com 2 ml de soro e depositado no micro tubo contendo 1 ml de soro para diluição seriada e contagem de UFC/ml.

Para a contagem das UFC/ml em cada placa, foi utilizada uma lupa com retro iluminação. Os dados foram inseridos numa planilha para posterior análise estatística.

4.4. Análise qualitativa da SL e ST dos discos de titânio após os tratamentos e análise da superfície do biofilme formado sobre os discos após os tratamentos

Para análise qualitativa foi utilizado o aparelho microscopia eletrônica de varredura Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV Quanta 250 (FEI, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As imagens foram capturadas por uma câmera óptica Nav-Cam 250 montada na porta da câmera do MEV (Zaragoza, Espanha), nas dependências do laboratório Instituto do Mar (IeMar-UNESP) em São José dos Campos SP (Figura 11).

Figura 11 – Aparelho MEV

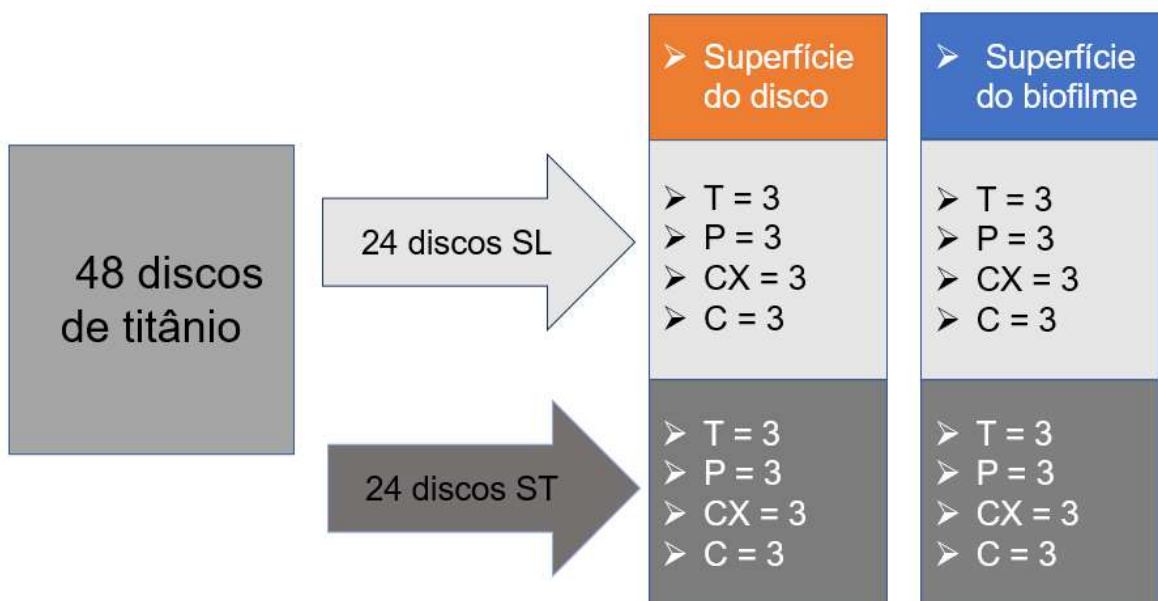


Fonte: O autor.

Foram utilizados 48 discos de titânio sendo 24 discos de SL e 24 discos de ST, os quais serão descritos a seguir (Figura 12).

Para análise qualitativa dos discos de titânio submetidos aos tratamentos antimicrobianos (T, P, CX), sem o biofilme, foram utilizados 12 discos de SL e 12 discos de ST. Para análise do biofilme formado sobre os discos, que foram submetidos aos tratamentos antimicrobianos (T, P, CX), foram utilizados 12 discos de SL e 12 discos de ST, como pode ser observado na figura 12.

Figura 12 – Desenho do estudo de M.E.V



Fonte: O autor

4.4.1 Análise qualitativa do biofilme formado sobre os discos de titânio de SL e ST após os tratamentos antimicrobianos

Os 24 discos estéreis de titânio (12 de SL e 12 de ST) foram separados 3 discos para cada tratamento e receberam os tratamentos segundo a mesma metodologia aplicada no item 4.2. Os corpos de prova foram depositados em uma placa de 24 poços e incubados a 27° C e 5% CO₂ por 24 horas para formação do biofilme. Em seguida os discos foram retirados da placa na mesma posição, foram lavados com um jato delicado de 1 ml de soro e submetidos aos tratamentos propostos. Na sequência os discos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% por 24 horas, após a fixação os discos foram lavados 2 vezes com solução de tampão de sódio (PBS – 0,1 M) por 15 minutos e desidratado usando uma série ascendente de etanol 30%, 50%,70%,80%,90% e 100% durante 15 minutos cada concentração, para a concentração de 100% o processo foi repetido duas vezes. As amostras foram secas em estufa a 37°C por 4 horas e metalizados com ouro e analisados em um aparelho de MEV e fotografadas.

4.4.2 Análise qualitativa dos discos de titânio de SL e ST após os tratamentos antimicrobianos, sem o biofilme

Utilizou-se 24 discos estéreis de titânio, 12 de SL e 12 de ST. Os discos foram submetidos aos tratamentos antimicrobianos avaliados (n=3 para cada grupo). Os discos de titânio receberam os tratamentos segundo a mesma metodologia aplicada no item 4.3. Na sequência as amostras foram secas em estufa a 37°C por 4 horas e analisadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4 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%.

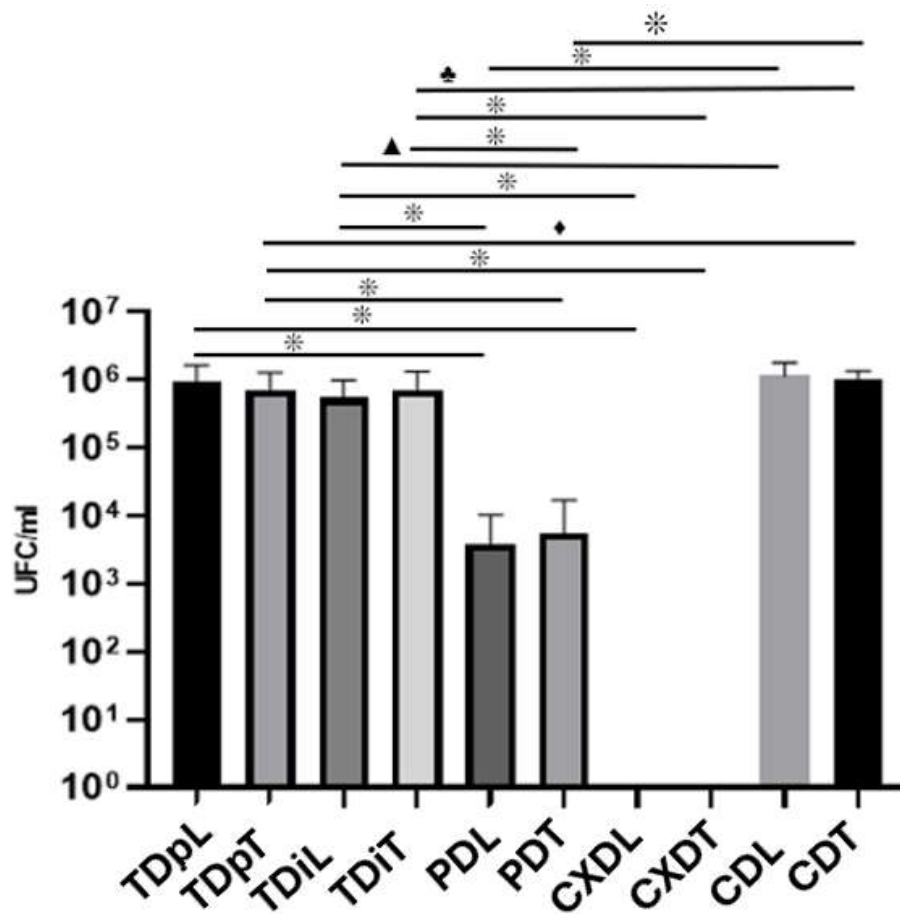
5 Resultados

6.1 Tratamento antimicrobiano sobre biofilme de *S. gordonii* formado nos discos de titânio.

O gráfico 1 mostra que o tratamento com P sobre biofilme formado nos discos de titânio de SL (grupo PDL) e ST (grupo PDT) resultou em um menor número de UFC/ml em relação aos outros tratamentos (subgrupos TDpL, TDpT, TDiL, TDiT, CDL e CDT) com diferença estatística $p < 0,0001$, exceto para os subgrupos CXDL e CXDT, onde não houve crescimento bacteriano em nenhuma das superfícies $p < 0,0001$.

Quando analisado os resultados obtidos com T, para esse experimento não houve diferença estatística entre os subgrupos quanto a forma de aplicação do AM a 1% (pulverizado ou imersão). Quando pulverizado, somente o subgrupo de superfície tratada TDpT obteve menor número de UFC/ml comparado ao subgrupo controle CDT ($p = 0,0294$). Já na aplicação por imersão, os resultados foram melhores que o controle em ambas as superfícies TDiL x CDL ($p = 0,0116$) e TDiT x CDT ($p = 0,0149$).

