

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

***AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA DESCONTAMINAÇÃO
DE SUPERFÍCIES MAQUINADAS DE DISCOS DE TITÂNIO
APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS.
ESTUDO IN VITRO.***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Odontologia da
Universidade Paulista – UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

OSWALDO BIONDI FILHO

SÃO PAULO

2011

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP

***AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA DESCONTAMINAÇÃO DE
SUPERFÍCIES MAQUINADAS DE DISCOS DE TITÂNIO
APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS.
ESTUDO IN VITRO.***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Odontologia da
Universidade Paulista – UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

OSWALDO BIONDI FILHO

Orientador: Prof. Dr. Luciano Lauria Dib

SÃO PAULO

2011

Biondi Filho, Oswaldo.

Avaliação microbiológica da descontaminação de superfícies maquinadas de discos de titânio após diferentes tratamentos. *Estudo in vitro* / Oswaldo Biondi Filho. – 2011.

69 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Paulista, Instituto de Ciências da Saúde, 2011.

Orientação: Profª Luciano Lauria Dib

Bibliografia: f. 56-69

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA DESCONTAMINAÇÃO DE
SUPERFÍCIES MAQUINADAS DE DISCOS DE TITÂNIO
APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS.
ESTUDO IN VITRO.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Odontologia da
Universidade Paulista – UNIP, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

OSWALDO BIONDI FILHO

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

_____ ____/____/____

_____ ____/____/____

_____ ____/____/____

DEDICATÓRIA

A **Deus**, ser presente e onipotente,

Aos meus pais, **Oswaldo** (*in memoriam*) e **Delia**, os meus
maiores mestres,

A **Patrícia**, pelo carinho, ajuda, incentivo e amor,

“ a luz mais brilhante, num dia de trevas “

As minhas irmãs, **Maria** e **Teresa**, pelo apoio e incentivo,

Ao Prof. Dr. **Alfredo Gromatzky** (*in memoriam*), por tornar possível o
início de minha vida acadêmica,

Aos meus **alunos**, que motivaram minha busca pelo conhecimento.

*“Felíz é aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”
(Cora Coralina)*

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. **Luciano Lauria Dib**, agradeço a confiança em mim depositada, e as orientações na realização deste trabalho, sempre seguidas de muito entusiasmo e rigor científico.

"Todos vivemos sob o mesmo céu, mas nem todos vêem o mesmo horizonte"

(Konrad Adenauer)

A Profa. Dra. **Patrícia Fernanda Roesler Bertolini**, pelo incentivo, colaboração, motivação e paciência. Seu conhecimento e tempo dedicado a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. **Ivana Barbosa Suffredini**, pela sua amizade, conhecimento, simpatia, dedicação e as pertinentes sugestões dadas a este trabalho. Por ter aberto as portas do Laboratório de Extração de Princípios Ativos de Plantas Brasileiras (UNIP), para a realização deste experimento, não poupando esforços para sua concretização, comprometendo muitas vezes seus finais de semana.

A Profa. Dra. **Cintia Helena Coury Saraceni**, Coordenadora do programa de Pós Graduação em Odontologia, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Romeu Magnani** e Profa. Dra. **Flávia Magnani Bevilacqua**, agradeço pela análise estatística.

A Sra. **Juliana Danieli Vizioli**, da empresa MMOptics , sem a qual não teríamos contatado a empresa Aptivalux.

Ao Sr. **Marcus Vinícius**, da empresa Aptivalux – tecnologias para a saúde, pelos esclarecimentos sobre o fotossensibilizador Chimiolux , e o fornecimento do mesmo.

Aos Srs. **Jochen Roestel** e **Cesar Augusto Campaneri**, da empresa Conexão Sistemas de Prótese, pelo pronto atendimento de nossas solicitações, com extrema simpatia, agilidade e competência na confecção dos discos de titânio e na avaliação da rugosidade da sua superfície, sem os quais não seria possível a concretização deste trabalho.

Ao Sr. **Roberto Tolini**, da empresa Golgran - Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda, pela amizade e apoio no fornecimento do instrumental necessário para nosso trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Extração de Princípios Ativos de Plantas Brasileiras(UNIP), **Sergio Alexandre Frana** e **Lucielda Ramos dos Santos**, pela sua simpatia e colaboração em nossa pesquisa.

Aos **professores do Programa de Pós Graduação**, pelos ensinamentos ministrados, em especial a Profa. Dra. **Sônia Maria Ribeiro de Souza**.

A todos os **funcionários do Programa de Pós Graduação**, que são extremamente eficientes e amáveis .