Gráfico 1 - Tratamento antimicrobiano sobre biofilme de *S. gordonii* formado nos discos de titânio (tratamento depois)

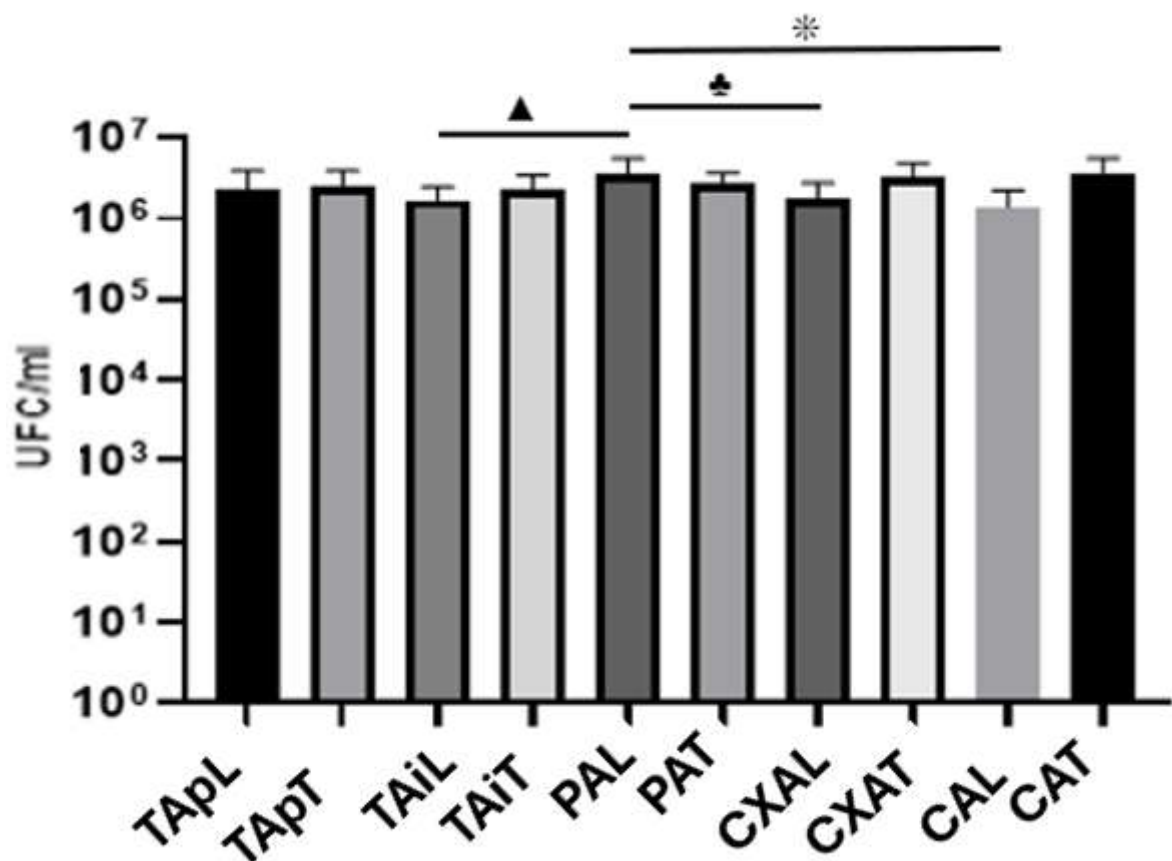


TDpL (Terapia fotodinâmica depois pulverizado lisa); TDpT (Terapia fotodinâmica depois pulverizado tratada); TDiL (Terapia fotodinâmica depois imersão lisa); TDiT (Terapia fotodinâmica depois imersão tratada); PDL (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois lisa); PDT (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois tratada); CXDL (Clorexidina depois lisa); CXDT (Clorexidina depois tratada); CDL (Controle depois lisa); CDT (Controle depois tratada). Valor de p: * p<0,0001; ▲ p=0,0116; ♣ p=0,0149; ◆ p= 0,0294.

6.2 Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme

Para o tratamento antes da formação do biofilme, o gráfico 2 mostra que o subgrupo PAL apresentou uma maior contagem de UFC/ml com diferenças estatísticas significativa em relação aos subgrupos TAI_L ($p=0,0188$), CXAL ($p=0,0377$) e CAL ($p=0,0013$).

Gráfico 2 - Tratamento antimicrobiano prévio sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme (tratamento antes)

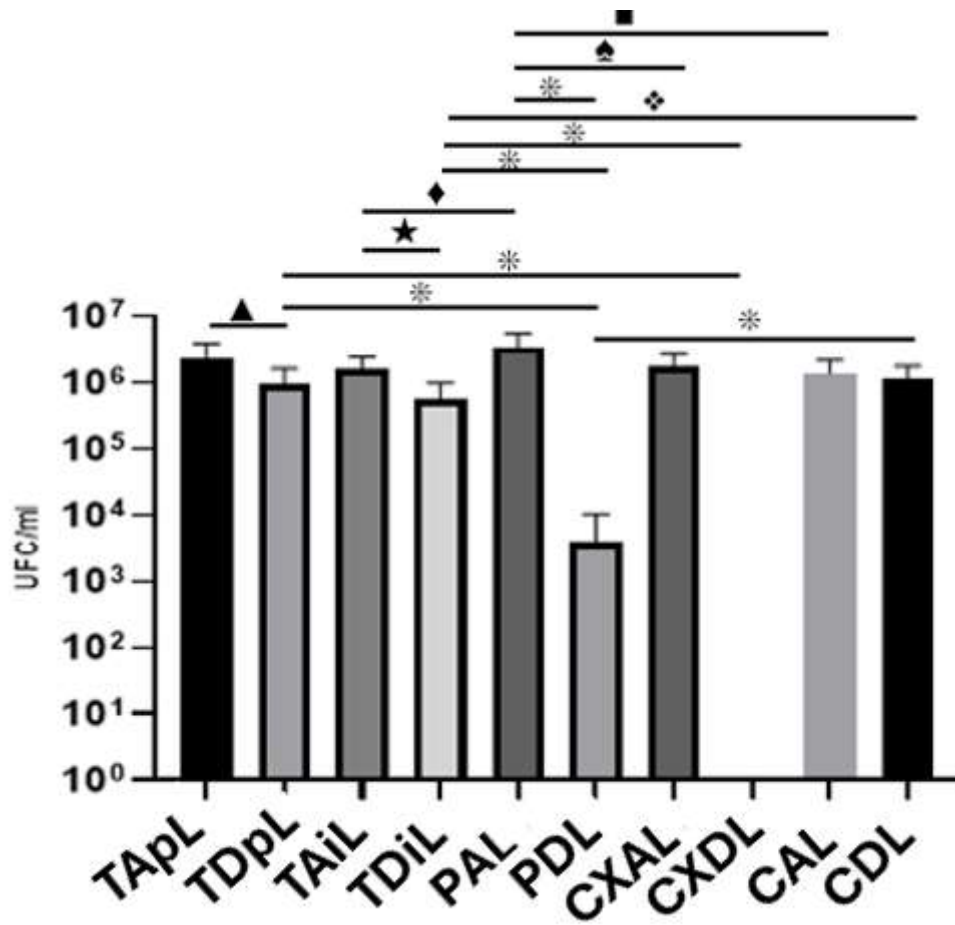


TAPL (Terapia fotodinâmica antes pulverizado lisa); TAP_T (Terapia fotodinâmica antes pulverizado tratada); TAI_L (Terapia fotodinâmica antes imersão lisa); TAI_T (Terapia fotodinâmica antes imersão tratada); PAL (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois lisa); PAT (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica antes tratada); CXAL (Clorexidina antes lisa); CXAT (Clorexidina antes tratada); CAL (Controle antes lisa); CAT (Controle antes tratada). Valor de p: * $p=0,013$; ▲ $p=0,0188$; ♣ $p=0,0377$.

6.3 Superfície lisa

O gráfico 3 mostra os resultados dos discos de titânio de superfície lisa, tanto tratamento prévio quanto sobre o biofilme, quando submetidos aos tratamentos antimicrobianos. Podemos notar que o subgrupo PDL apresentou a menor contagem de UFC/ml quando comparados a todos os outros subgrupos analisados, exceto o subgrupo CXDL, com diferença estatística para os subgrupos TDpL, TDiL e CDL ($p < 0,0001$). Contudo, o subgrupo PAL apresentou a maior contagem de UFC/ml em comparação ao subgrupo PDL com diferença estatística ($p < 0,0001$). Houve também diferenças estatísticas significativa entre o subgrupo PAL e os subgrupos TAIiL ($p = 0,0188$), CXAL ($p = 0,0377$) e CAL ($p = 0,013$). Podemos ver também que os resultados obtidos com a T na SL no tratamento depois foram superiores aos obtidos no tratamento antes para as duas formas de uso do AM a 1% TDpL x TApL ($p = 0,0076$) e TDiL x TDAiL ($p = 0,0002$). Dentre os subgrupos da T somente o subgrupo TDiL teve melhor resultado quando comparado ao subgrupo CDL ($p = 0,0116$).

Gráfico 3 – Tratamento antimicrobiano em superfície lisa



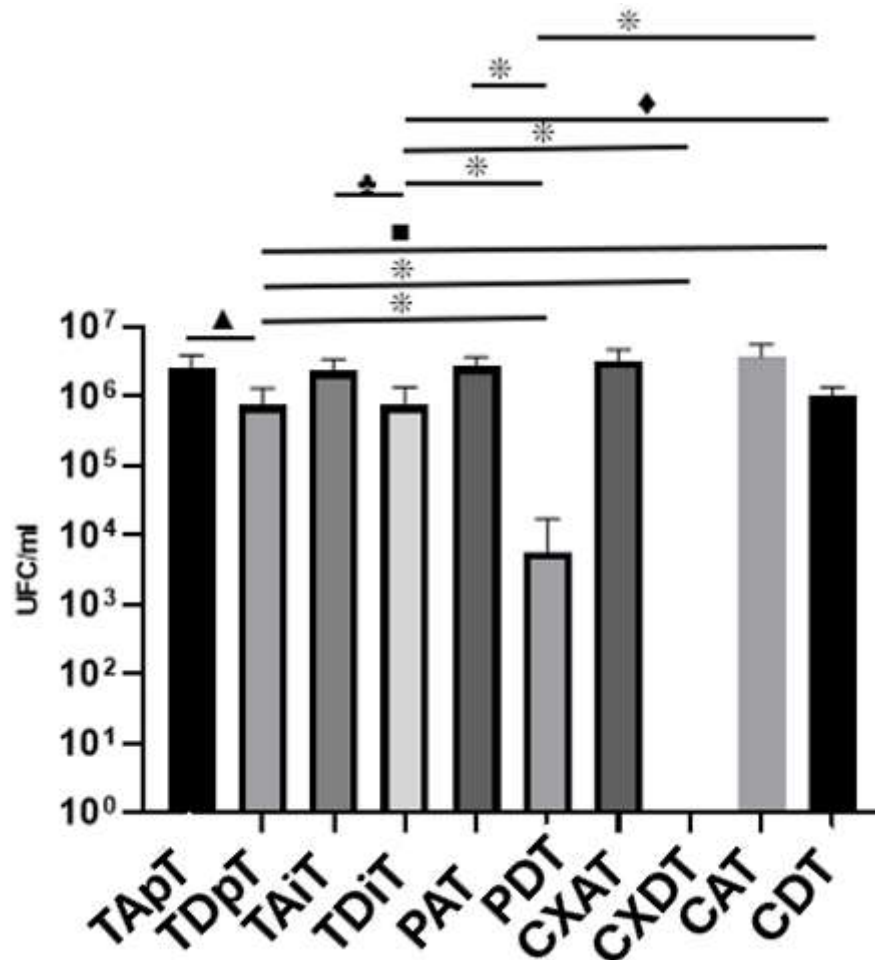
TApL (Terapia fotodinâmica antes pulverizado lisa); TDpL (Terapia fotodinâmica depois pulverizado lisa); TAIiL (Terapia fotodinâmica antes imersão lisa); TDIiL (Terapia fotodinâmica depois imersão lisa); PAL (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica antes lisa); PDL (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois lisa); CXAL (Clorexidina antes lisa); CXDL (Clorexidina depois lisa); CAL (Controle antes lisa); CDL (Controle depois lisa). Valor de p: * p<0,0001; ★ p=0,0002; ▲ p=0,0076; ◆ p=0,0116; ■ p=0,013; ◆ p= 0,0188; ♠ p=0,037

6.4 Superfície tratada

O gráfico 4 mostra os resultados dos discos de titânio de superfície tratada, tanto tratamento prévio quanto sobre o biofilme, quando submetidos aos tratamentos antimicrobianos. Semelhante à SL, na ST o subgrupo PDT obteve menor número de UFC/ml com diferença estatística significativa quando comparado aos outros subgrupos testados (TDpT, TDiT e CDT - $p < 0,0001$), sendo superado apenas pelo subgrupo CXDT onde não houve crescimento bacteriano.

Quando comparado os resultados do tratamento prévio com T na ST na formação do biofilme não houve diferença estatística entre os subgrupos que utilizaram o agente fotossensibilizante na versão pulverizada TApT comparado ao subgrupo onde foi usado o agente fotossensibilizante por imersão TAI_T, houve também um resultado semelhante quando comparamos os resultados da T na ST sobre o biofilme formado TDpT x TDiT. Contudo, quando comparamos a TF com AM pulverizado antes e depois tivemos um maior crescimento bacteriano no grupo antes TApT em relação ao subgrupo depois TDpT ($p = 0,0004$). O mesmo aconteceu na comparação da T com os discos imersos em AM, também houve maior contagem de UFC/ml com o tratamento antes TAI_T em relação ao subgrupo depois TDiT ($p = 0,0099$). Também houve menor contagem de UFC/ml nos subgrupos que utilizaram a T sobre o biofilme formado tanto na versão pulverizada quanto por imersão em relação ao grupo controle depois, (CDT x TDpT - $p = 0,0294$ e CDT x TDiT - $p = 0,0149$).

Gráfico 4 - Tratamento antimicrobiano em superfície tratada



TApT (Terapia fotodinâmica antes pulverizada tratada); TDpT (Terapia fotodinâmica depois pulverizada tratada); TAIiT (Terapia fotodinâmica antes imersão tratada); TDiIT (Terapia fotodinâmica depois imersão tratada); PAT (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica antes tratada); PDT (Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica depois tratada); CXAT (Clorexidina antes tratada); CXDT (Clorexidina depois tratada); CAT (Controle antes tratada); CDT (Controle depois tratada) Valor de p: * p<0,0001; ▲ p=0,0004; ♣ p=0,0099; ◆ p= 0,0149; ■ p=0,0294

6.5 Análise qualitativa dos discos de titânio e do biofilme de *S. gordonii* após os tratamentos antimicrobianos

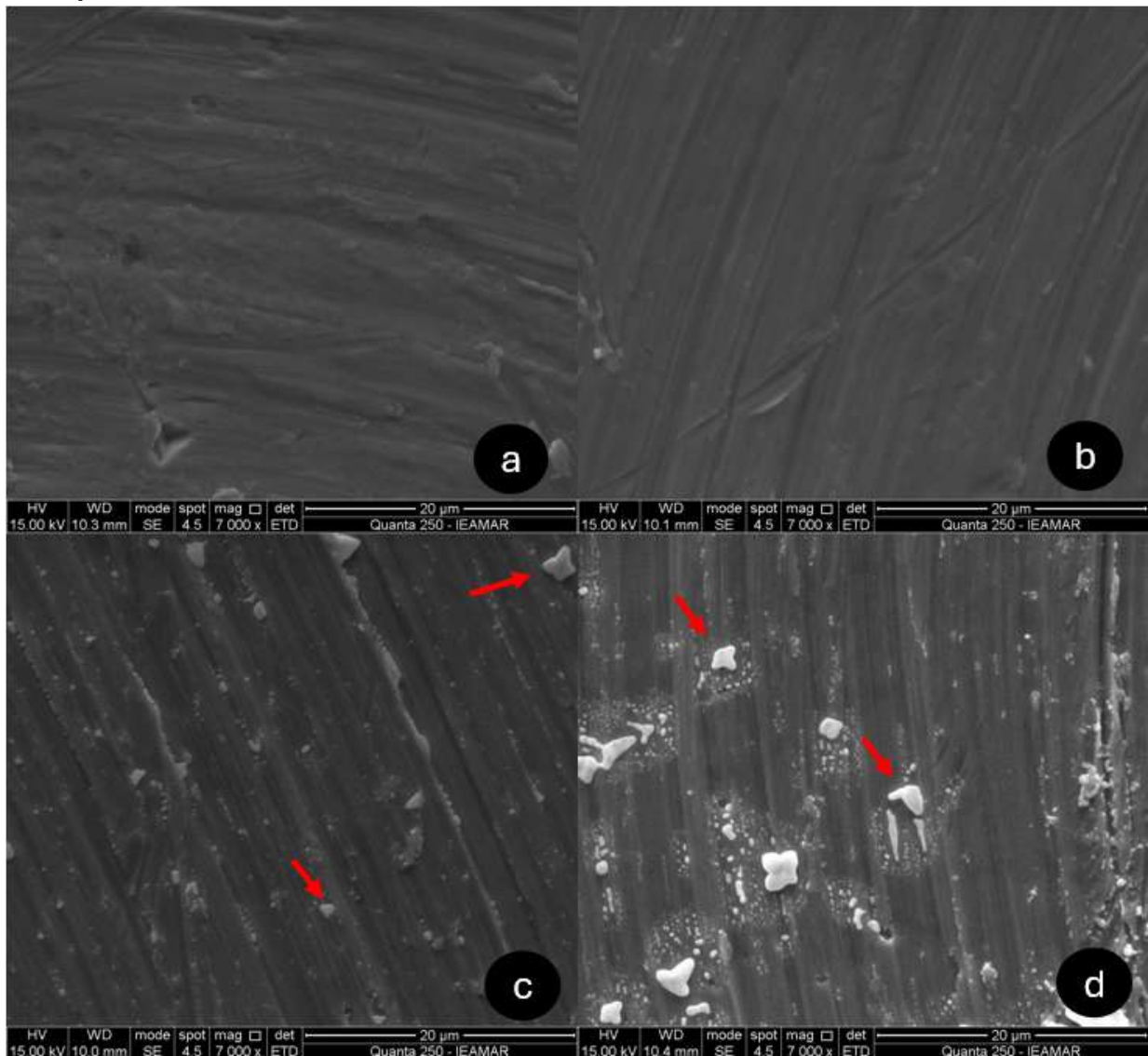
Os tratamentos com P, T, CX e CT sobre os discos de titânio e as alterações que os tratamentos com P, T, CX e CT produziram sobre o biofilme de *S. gordonii* nos discos de titânio foram registradas com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

6.5.1 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre a SL dos discos de titânio

As imagens 13 e 14 obtidas pelo MEV em SL dos discos mostram as características da superfície dos discos após os tratamentos propostos com aumento de 7000 e 20000 vezes respectivamente para os subgrupos: a – Controle (C), b – Clorexidina (CX), c – Terapia fotodinâmica (T) e d – Plasma de baixa temperatura sobre pressão atmosférica (P). As imagens do subgrupo C, figuras 13a e 14a, mostram uma superfície estéril, somente com as imperfeições deixadas pelo processo de torneamento mecânico dos implantes. Estas mesmas características podem ser vistas no grupo CX figuras 13b e 14b.