A ex-funcionária da Secretaria da Pós Graduação, **Cynthia Fernandes**.

Aos meus **colegas de Mestrado**.

RESUMO

Protocolos para descontaminação da superfície de implante menos invasivos e que não alterem sua superfície tem sido pesquisados. Este estudo avaliou microbiologicamente a descontaminação da superfície maquinada de discos de titânio (DT) após diferentes tratamentos. 56 DT foram contaminados com 10 µl da suspensão de células de *Streptococcus sanguinis* (Ss), divididos aleatoriamente em grupos: 1) DT contaminados com Ss (DTSs); 2) DTSs irrigados com 10 ml da solução de soro fisiológico; 3) DTSs irrigados com 10 ml de enxaguatório digluconato de clorexidina a 0,2%; 4) DTSs irrigados com 10ml do enxaguatório aloe vera; 5) DTSs tratados com fotossensibilizador azul de metileno (FAM); 6) DTSs tratados com FAM associado ao laser diodo; 7) DTSs tratados com laser diodo. Após os tratamentos, os DT foram mantidos em 3ml de solução estéril de BHI, em aerobiose a 37°C por 48 horas. Semeou-se placas de Petri em duplicata para cada amostra em meio de cultura Ágar Sangue Colúmbia, mantidas em aerobiose a 37°C por 48 horas para contagem das unidades formadoras de colônia (ufc)/ ml. A análise dos resultados pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, demonstrou no grupo 3 eliminação da contaminação das superfícies dos DT ($p<0,05$), enquanto que os grupos 2, 4, 5, 6 e 7 reduziram a sua contaminação comparados ao 1 ($p<0,05$), e os grupos 2 e 4 foram superiores ao 7 ($p<0,05$). Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que dentre os tratamentos aplicados, a irrigação com digluconato de clorexidina a 0,2% foi o mais efetivo.

Palavras-chave: Implante, Titânio, Laser, Aloe vera, Clorexidina.

ABSTRACT

Less invasive protocols for implant surface decontamination that no alter its surface have been researched. This study evaluated the microbiological decontamination of the surface of machined titanium disks (TD) after different treatments. 56 TD infected with 10 μ l of cell suspension of *Streptococcus sanguinis* (Ss) were randomly divided into groups: 1) TD infected with Ss (TDSs); 2) TDSs irrigated with 10 ml of saline solution; 3) TDSs irrigated with 10 ml of 0,2% chlorhexidine digluconate, 4) TDSs irrigated with 10ml of aloe vera mouthwash, 5) TDSs treated with photosensitizer methylene blue (FAM); 6) treated with FAM TDSs associated with the diode laser; 7) TDSs treated with diode laser. After the treatments, TD were kept in 3 ml of sterile BHI solution, under aerobic conditions at 37°C for 48 hours. Petri plates containing Columbia blood agar medium were sowed in duplicate for each sample, kept under aerobic conditions at 37°C for 48 hours for counting of colony forming units (cfu)/ ml. The Kruskal-Wallis test complemented by Dunn test, showed for group 3 treatment, elimination of surface TD contamination ($p < 0.05$), while groups 2, 4, 5, 6 and 7 reduced their contamination compared to 1 ($p < 0.05$), and groups 2 and 4 reduced their contamination compared to 7 ($p < 0.05$). Within the limits of this study, it may be stated that among the treatments, irrigation with chlorhexidine digluconate 0.2% was the most effective.

Key-words: Implant, Titanium, Laser, Aloe vera, Chlorhexidine

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Característica dos discos de titânio utilizados no estudo.
- Figura 2. Rugosímetro usado na análise das superfícies dos discos.
- Figura 3. Características de obtenção da cepa liofilizada e da placa mãe obtida com o microrganismo *Streptococcus sanguinis*.
- Figura 4. Coleta de células bacterianas da placa de Petri, e confirmação da obtenção da concentração de células bacterianas pela escala de Farland.
- Figura 5. Contaminação dos discos de titânio realizada em cada grupo.
- Figura 6. Irrigação efetuada com 10 ml de soro fisiológico (Grupo G2), enxaguatório de digluconato de clorexidina a 0,2% (Grupo G3) e enxaguatório de Aloe vera (Grupo G4)
- Figura 7. Característica de uso do fotossensibilizador azul de metileno.
- Figura 8. Aplicação da irradiação laser no Grupo G6.
- Figura 9. Aplicação da irradiação laser no Grupo G7.
- Figura 10. Discos de titânio dispostos em poços de placas de cultura com meio BHI, após 48 horas placas posicionadas no agitador, para efetuar a 6 diluições do conteúdo de cada poço.
- Figura 11. Características do crescimento microbiano em cada grupo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos escores das ufc, análise descritiva e resultado do teste estatístico de Dunn.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Característica da distribuição dos escores em cada grupo.