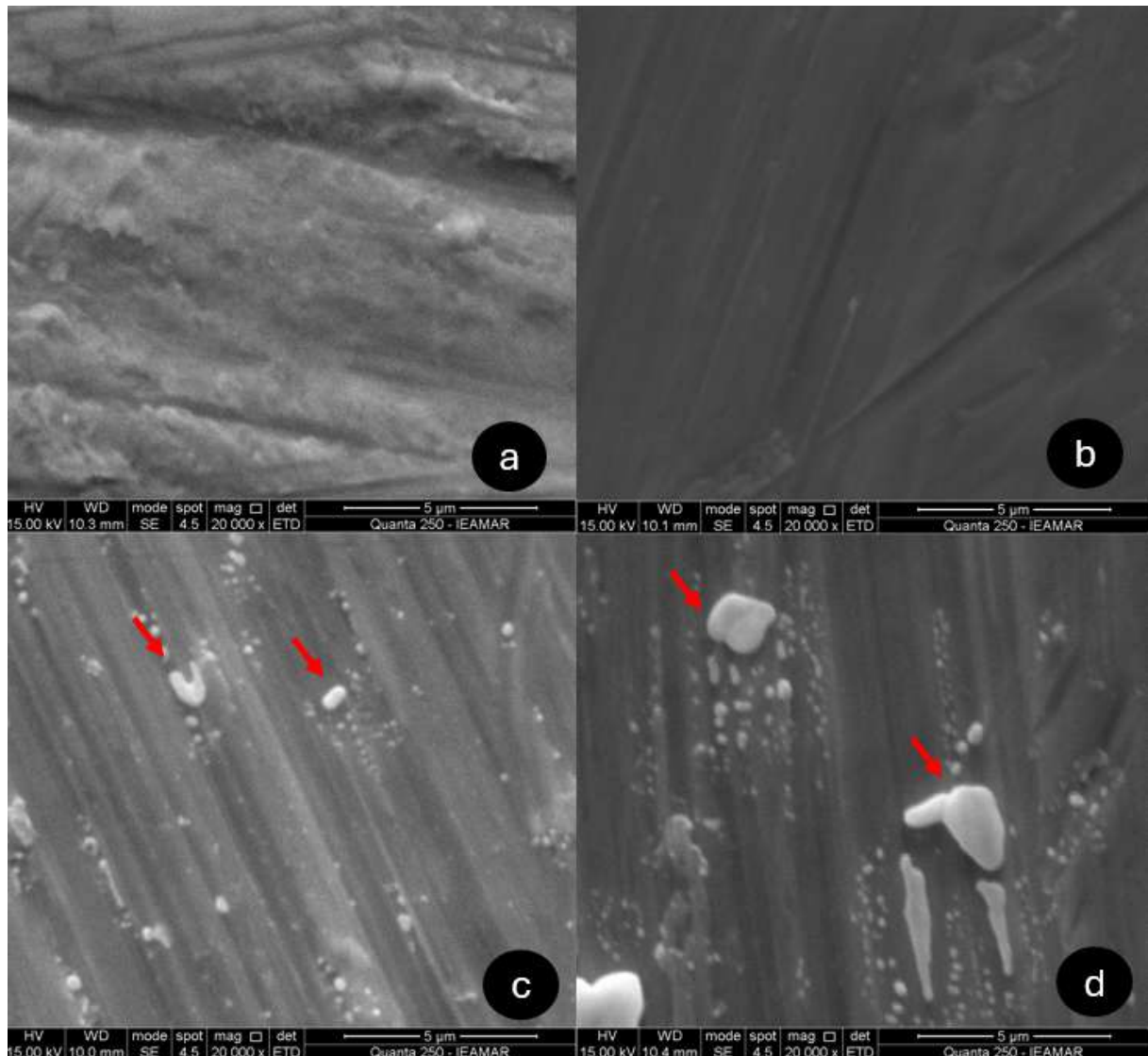
Quando analisamos as imagens dos subgrupos P (figuras 13d e 14d) e T (figura 13c e 14c) podemos visualizar pequenos depósitos na superfície dos discos. As setas vermelhas mostram essas alterações na superfície lisa dos discos de titânio após os tratamentos.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície lisa de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – alterações na superfície dos discos. Aumento de 7000x.



Fonte: O autor

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície lisa de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – alterações na superfície dos discos. Aumento de 20000x



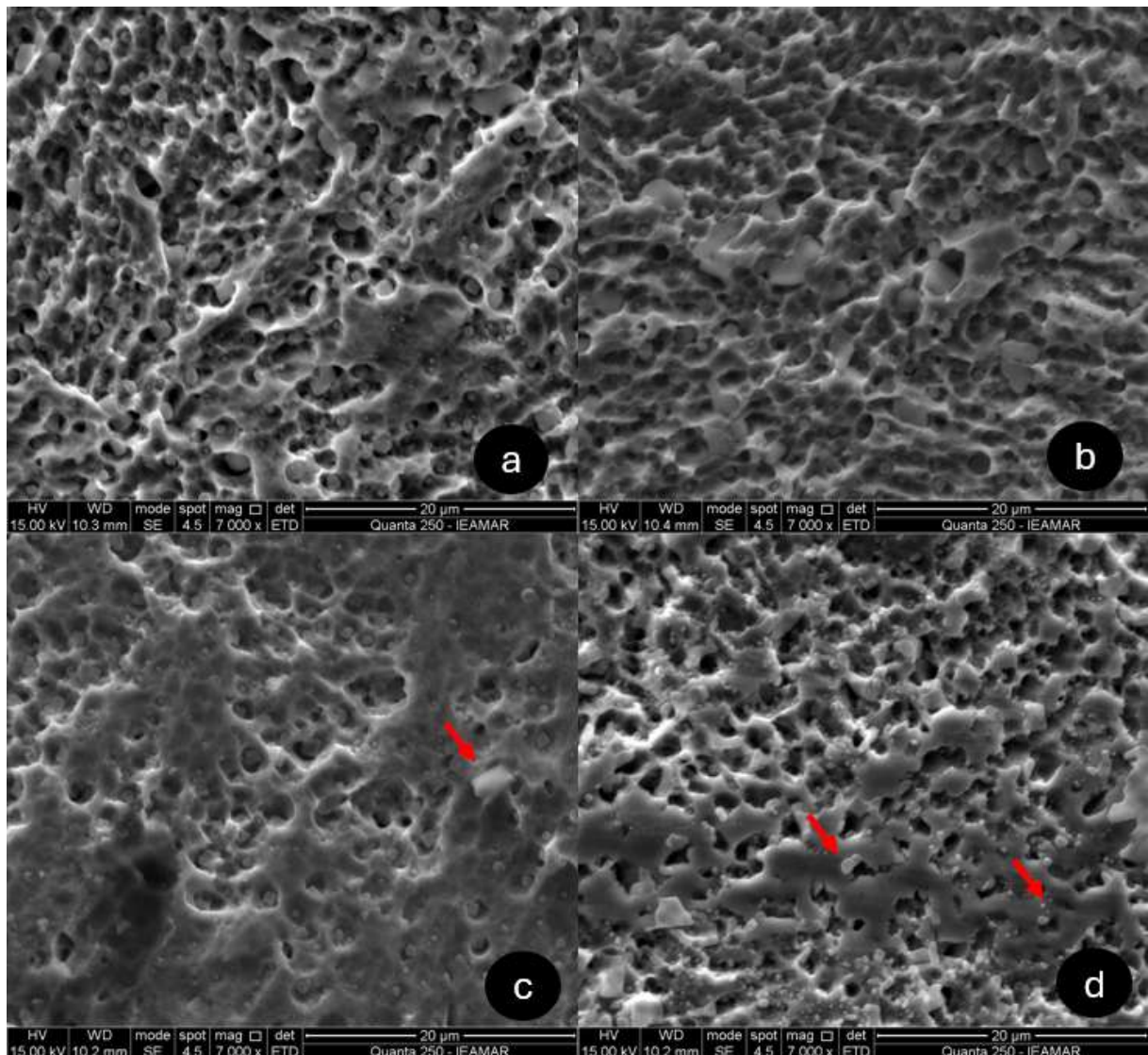
Fonte: O autor

6.5.2 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre a ST dos discos de titânio

As figuras 15 e 16 mostram as características da superfície tratada dos discos de titânio nos aumentos de 7000 e 20000 vezes respectivamente após os tratamentos propostos. O subgrupo C (figura 15a e 16a) e o subgrupo CX (figuras 15b e 16b) mostram crateras e imperfeições características de superfície de titânio modificadas com duplo ataque ácido, portanto sem alterações visíveis ao MEV.

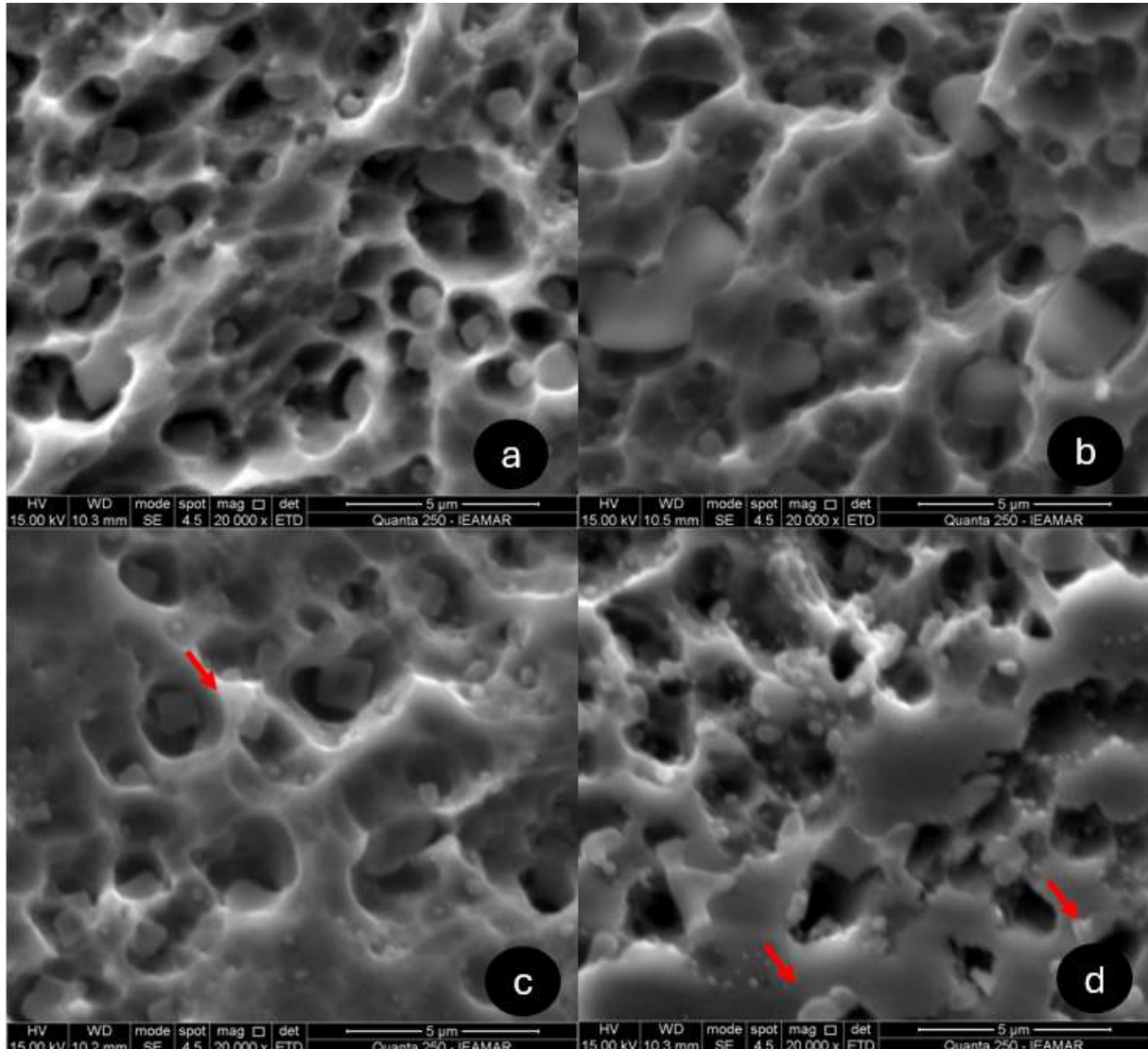
Os subgrupos P (figura 15d, 16d) e T (figura 15c, 16c) também apresentam alterações na ST dos discos de titânio indicadas pelas setas vermelhas. Contudo, estas alterações são mascaradas pelas imperfeições deixadas pelo processo de tratamento.

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície tratada de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – alterações na superfície dos discos. Aumento de 7000x



Fonte: O autor

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura dos pré-tratamentos avaliados sobre superfície tratada de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – alterações na superfície dos discos. Aumento de 20000x



Fonte: O autor

6.5.3 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre o biofilme de *S. gordonii* na SL dos discos de titânio

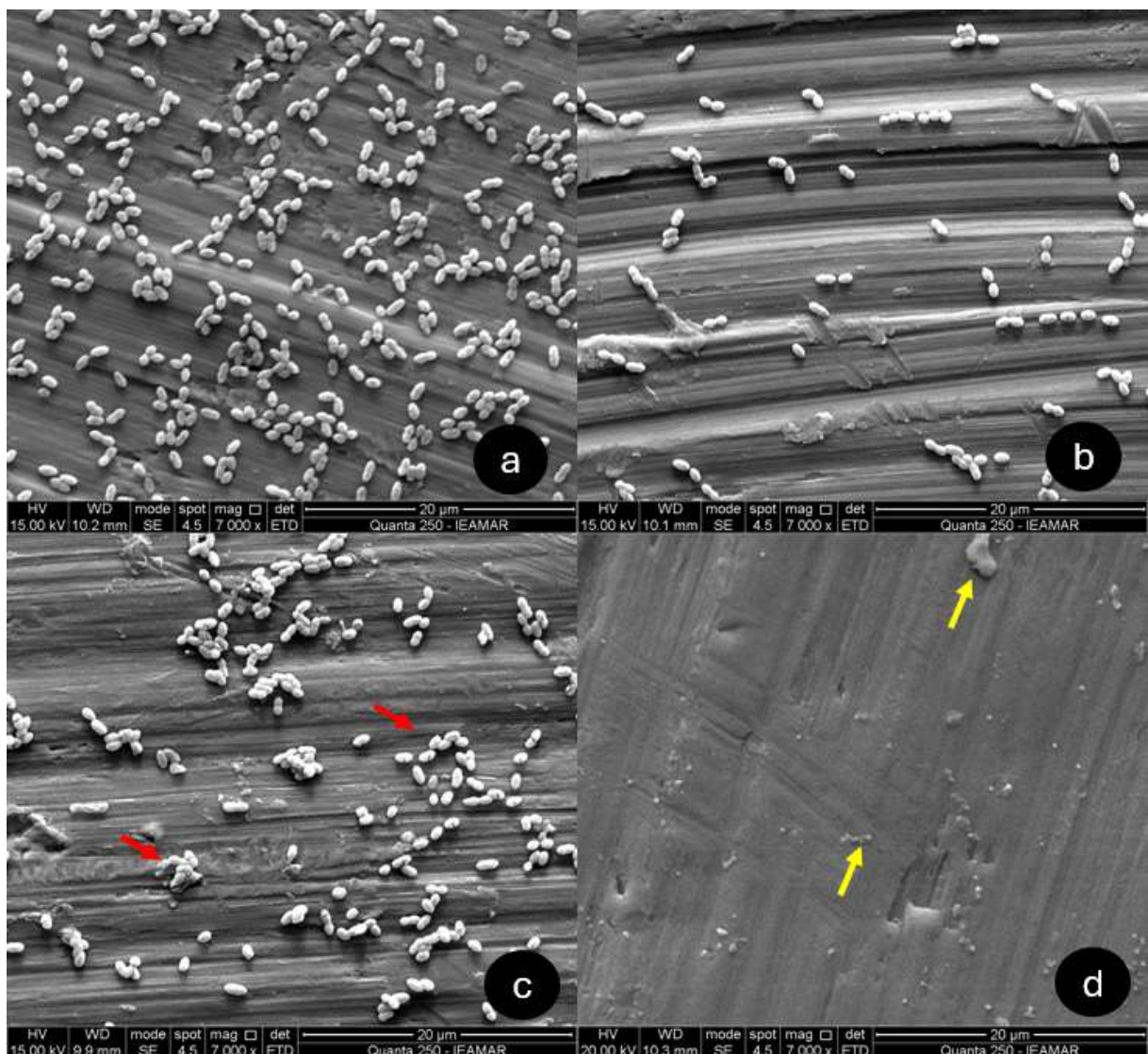
As figuras 17 e 18 mostram o efeito dos tratamentos avaliados sobre o biofilme na SL dos discos nos aumentos de 7000 e 20000 vezes respectivamente. O biofilme formado sobre os discos de SL apresentaram bactérias com morfologia normal aderidas à superfície do titânio em maior quantidade no subgrupo C (figuras 17a e 18a).

O subgrupo T apresentou a segunda maior quantidade de bactérias com morfologia integras (figuras 17c e 18c), contudo, podemos ver entre as células, resíduos amorfos (setas vermelhas).

No subgrupo CX podemos observar uma menor quantidade de bactérias (figuras 17b e 18b) em comparação ao subgrupo C e T.

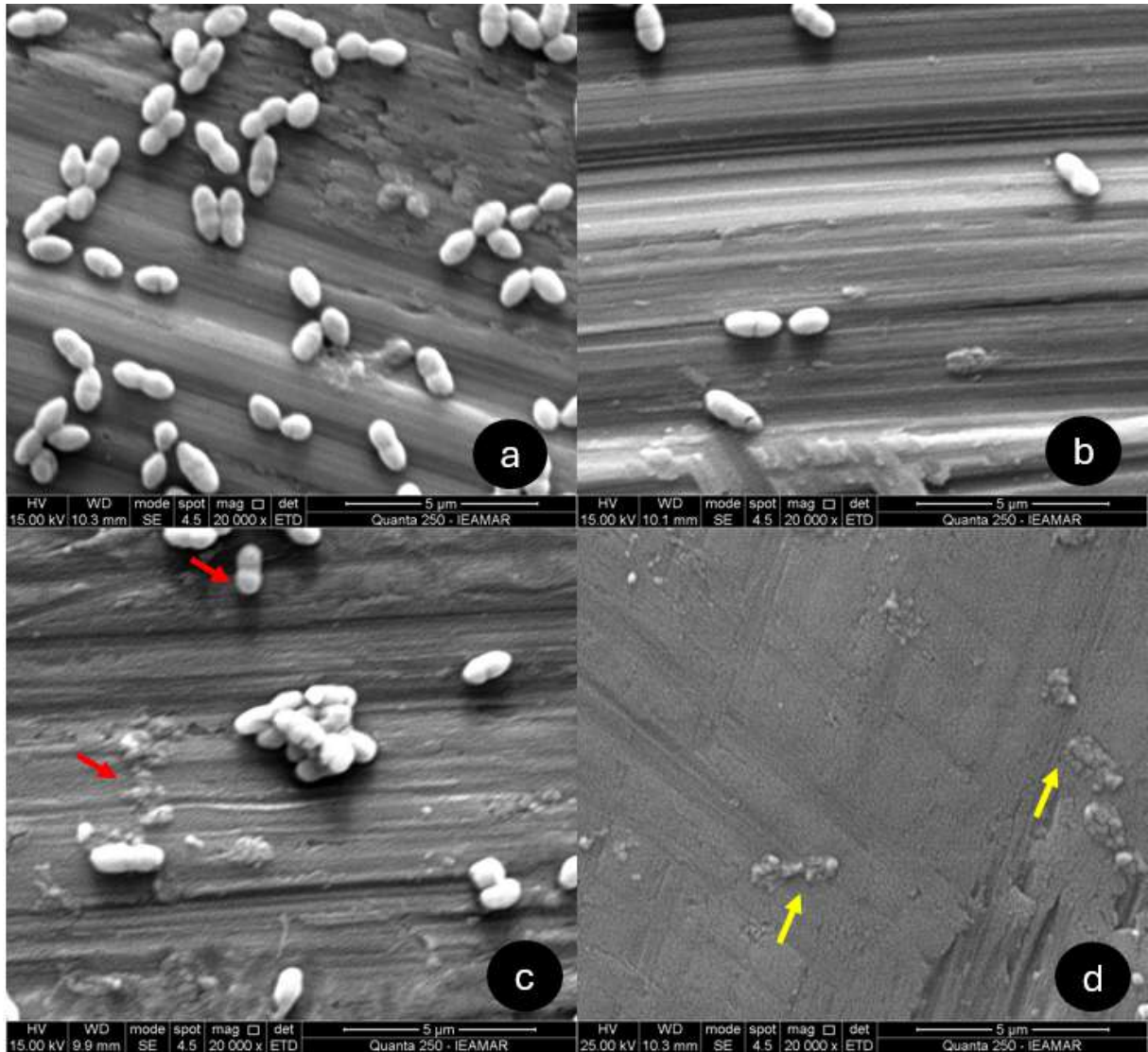
No subgrupo P não conseguimos visualizar bactérias integras aderidas à superfície do titânio, mas podemos notar (setas amarelas) a presença de possíveis bactérias com forma e tamanhos diferentes (figuras 17d e 18d).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de *S. gordonii* sobre superfície lisa de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – resíduos amorfos, setas amarelas bactérias com morfologia e tamanho alterados. Aumento de 7000x