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

et al.	entre outros
RNA	Ácido Ribonucléico
%	Por cento
µm	Micron
mm	Milímetro
H/E	Hematoxilina e eosina
Er:YAG	Érbio: Ítrio, Prata
ANOVA	Análise de Variância Simples
CLX	Clorexidina
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. beta-haemolyticus</i>	<i>Streptococcus beta-haemolyticus</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
<i>Sp</i>	Espécies
mW	miliWats
GaAIAS	Gálio, Alumínio e Arsênio
Nm	Nanômetro
ATCC	American Type Culture Collection
mJ	miliJoule

$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
IAL	Instituto Adolfo Lutz
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
ml	Mililitro
μl	Microlitro
InGaAlP	Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo
W	Watts
ufc/ml	Unidade formadora de colônia por mililitro
G	Grupo
BHI	Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
\leq	Menor igual
cm^2	Centímetro quadrado
J	Joule
J/s	Joule por segundo
W/cm^2	Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1) Introdução	13
2) Revisão de Literatura	15
2.1) Colonização microbiana da superfície de implante	15
2.2) Características da superfície de implante e sua influência na contaminação microbiana	19
2.3) Tratamentos para descontaminação da superfície de implante	22
2.4) Uso do Aloe vera em Odontologia	31
3 Proposição	32
4) Material e Métodos	33
4.1) Discos de titânio	33
4.2) Local para a realização do estudo	34
4.3) Cultura e incubação do microrganismo <i>Streptococcus sanguinis</i>	34
4.4) Modelo de colonização	36
4.5) Tratamentos	37
4.6) Avaliação dos resultados	42
4.7) Análise estatística	43
Resultados	45
Discussão	48
Conclusão	55
Referências	56

1) Introdução:

Falhas tardias em Implantodontia são geralmente associadas à colonização da superfície de implante por tipos bacterianos patogênicos específicos (Gröbner-Schreiber et al. (2001); Mombelli et al. (2000); Ericsson et al. (1996); Mombelli & Lang (1998); Hayek et al. (2005)).

A aderência bacteriana à superfície de implantes é um processo complexo não completamente entendido (Drake et al. (1999); Füst et al. (2007)). Vários fatores físicos e biológicos são apontados por influenciar neste processo, como a lisura da superfície do implante e a possibilidade de remoção dos microrganismos pela ação do fluxo salivar e procedimentos de higiene oral (Rimondini et al. (1997); Füst et al. (2007)).

Hoje, um dos desafios na Implantodontia é a possibilidade de descontaminar a superfície do implante, modificando a característica da microbiota que a coloniza, com uso de métodos menos invasivos, no que diz respeito ao trauma tecidual e também em relação a evitar danos à superfície do implante por meio da produção de ranhuras (Deppe & Horsch (2007)).

Vários protocolos de tratamento têm sido propostos para a descontaminação da superfície de implante, entre eles o uso de curetas plásticas (Fox et al. (1990); Duarte et al. (2009) e o uso de agentes químicos antimicrobianos locais como a clorexidina (Kozlovsky et al. (2006)).

O digluconato de clorexidina é amplamente utilizado por sua ação anti-placa e a eficácia é atribuída pela sua propriedade bactericida em inibir o

acúmulo de biofilme bacteriano e pela capacidade de união às glicoproteínas salivares e bactérias (Fine et al. (1996); Cousido et al. (2010)).

A clorexidina também tem a propriedade de substantividade, definida como a capacidade de aderência às superfícies duras e moles da cavidade oral, sendo liberada posteriormente, mantendo ação bacteriostática (Kozlovsky et al. (2006); Berchier et al. (2010)).

O uso do laser tanto de alta (Kreisler et al. (2002); Martin (2004)) quanto o de baixa intensidade associado ou não a terapia fotodinâmica (Haas et al. (1997); Marotti et al. (2008); Kreisler et al. (2003)) tem sido investigado. Porém, os estudos ainda demonstram falhas na redução da contaminação bacteriana quando comparados ao uso da clorexidina, e ainda demonstram danos à superfície dos implantes (Kreisler et al. (2002); Stübinger et al. (2010)).

Em Periodontia, o uso de aloe vera tem sido proposto como solução irrigadora para auxiliar a descontaminação da superfície radicular, visando à eliminação de determinados tipos microbianos, por possuir propriedades antimicrobianas (Rieger & Carson (2002)). Por causa da semelhança da contaminação bacteriana existente entre a superfície dental e a superfície do implante, nos casos de periodontite e peri-implantite, respectivamente, o aloe vera pode ser testado como descontaminante da superfície de implantes.

Sendo assim, o objetivo deste estudo é comparar *in vitro* a capacidade de redução microbiana na superfície maquinada de discos de titânio utilizando laser diodo semiconductor associado à terapia fotodinâmica, irrigação com digluconato de clorexidina a 0,2% e irrigação com enxaguatório de aloe vera.

2) Revisão de Literatura:

2.1) Colonização microbiana da superfície de implante

Um dos fatores etiológicos locais relacionados às doenças peri-implantares é a contaminação microbiana da superfície do implante por bactérias patogênicas, sendo que estas se organizam em um biofilme (Melo et al. (2007)).

2.1a) Características do biofilme bacteriano

O biofilme pode ser caracterizado como uma comunidade de microrganismos, inserida a um substrato embebido por uma matriz extracelular de polímeros de origem bacteriana e salivar (Spratt & Prattern (2003); ten Cate (2006)).

Recentemente, pela análise de tecnologias baseadas no estudo do RNA ribossômico, Hojo et al. (2009) caracterizaram uma diversidade de populações bacterianas que colonizam um biofilme, contribuindo para a saúde oral ou o desenvolvimento de doenças no indivíduo. Biofilmes dentais se caracterizam por constituir um ecossistema complexo de multiespécies, onde as bactérias orais interagem cooperativamente ou competitivamente.

Encontram-se biofilmes em vários ambientes: sistemas aquáticos naturais, tecidos vivos, superfícies na cavidade oral, como dente, materiais restauradores e implantes (Costerton et al. (2005)).

O crescimento bacteriano em um biofilme se caracteriza por sua aderência à uma superfície sólida, que propicia a multiplicação bacteriana e a

formação de microcolônias embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, composta por canais fluídos aquosos e nutrientes (Costerton et al. (1999); ten Cate (2006)) .

Os biofilmes que colonizam as superfícies orais não descamativas, e as células epiteliais próximas ao fundo da bolsa ou sulco gengival são caracterizados como os mais complexos na natureza por possuírem grande variedade microbiana. A literatura cita que nestes biofilmes são encontradas mais de 700 espécies microbianas e podem ser considerados um fator de risco para ocorrência de doenças periodontais e peri-implantares (Kumar et al. (2005); Sakamoto et al. (2005)).

A remoção mecânica do biofilme bacteriano é o método mais frequentemente usado para o tratamento de doenças associadas à sua presença. O uso de agentes antimicrobianos também foi investigado, porém, as espécies que estavam organizadas em biofilme exibiram vários mecanismos de resistência (Del Pozo & Patel (2007)).

Em adição, a característica da microbiota oral e a dificuldade de manter concentrações terapêuticas dos antimicrobianos na cavidade oral são problemas associados ao uso desta forma de terapia (Wilson (2004)).

2.1b) Formação do biofilme bacteriano sobre a superfície do implante

A sequência dos eventos que ocorrem para a colonização da superfície do implante, proliferação microbiana e maturação do biofilme, é semelhante ao que ocorre na superfície oral (Heuer et al. (2007)).

A formação do biofilme bacteriano resulta de um processo que envolve a aderência microbiana à superfície, proliferação celular, produção da matriz e sua separação. Este processo é parcialmente controlado pelo “*quorum sensing*”, mecanismo de comunicação interbacteriano que é dependente da densidade populacional microbiana, e é associado com mudanças extremas (mais de 50%) no aspecto de expressão protéica (Costerton et al.(2005)). Como também a produção de fatores de virulência e a produção de bacteriocinas (Hojo et al. (2009)).

Inicialmente, para a formação do biofilme bacteriano na superfície do implante ocorre a adsorção de biopolímeros de origem salivar ou do fluido sulcular em sua superfície, que origina a película adquirida, a qual permite a colonização de microrganismos como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*. Estes microrganismos criam condições favoráveis para a aderência de patógenos associados a peri-implantite como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* e *Tanarella forsythensis* (Quirynen et al. (2002)).