Fonte: O autor

Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de *S. gordonii* sobre superfície lisa de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – resíduos amorfos, setas amarelas bactérias com morfologia e tamanho alterados. Aumento de 20000x



Fonte: O autor

6.5.4 Efeito dos tratamentos antimicrobianos avaliados sobre o biofilme de *S. gordonii* na ST dos discos de titânio

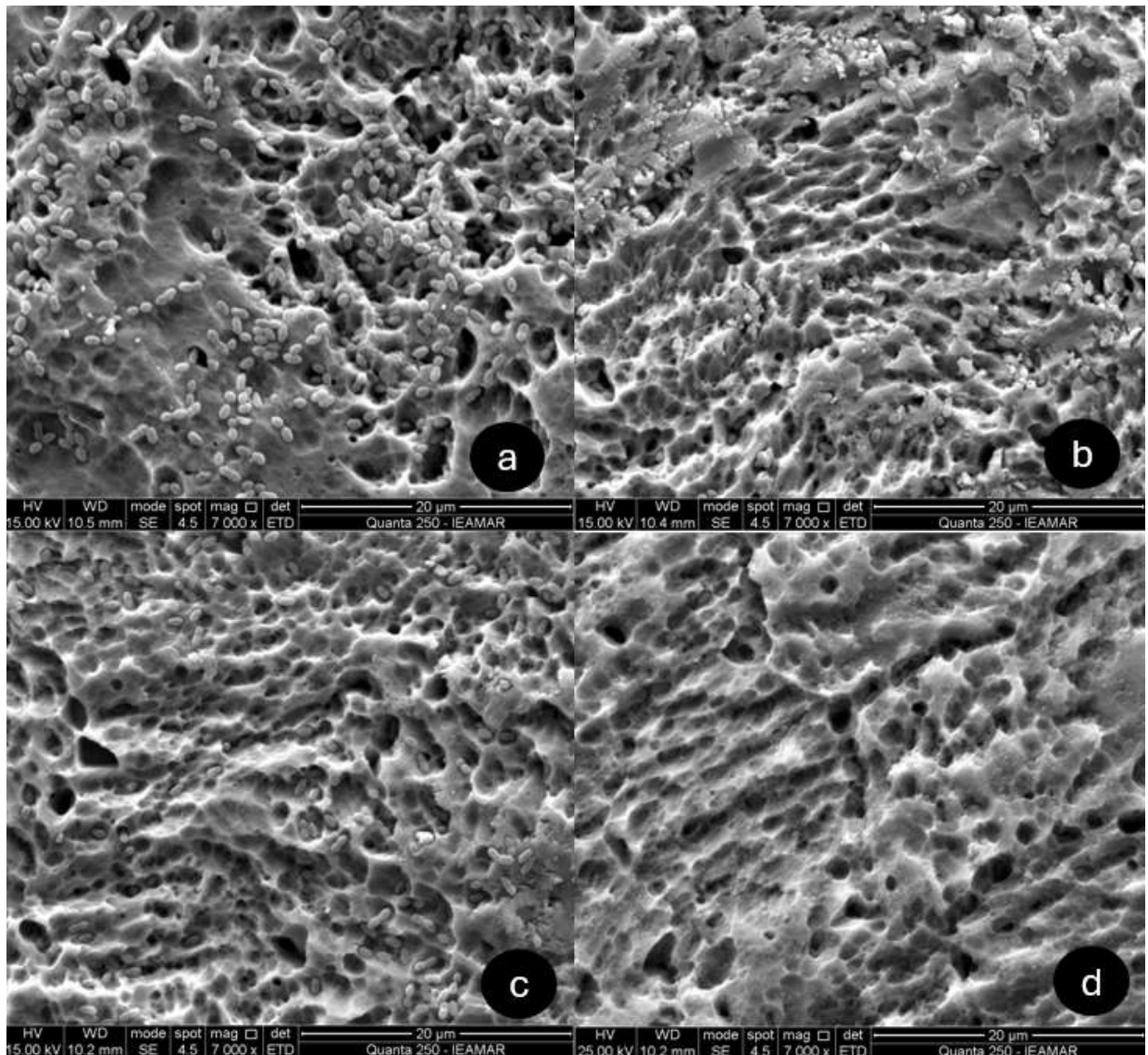
As figuras 19 e 20 mostram o efeito dos tratamentos avaliados sobre o biofilme nos aumentos de 7000 e 20000 respectivamente.

O subgrupo C mostrou um maior número de bactérias com morfologia normal (figura 19a e 20a) em seguida vem o subgrupo T que mostra uma grande quantidade de bactérias intactas alojadas nas imperfeições do titânio, também é possível notar

restos amorfos, indicados pelas setas vermelhas, entre as células e as irregularidades de superfície (figura 19c e 20c).

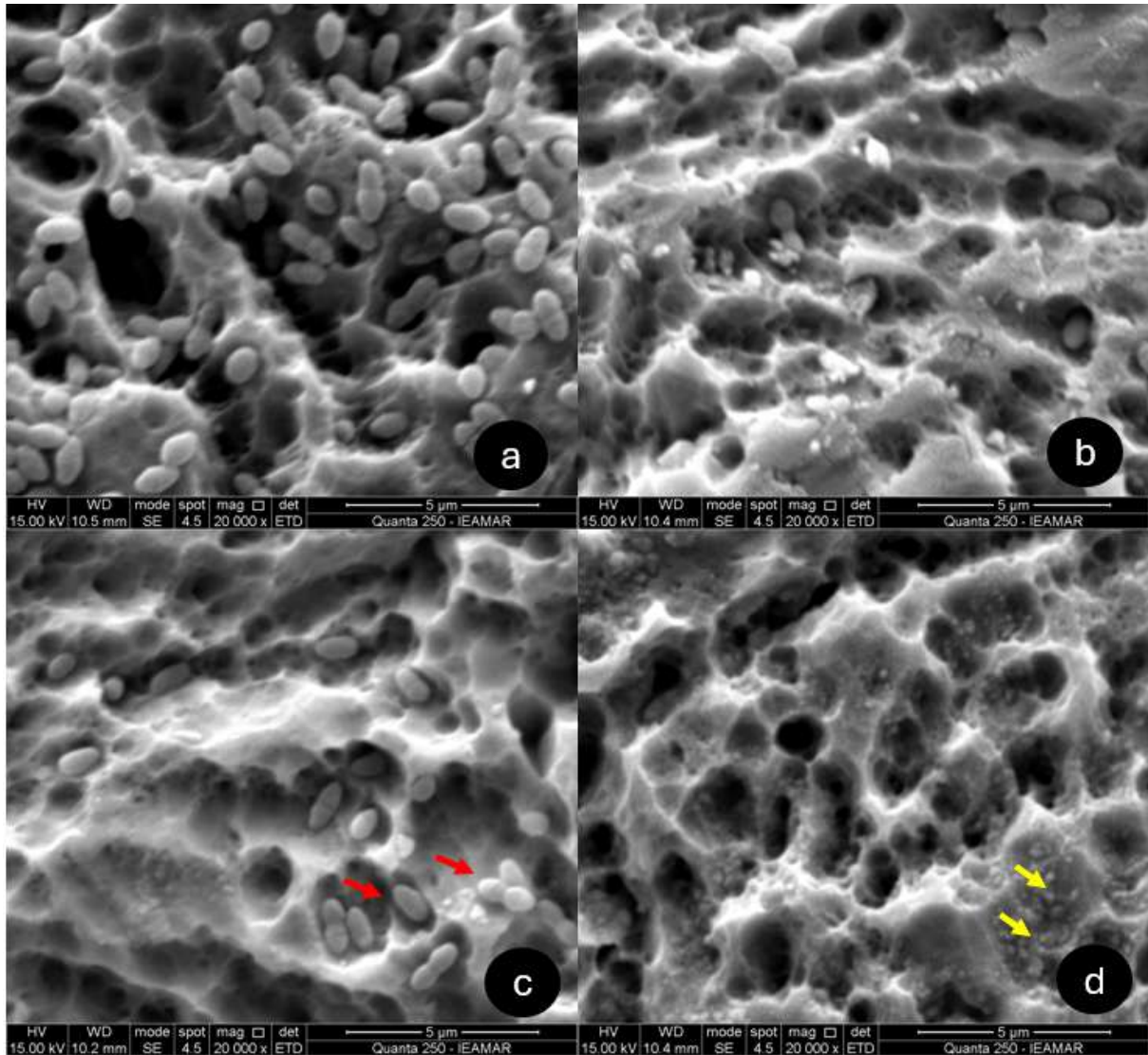
No subgrupo CX, podemos observar uma menor quantidade de bactérias (figura 19b e 20b) em comparação aos subgrupos C e CX. Enquanto no subgrupo P (figura 19d e 20d) conseguimos perceber somente restos amorfos de biofilme e no interior entre as irregularidades da superfície podemos observar algumas bactérias com morfologia e tamanho alterados (setas amarelas).

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de *S. gordonii* sobre superfície tratada de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica. Aumento de 7000x.