O processo de aderência bacteriana às superfícies da cavidade oral inicia-se imediatamente após a sua exposição. Por causa da presença de diferentes superfícies na cavidade bucal, Hauser-Gerspach et al. (2007) investigaram *in vitro* se houve variação na aderência de *Streptococcus sanguinis* em superfícies de esmalte cobertas com saliva humana, comparada às superfícies de materiais odontológicos cobertos com saliva. Os materiais odontológicos utilizados foram: titânio (Rematitan M), ouro (Neocast 3), cerâmica (Vita Omega 900) e compósito (Tetric-Ceram). Estes materiais odontológicos e a superfície de esmalte foram dispostos por uma hora em uma

câmara de fluídos que mimetizava as características da cavidade oral. Os resultados coletados se basearam no número de células bacterianas aderidas e sua viabilidade. O número de células aderidas foi maior na superfície de titânio quando comparada à superfície dental, enquanto um número maior de células viáveis foi encontrado na superfície de esmalte. Estes resultados sugerem que variações no número e viabilidade de células bacterianas aderidas dependem das características do substrato e da presença da película adquirida.

Kreth et al. (2005) estudaram a competição e coexistência entre *Streptococcus sanguinis* e *S. mutans*, e acharam interações antagonistas entre as duas espécies relacionadas com a produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogênio. A produção destas substâncias inibitórias foi associada à ordem de inoculação e à abundância de nutrientes. Este é apenas um exemplo do vasto número de agentes controladores produzidos pelas bactérias. Ao observar esta característica, pode-se tirar vantagem do mecanismo de regulação microbiano como estratégia antibacteriana, o que faz parte do conceito da terapia de substituição bacteriana, e permitiria a substituição de uma espécie patogênica por uma espécie ecologicamente favorável para o meio (Hillman et al. (1994); Tagg & Dierksen (2003)).

Streptococcus sanguinis é um dos primeiros microrganismos que colonizam a superfície de esmalte e de implante, e facilita a coagregação de espécies patogênicas (Whitaker et al., 1996).

A aderência entre espécies bacterianas é responsável pela complexidade da microbiota que coloniza o biofilme bacteriano. Algumas evidências indicam que a colonização inicial do biofilme por *Streptococcus*

sanguinis, favorece a colonização deste biofilme por *Porphyromonas gingivalis* (Stinson et al. (1991)).

2.2) Características da superfície de implante e sua influência na contaminação microbiana

Em Implantodontia, um dos fatores que influenciam a contaminação da superfície do implante se relaciona à característica da sua rugosidade. Preocupados com este aspecto, Silva et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a influência da rugosidade superficial na contaminação de implantes e sua interferência na remoção de microrganismos com o emprego de jato de bicarbonato.

Os autores utilizaram discos de titânio de diferentes superfícies divididos em 3 grupos: 1) 10 discos com superfície maquinada, com média aritmética de rugosidade de 0,17 μm ; 2) 10 discos com a superfície jateada com partículas de óxido de alumínio de 65 μm , com média aritmética de rugosidade de 1,14 μm ; 3) 10 discos com a superfície jateada com partículas de óxido de alumínio de 250 μm , com média aritmética de rugosidade de 3,17 μm .

Os discos foram esterilizados e incubados em tubos contendo a cepa *Streptococcus sanguinis* em suspensão. A avaliação da contaminação microbiana demonstrou que os discos com superfície maquinada (grupo 1) apresentaram 49×10^3 células bacterianas, enquanto que os discos do grupo 2 e 3 apresentaram 11×10^4 e 35×10^5 células bacterianas, respectivamente.

Após a aplicação do jato de bicarbonato, nas superfícies mais rugosas foi encontrado um número maior de células bacterianas.

Aspectos relacionados ao desenho e biomateriais usados na fabricação de implantes e de seus componentes, como o "*abutment*", podem facilitar a colonização bacteriana na sua superfície, como também propiciar o desenvolvimento de processo inflamatório, que seria um risco para a ocorrência de perda óssea ao redor do implante.

Baldi et al. (2009) observaram o acúmulo de microrganismos e a resposta tecidual ao redor de implantes com superfície maquinada ou com superfície condicionada, avaliando suas características clínica, histológica e microbiológica.

Oito pacientes com indicação para cirurgia para instalação de implantes foram selecionados, sendo que em cada paciente foram instalados no mínimo 2 e no máximo 4 implantes de diâmetro de 4 mm com variação em seu comprimento de 10 a 13 mm. Após 3 semanas, os implantes foram expostos, e instalados os "*abutments*" e provisórios. Um total de 10 pares de implantes foi avaliado, sendo que um possuía superfície maquinada, enquanto outro possuía superfície condicionada.