Fonte: O autor

Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos avaliados sobre biofilme de *S. gordonii* sobre superfície tratada de disco de titânio. (a) controle, (b) clorexidina, (c) terapia fotodinâmica e (d) Plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica, setas vermelhas – resíduos amorfos, setas amarelas bactérias com morfologia e tamanho alterados. Aumento de 20000x



Fonte: O autor

7. Discussão

O tratamento da peri-implantite exige a desinfecção da superfície contaminada do implante⁴, a CX vem sendo utilizada por décadas como agente descontaminante em terapia peri-implantar²⁹. Contudo, este medicamento apresenta efeitos colaterais e pode causar resistência microbiana tornando sua utilização um desafio durante o tratamento^{15,16}. Alternativas como a T vem sendo utilizada como terapia adjuvante.³⁴ Porém, sua eficácia é questionada, devido à falta de padronização e heterogeneidade dos estudos clínicos³³, além da necessidade do uso de um agente fotossensibilizante que normalmente se apresenta na forma líquida, levando às mesmas dificuldades técnicas (como dificuldade de manter o produto na área de tratamento pelo tempo recomendado pelo fabricante) que a CX. Recentemente o P vem despontando como uma possível alternativa na desinfecção de superfícies. O P consegue oxidar as bactérias aderidas à superfície do implante através da produção de ERO e ERN^{14,24}. Portanto, este estudo mostrou o efeito antimicrobiano e análise qualitativa da T, da CX e do P sobre o biofilme de *S. gordonii*, uma bactéria importante nos estágios iniciais da peri-implantite. Além dos efeitos residuais que os tratamentos avaliados poderiam deixar sobre os discos de titânio antes da formação do biofilme de *S. gordonii*.

Neste experimento, P se mostrou um agente eficaz no tratamento do biofilme de *S. gordonii* sobre a SL e ST de discos de titânio. O P foi superior a todos os grupos testados, sendo superado apenas pelo controle positivo (CX). Os nossos resultados estão de acordo com os encontrados na literatura^{14,23,24,27,41,43,46} que também comprovaram a eficácia do P contra patógenos bucais.

Todos os tratamentos antimicrobianos testados neste estudo foram eficazes no tratamento do biofilme de *S. gordonii*, porém o P conseguiu uma redução de mais de 2 log₁₀ na contagem de UFC/ml em relação ao controle. Já a T usando o AM a 0,01%, por imersão e pulverizado, conseguiram baixar a contagem de UFC/ml em menos de 1 log₁₀ em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Haghghi et al. (2023)⁴⁶, em um estudo sobre a descontaminação endodôntica em dentes decíduos, os autores obtiveram resultados melhores com a aplicação do PBTPA quando comparado ao uso da T tanto com o AM quanto a cúrcuma como agente fotossensibilizador. No entanto, o plasma obteve resultados similares ao controle positivo (hipoclorito de sódio a 2,5%), deste modo os autores enfatizam que

o P de gás He pode ser uma alternativa ao uso do hipoclorito de sódio, principalmente, devido ao risco de uma possível deglutição deste produto durante o manuseio e a dificuldade de colaboração da criança durante o atendimento endodôntico.

A CX ainda é considerada o padrão ouro na descontaminação de superfícies em odontologia, sendo normalmente usada como controle positivo nos experimentos. Ahrari et al. (2024)³⁶ também usaram a CX 0,12% como controle positivo em um experimento. Os autores testaram o efeito antimicrobiano da T sobre a cultura planctônica e sobre biofilme de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Assim como no nosso experimento, os autores afirmam que a CX também não apresentou crescimento bacteriano em cultura planctônica, contudo, a T foi mais eficiente que CX na desinfecção de biofilme, o que difere dos nossos resultados. Por outro lado, Cai et al. (2019)³⁷ não encontraram diferenças entre o uso de CX e T, diferente do nosso estudo, onde a CX se mostrou 100% eficiente na desinfecção do biofilme de *S. gordonii* formado sobre discos de titânio, tanto em SL e ST, sendo superior a todos os outros grupos. Esta discrepância de resultados pode estar ligada ao fato que neste experimento os autores usaram CX a 0,2% com tempo de 60s de tratamento, diferente do nosso que usamos a CX 0,12% com tempo de 5 minutos. Porém, Nemesio et al 2017.²⁹ não encontraram diferenças no tratamento do biofilme de *S. mutans* utilizando a T associado ao AM a 0,01% e CX a 0,12%, discordando dos resultados encontrados neste estudo, no qual o grupo CX mostrou um efeito antimicrobiano muito superior a T, tanto nas formas pulverizada ou por imersão.

Visando facilitar a aplicação do AM a 0,01% na superfície do implante a ser descontaminada durante o tratamento da peri-implantite, comparamos os resultados da T usando o AM na forma pulverizado sobre a superfície dos discos com a imersão total dos disco na solução de AM. Os resultados deste estudo mostram que não houve diferença nas formas de aplicação do AM, tanto em SL quanto em ST. Não encontramos na literatura nenhum experimento que tenha comparado o AM nessas duas formas de aplicação, por imersão e pulverização, sendo este estudo o primeiro a testar e comprovar que este modo de aplicação por pulverização também é efetivo para biofilme de *S. gordonii* formado em discos de titânio.

Quando os tratamentos avaliados eram realizados sobre os discos de titânio, sabe-se que a ST é mais rugosa que a SL, portanto, esperava-se que, resíduos da

CX⁴⁷ e/ou subprodutos como ER produzidas pelo P⁴³ e pela T ficassem aderidos nas rugosidades. Porém, nossos resultados em ST são semelhantes aos obtidos em SL, o que contraria os achados de Ryu et al (2015)⁴⁷, que encontraram um efeito residual CX em superfície jateada e de Hong et al. (2022)⁴³ que também verificaram efeito residual significativo da aplicação do plasma sobre biofilme recuperado após 48 horas do tratamento.

Neste experimento, o P só não foi superior à CX no tratamento do biofilme, Koban et al. (2011)⁴⁸ também observaram que o plasma não térmico gerou um efeito antimicrobiano maior sobre biofilme de *S. mutans* e multiespécies de saliva humana em comparação a CX a 0,12%, no tempo de aplicação do plasma de 10 minutos, o que torna mais difícil sua aplicação clínica. Porém, autores afirmam mesmo o efeito antimicrobiano com 5 minutos de aplicação do P ter sido menor que a CX a 0,12%, neste tempo o plasma teve um efeito positivo e bacteriostático em comparação ao grupo sem tratamento.

Lee et al. (2019)²⁴ usaram o P antes da formação do biofilme, e afirmam que este tratamento conseguiu modificar química e energeticamente a superfície de discos de titânio com a aplicação do P por 2 e 10 minutos. Após estes dois tempos de aplicação foram encontrados radicais livres na superfície do titânio. Estes radicais promovem o efeito oxiredutor que diminui a adesão bacteriana. Esse resultado difere dos nossos, onde nenhum dos tratamentos propostos foram eficazes na prevenção da formação do biofilme, todos os grupos experimentais e controles tiveram contagens de UFC/ml acima de 10⁶, diferindo do tratamento depois onde todos os tratamentos tiveram bons resultados na desinfecção do biofilme.

Surpreendentemente, neste experimento, o PA mostrou maior contagem de UFC/ml que os outros tratamentos, mesmo no controle sem tratamento. Cavalcanti et al. (2014)⁴⁹ também observou uma maior formação de biofilme sobre discos previamente tratados com P, os autores sugerem que a presença do nitrogênio depositado pelo P seria favorável ao crescimento bacteriano na superfície modificada do titânio. Matthes et al. (2019)⁵⁰ perceberam uma maior cobertura de fibroblastos sobre a superfície do titânio tratada previamente com P o que sugere um favorecimento a proliferação de células eucariotas.

As imagens obtidas com o MEV após a aplicação dos tratamentos propostos mostraram que a superfície do titânio foi alterada após a aplicação do P por 5 minutos, o que também foi observado por YANG Y et al. (2018)⁵¹. Estas mudanças também estão evidentes no grupo T. Nesses grupos, podemos ver a presença de resíduos sobre a superfície do titânio, o que não foi observado nos grupos CT e CX.

As imagens também ilustraram a eficiência do P na eliminação do biofilme de *S. gordonii*, com resultados melhores que a T e a CX. Sobre os discos que foram tratados com T houve maior crescimento bacteriano ficando abaixo apenas do grupo CT.

Após o tratamento do biofilme com T e CX tanto em SL e ST, podemos observar a presença de bactérias com morfologia intacta. Já no grupo P o que conseguimos ver são remanescentes de biofilme com possíveis resíduos de bactéria deformadas pela ação do P e que podem abrigar células viáveis, já que na contagem de UFC/ml tivemos crescimento bacteriano após o tratamento do biofilme com P. Lee et al. (2019)²⁴ também encontraram resíduos de bactérias com morfologia alterada pela ação P. Lee et al. (2019)⁴² também analisaram o biofilme de *P. gingivalis* tratado com plasma de He por 3 e 5 minutos. As imagens do MEV não mostraram a presença de bactérias intactas após a aplicação do P. Porém, as imagens sugerem bactérias com forma e tamanho diferentes ao encontrados no grupo controle sem tratamento, estes resultados são parecidos aos nossos.

Portanto, diante dos resultados encontrados nesta pesquisa e na literatura, fica evidente o poder antimicrobiano do P e da T. Contudo, diante das limitações deste estudo e da heterogeneidade dos estudos encontrados na literatura, fica claro a necessidade de se investigar as alterações residuais que os tratamentos físico-químicos como o P e T produzem na superfície do titânio.

8. Conclusão

Dentre os tratamentos antimicrobianos avaliados, o P foi o mais eficiente sobre o biofilme de *S. gordonii* sendo uma opção no tratamento antimicrobiano em superfície lisa e tratada dos discos de titânio. Nas imagens de MEV, este efeito antimicrobiano também foi confirmado seguido da CX e da T. No entanto, os tratamentos antimicrobianos avaliados, antes da formação do biofilme, não mostraram nenhum um efeito residual que impedisse o biofilme de ser formado após 24 horas de incubação. As imagens de MEV mostram uma alteração na superfície dos discos de titânio, com a presença de resíduos em maior quantidade quando utilizado o P e seguido da T.

9. Referências

1. Wang Y, Zhang Y, Miron RJ. Health, Maintenance, and Recovery of Soft Tissues around Implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* junho de 2016;18(3):618–34.
2. Atieh MA, Alsabeeha NHM. Peri-implantitis Through the Looking Glass. *Int Dent J.* fevereiro de 2024;74(1):42–5.
3. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol* [Internet]. junho de 2018 [citado 29 de julho de 2024];45(S20). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcpe.12957>
4. 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 Implantol Berl Ger.* 9 de setembro de 2022;15(3):213–48.
5. Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol.* 29 de abril de 2022;13:895537.
6. Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Investig.* dezembro de 2020;24(12):4237–60.
7. Savčić N, Henjaš D, Jezdić M, Đinić Krasavčević A, Milinković I. *Porphyromonas gingivalis* in Different Peri-Implant Conditions: a Pilot Cross - Sectional Study. *Acta Stomatol Croat.* 15 de dezembro de 2022;56(4):387–94.
8. Cook GS, Costerton JW, Lamont RJ. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res.* agosto de 1998;33(6):323–7.
9. Radunovic M, Pavic A, Ivanovic V, Milivojevic M, Radovic I, Di Carlo R, et al. Biocompatibility and antibiofilm activity of graphene-oxide functionalized titanium discs and collagen membranes. *Dent Mater.* julho de 2022;38(7):1117–27.
10. Ślęzak P, Śmiga M, Smalley JW, Siemińska K, Olczak T. *Porphyromonas gingivalis* HmuY and *Streptococcus gordonii* GAPDH—Novel Heme Acquisition Strategy in the Oral Microbiome. *Int J Mol Sci.* 10 de junho de 2020;21(11):4150.

11. Cheng J, Chen L, Tao X, Qiang X, Li R, Ma J, et al. Efficacy of surgical methods for peri-implantitis: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Oral Health*. 19 de abril de 2023;23(1):227.
12. Madi M, Htet M, Zakaria O, Alagl A, Kasugai S. Re-osseointegration of Dental Implants After Periimplantitis Treatments: A Systematic Review. *Implant Dent*. fevereiro de 2018;27(1):101–10.
13. Rudolf JL, Moser C, Sculean A, Eick S. In-vitro antibiofilm activity of chlorhexidine digluconate on polylactide-based and collagen-based membranes. *BMC Oral Health*. dezembro de 2019;19(1):291.
14. Jungbauer G, Moser D, Müller S, Pfister W, Sculean A, Eick S. The Antimicrobial Effect of Cold Atmospheric Plasma against Dental Pathogens—A Systematic Review of In-Vitro Studies. *Antibiotics*. 20 de fevereiro de 2021;10(2):211.
15. Stein JM, Conrads G, Abdelbary MMH, Yekta-Michael SS, Buttler P, Glock J, et al. Antimicrobial efficiency and cytocompatibility of different decontamination methods on titanium and zirconium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. janeiro de 2023;34(1):20–32.
16. 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.
17. Solderer A, Kaufmann M, Hofer D, Wiedemeier D, Attin T, Schmidlin PR. Efficacy of chlorhexidine rinses after periodontal or implant surgery: a systematic review. *Clin Oral Investig*. janeiro de 2019;23(1):21–32.
18. Morante J, Quispe AM, Ymaña B, Moya-Salazar J, Luque N, Soza G, et al. Tolerance to disinfectants (chlorhexidine and isopropanol) and its association with antibiotic resistance in clinically-related *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Pathog Glob Health*. 2 de janeiro de 2021;115(1):53–60.
19. Mang T, Rogers S, Keinan D, Honma K, Baier R. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) induction of biofilm matrix architectural and bioadhesive modifications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. março de 2016;13:22–8.
20. Songca SP, Adjei Y. Applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy against Bacterial Biofilms. *Int J Mol Sci*. 16 de março de 2022;23(6):3209.

21. Ercan UK, İbiş F, Dikyol C, Horzum N, Karaman O, Yıldırım Ç, et al. Prevention of bacterial colonization on non-thermal atmospheric plasma treated surgical sutures for control and prevention of surgical site infections. Kaushik NK, organizador. PLOS ONE. 5 de setembro de 2018;13(9):e0202703.
22. Armand A, Khani M, Asnaashari M, AliAhmadi A, Shokri B. Comparison study of root canal disinfection by cold plasma jet and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* junho de 2019;26:327–33.
23. 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.
24. Lee MJ, Kwon JS, Jiang HB, Choi EH, Park G, Kim KM. The antibacterial effect of non-thermal atmospheric pressure plasma treatment of titanium surfaces according to the bacterial wall structure. *Sci Rep.* 13 de fevereiro de 2019;9(1):1938.
25. 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.
26. Zhai S yue, Kong MG, Xia Y min. Cold Atmospheric Plasma Ameliorates Skin Diseases Involving Reactive Oxygen/Nitrogen Species-Mediated Functions. *Front Immunol.* 26 de maio de 2022;13:868386.
27. Yoo EM, Uhm SH, Kwon JS, Choi HS, Choi EH, Kim KM, et al. The Study on Inhibition of Planktonic Bacterial Growth by Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Jet Treated Surfaces for Dental Application. *J Biomed Nanotechnol.* 1º de fevereiro de 2015;11(2):334–41.
28. Ramanauskaite A, Schwarz F, Cafferata EA, Sahrman P. Photo/mechanical and physical implant surface decontamination approaches in conjunction with surgical peri-implantitis treatment: A systematic review. *J Clin Periodontol.* junho de 2023;50(S26):317–35.
29. Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* dezembro de 2017;20:234–7.

30. Podhorsky A, Biscopio 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.
31. Deliberador TM, Weiss SG, Rychuv F, Cordeiro G, Cate MCLT, Leonardi L, et al. Comparative Analysis &in Vitro& of the Application of blue¹⁷⁴ Oral Gel versus Chlorhexidine on &Porphyrromonas gingivalis&: A Pilot Study. *Adv Microbiol*. 2020;10(04):194–201.
32. Bunk D, Eisenburger M, Häckl S, Eberhard J, Stiesch M, Grischke J. The effect of adjuvant oral irrigation on self-administered oral care in the management of peri-implant mucositis: A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. outubro de 2020;31(10):946–58.
33. 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 10 de agosto de 2024];39(2). Disponível em: <https://www.pjms.org.pk/index.php/pjms/article/view/7253>
34. Karuppan Perumal MK, Rajan Renuka R, Manickam Natarajan P. Evaluating the potency of laser-activated antimicrobial photodynamic therapy utilizing methylene blue as a treatment approach for chronic periodontitis. *Front Oral Health*. 30 de maio de 2024;5:1407201.
35. 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.
36. Ahrari F, Nazifi M, Mazhari F, Ghazvini K, Menbari S, Fekrazad R, et al. Photoinactivation Effects of Curcumin, Nano-curcumin, and Erythrosine on Planktonic and Biofilm Cultures of *Streptococcus mutans*. *J Lasers Med Sci*. 16 de abril de 2024;15:e7.
37. Cai Z, Li Y, Wang Y, Chen S, Jiang S, Ge H, et al. Disinfect *Porphyrromonas gingivalis* Biofilm on Titanium Surface with Combined Application of Chlorhexidine and Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. maio de 2019;95(3):839–45.

38. 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.
39. Borges AC, Kostov KG, Pessoa RS, De Abreu GMA, Lima GDMG, Figueira LW, et al. Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dentistry. *Appl Sci.* 24 de fevereiro de 2021;11(5):1975.
40. Yan D, Malyavko A, Wang Q, Ostrikov K (Ken), Sherman JH, Keidar M. Multi-Modal Biological Destruction by Cold Atmospheric Plasma: Capability and Mechanism. *Biomedicines.* 18 de setembro de 2021;9(9):1259.
41. Mahasneh A, Darby M, Tolle SL, Hynes W, Laroussi M, Karakas E. Inactivation of *Porphyromonas gingivalis* by Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma. *Plasma Med.* 2011;1(3–4):191–204.
42. 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.
43. Hong Q, Sun H, Chen M, Zhang S, Yu Q. Plasma treatment effects on destruction and recovery of *Porphyromonas gingivalis* biofilms. Kaushik NK, organizador. *PLOS ONE.* 14 de setembro de 2022;17(9):e0274523.
44. Kamionka J, Matthes R, Holtfreter B, Pink C, Schlüter R, Von Woedtke T, et al. Efficiency of cold atmospheric plasma, cleaning powders and their combination for biofilm removal on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Investig.* março de 2022;26(3):3179–87.
45. Bassoukou h cristine. Efeito antimicrobiano de diferentes tratamentos sobre *S. Gordonii* em discos de titânio de superfície lisa e superfície tratada. [São Paulo]: Universidade Santo Amaro; 2023.
46. Haghighi L, Azizi A, Vatanpour M, Ramezani G. Antibacterial Efficacy of Cold Atmospheric Plasma, Photodynamic Therapy with Two Photosensitizers, and Diode Laser on Primary Mandibular Second Molar Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. Pucci CR, organizador. *Int J Dent.* 21 de abril de 2023;2023:1–9.

47. Ryu H, Kim Y, Lim B, Lim Y, Ahn S. Chlorhexidine Uptake and Release From Modified Titanium Surfaces and Its Antimicrobial Activity. *J Periodontol.* novembro de 2015;86(11):1268–75.
48. 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.
49. Cavalcanti IMG, Ricomini Filho AP, Lucena-Ferreira SC, Da Silva WJ, Paes Leme AF, Senna PM, et al. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol.* julho de 2014;59(7):695–703.
50. Matthes R, Jablonowski L, Holtfreter B, Gerling T, Von Woedtke T, Kocher T. Fibroblast Growth on Zirconia Ceramic and Titanium Disks After Application with Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices or with Antiseptics. *Int J Oral Maxillofac Implants.* julho de 2019;34(4):809–18.
51. 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.