Para a análise histológica, após 3 meses da instalação dos implantes, foram feitas biópsias dos tecidos moles peri-implantares pela face lingual. Após o processamento tecidual e coloração H/E, não foram encontradas diferenças na composição celular ou na presença de infiltrado inflamatório ao redor dos tipos de implantes avaliados.

A avaliação clínica baseou-se na obtenção do índice de placa de O'Leary e índice de sangramento a sondagem nos períodos de 2, 3 e 4 meses. Sangramento foi detectado em ambos os tipos de implante no período de

avaliação 4 meses. Grande acúmulo de placa e dificuldade para sua remoção foram observados ao redor dos implantes com superfície condicionada.

A análise microbiológica caracterizou a presença de um maior acúmulo bacteriano ao redor dos implantes com superfície condicionada, quando comparada aos implantes com superfície maquinada.

Portanto, a característica de rugosidade da superfície do implante é fator que influencia a retenção de microrganismos e dificulta a sua remoção.

Tendo em vista a importância da rugosidade superficial do implante, este aspecto deve ser levado em consideração quando se pensa o processo de contaminação, e de descontaminação em Implantodontia.

Duarte et al. (2009) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar se houve diferenças na rugosidade e aderência bacteriana em superfícies de titânio submetidas a protocolos de tratamento distintos. Quarenta discos de titânio com superfície maquinada e 40 discos com superfície tratada foram divididos aleatoriamente para receberem um dos seguintes tratamentos: aplicação do laser Er:YAG, instrumentação com curetas plásticas, instrumentação com curetas metálicas ou profilaxia com jato abrasivo.

A avaliação da rugosidade superficial foi realizada antes e após a execução dos tratamentos com o uso de um perfilômetro. A influência desta rugosidade na retenção microbiana foi determinada pelo método de cultura da cepa de *Streptococcus sanguinis* sobre as superfícies dos discos de titânio.

O uso de curetas metálicas nos discos de titânio maquinados foi o tratamento que produziu maior rugosidade superficial, enquanto que para os discos de titânio com superfície tratada não houve diferenças na rugosidade superficial.

As superfícies rugosas dos discos de titânio tratadas com curetas metálicas e jato abrasivo predispuseram a menor colonização por *Streptococcus sanguinis*.

Subramani et al. (2009) concluem através de uma revisão de literatura que a característica superficial de rugosidade do implante e do “*abutment*” influencia a aderência bacteriana precoce, o que cria ambiente favorável para a colonização de microrganismos com características patogênicas.

2.3) Tratamentos para descontaminação da superfície de implante

Pesquisas tem sido realizadas com o intuito de buscar tratamentos efetivos para descontaminação da superfície do implante, que não produzam alterações em sua superfície, como também cause menor trauma para os tecidos peri-implantares.

2.3a) - Irrigação com clorexidina

A clorexidina é uma bisguanidina com propriedades catiônicas, cuja molécula apresenta-se simétrica, com dois anéis 4-clorofenil e dois grupos etano pentânicos ligados por uma cadeia central do hexametileno, quimicamente classificada como digluconato de clorexidina (Cavezzi et al. (1996)).

A clorexidina é agente químico amplamente utilizado por causa das suas propriedades antiplaca e anti-inflamatória, associados à sua propriedade de substantividade (Grossman et al. (1986); Lang & Brecx (1986); Cavezzi et al. (1996); Jones (1997)).

Sua ação relaciona-se à interação eletrostática com a parede celular bacteriana, que leva à sua ruptura, precipitação do citoplasma e morte bacteriana (Grossman et al. (1986); Cavezzi et al. (1996)).

A eficácia da clorexidina é atribuída às suas propriedades bactericida e a sua capacidade de penetrar no biofilme bacteriano (Netuschil et al. (1995)), e inibir o acúmulo bacteriano por causa da sua união às glicoproteínas salivares (Fine et al. (1996)).

Dennison et al. (1994) realizaram um estudo *in vitro*, utilizando implantes com formato cilíndrico e superfície maquinada, com plasma spray e com superfície de hidroxiapatita. Os implantes tiveram as superfícies contaminadas com endotoxina bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*. As formas de tratamento para a sua descontaminação englobaram o uso de cotonete embebido com água, solução de ácido cítrico, clorexidina a 0,12%, e tratamento com jato abrasivo. Após a obtenção dos resultados os mesmos foram analisados pelo teste estatístico de ANOVA. Os implantes com superfície maquinada foram efetivamente descontaminados. O tratamento para descontaminação com ácido cítrico foi efetivo para implantes com superfície maquinada ou de hidroxiapatita.

Kozlovsky et al. (2006) através de um estudo *in vitro*, avaliaram a descontaminação de discos de titânio de superfície lisa maquinada, discos de titânio com superfície tratada (rugosa) após a sua contaminação com *Streptococcus mutans* (SM). Todos os discos de titânio foram contaminados com saliva e foram embebidos com clorexidina (CLX) a 0,1% ou 0,2%. Após 24 horas, a quantidade de CLX absorvida, enxaguada e liberada da superfície do implante foi avaliada espectrofotometricamente. A atividade antibacteriana

foi avaliada por zonas de inibição do crescimento de SM. Os resultados demonstraram que a concentração da CLX e a característica da superfície de titânio influenciaram no nível de absorção da CLX e sua atividade antibacteriana. Maiores níveis de absorção e atividade antibacteriana ocorreram com clorexidina a 0,2% em superfície rugosa de titânio.

2.3b) Aplicação do Laser para descontaminação da superfície de titânio

- Características das grandezas físicas utilizadas em Laserterapia:

Segundo Lizarelli (2002), para o entendimento, mensuração, escolha e controle da irradiação da luz laser sobre as áreas tratadas, se faz necessário o conhecimento de algumas grandezas físicas:

- Energia: quantidade de luz depositada no tecido tratado, caracterizada pela unidade Joule (J);

- Energia Total: informa a quantidade total de energia depositada no final da irradiação. É calculada pela multiplicação da potência de saída da luz laser (em Watts) e o tempo de irradiação (em segundos). A energia total é caracterizada pela unidade Joule (J);

- Fluência ou Dose ou Densidade de Energia: é a distribuição da quantidade de energia aplicada por unidade de área, sendo caracterizada pela unidade J/cm^2 . É calculada pela potência de saída da luz laser (em Watts) multiplicada pelo tempo de irradiação (em segundos), divididos pela área em que a luz é aplicada (em cm^2);

- Potência: é a taxa que uma quantidade de energia é transmitida ao tecido, sua unidade é em Watts (W) ou Joules/ segundo (J/s);

- Irradiância ou Intensidade ou Densidade de Potência: quantidade de energia aplicada por segundo numa determinada área, sua unidade é W/cm^2 .

- Aplicação do laser de Alta intensidade:

Kreisler et al. (2002) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a descontaminação de diferentes tipos de tratamento, com um total de 72 discos de titânio com 3 tipos de superfícies: jateada e com tratamento ácido, com superfície de spray de plasma e coberto com hidroxiapatita. Estes implantes tiveram a sua superfície contaminada e foram incubados em suspensão de *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). As amostras foram irradiadas com laser Er:YAG 60 e 120 mJ. O crescimento bacteriano foi avaliado através da contagem de unidades formadoras de colônia em placas de Ágar sangue. Em densidades de baixa energia o laser Er:YAG mostrou-se efetivo na redução microbiana.

Kreisler et al. (2003) desenvolveram um estudo *in vitro*, para avaliar a descontaminação de discos de titânio de 3 superfícies: jateada e com tratamento ácido, spray de plasma e coberto com hidroxiapatita. As superfícies dos discos foram contaminadas e incubadas em uma suspensão de *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Os discos de titânio foram divididos entre os seguintes grupos:

- Grupo controle não tratado,

- Grupo tratado com digluconato de clorexidina (CLX),
- Grupo tratado com laser.

Após a avaliação microbiológica dos resultados não houve vantagem do uso do laser sobre os métodos convencionais para a descontaminação da superfície de implante. A característica da superfície do implante utilizado determina a densidade de potência para que ocorra descontaminação com uso do laser. O tratamento para descontaminação com laser apresentou-se inferior ao proporcionado pela CLX a 0,2%.

Kreisler et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro*, com 48 amostras de implantes com superfície jateada, e com tratamento ácido para avaliarem a sua descontaminação. Após a inoculação destas amostras com *P. gingivalis* (ATCC 33277), os implantes foram cobertos com albumina do soro bovino e incubados com uma solução de *P. gingivalis*. Para o tratamento de descontaminação, as amostras foram divididas em 4 grupos:

- Grupo teste: Irradiação com laser Er: YAG 60 mJ,
- Grupo teste: jato de ar abrasivo,
- Grupo controle negativo: sem tratamento e,
- Grupo controle positivo: sem contaminação

Após a coleta dos resultados estes foram analisados estatisticamente pela teste Mann –Whitney U-test ($p < 0,005$). O uso do laser descontaminou todas as superfícies, sem alterá-las. Enquanto, que o jato de ar abrasivo foi efetivo na descontaminação da superfície, porém, com sua alteração.

- Aplicação da Terapia Fotodinâmica

A característica de colonização bacteriana de superfícies não descamativas da cavidade oral é associada à formação de um biofilme bacteriano, com a presença de microcolônias compostas por várias espécies microbianas (Costerton et al. (1999); Kumar et al. (2005); Sakamoto et al. (2005)).

Em Periodontia e Implantodontia, a remoção mecânica do biofilme bacteriano é o método mais frequentemente usado para o tratamento de doenças associadas à sua presença, pois o uso de agentes antimicrobianos apresenta limitações devido à característica estrutural do biofilme (Del Pozo & Patel (2007); Wilson (2004)). Como também, dependendo da característica do tratamento mecânico utilizado, isto pode tornar a superfície do implante mais rugosa, o que favorece a colonização bacteriana (Duarte et al. (2009)).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido sugerida como uma alternativa ao uso de agentes antimicrobianos para eliminar espécies bacterianas subgengivais no tratamento da periodontite (Wilson (1993)), como também nos casos de peri-implantite (Kreislner et al. (2002); Hayek et al. (2005)).

TFD se baseia no conceito de que agentes fotossensibilizadores não tóxicos estariam localizados em certos tecidos, e seriam ativados por uma luz com comprimento de onda adequado, que gera oxigênio singleto e radicais livres, os quais são citotóxicos para as células de determinado tecido alvo (Zanin et al. (2003); Wood et al. (2006)).

Vários estudos demonstraram que bactérias orais são susceptíveis a TFD em culturas planctônicas (Wilson & Dobson (1993); Soukos et al. (1998)) e em placas (Williams et al. (2003); Sarkar (1993)). Estudos recentes relataram

que em áreas em que as células bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguinis*, estavam organizadas em biofilme e foram sensibilizadas com o fotossensibilizador azul de toluidina e aplicada a TFD, o seu número reduziu cerca de 10 vezes (Zanin et al. (2006)).

Pinheiro et al. (2010) avaliaram em um estudo clínico a capacidade da terapia fotodinâmica em reduzir a quantidade de bactérias viáveis na região subgengival. Amostras microbiológicas foram coletadas antes e após a desorganização mecânica do biofilme e após a aplicação da TFD. A TFD foi realizada por meio da inserção do fotossensibilizador azul de toluidina na área subgengival por 3 minutos, seguido da aplicação do laser diodo de baixa intensidade com dose de 4 J/cm². Os resultados foram submetidos a análise estatística descritiva e pelo teste t. Após a instrumentação mecânica, a redução bacteriana foi de 81.24%, sendo que após a aplicação da TFD a redução chegou a 95.90%, apresentando significância estatística (p<0.01). Estes resultados sugerem que a TFP pode ser aplicada como um tratamento auxiliar à instrumentação mecânica para reduzir o número de bactérias viáveis na região subgengival.

Hayek et al. (2005) realizaram um estudo *in vivo* em cães. Após a extração de 83 prés-molares, foram instalados implantes. Após a osseointegração, peri-implantite foi induzida por ligadura, por um período de 8 meses. Os microorganismos *Prevotella sp*, *Fusobacterium sp*, *S. beta-haemolyticus* estavam presentes nas faces em que a peri-implantite foi desenvolvida. A partir daí os animais foram divididos nos seguintes grupos para tratamento:

- Grupo controle: elevação de retalho mucoperiósteo, instrumentação com cureta plástica e irrigação com clorexidina

- Grupo teste: elevação de retalho mucoperiósteo, com aplicação do laser fotossensibilizador azuleno associado ao laser de baixa intensidade GaAIAS (660 nm , Potência de 40 mW, Energia de 7,2 Joules por 3 minutos). Pela análise microbiológica os resultados revelaram que não houve diferenças entre os grupos sugerindo, a possibilidade do uso da terapia fotodinâmica como um método não invasivo para redução de microorganismos na superfície de implante.

Devido à falha na ação de antimicrobianos em biofilmes que não foram previamente desorganizados, a TFD pode ser usada como uma terapia promissora segundo o resultado de alguns estudos. Wood et al. (2006)) trataram biofilmes bacterianos de diferentes idades com eritrosina, azul de metileno e fotofirina associados à aplicação de laser. Os resultados demonstraram a morte bacteriana em 90% a 99,9% das amostras. Os biofilmes jovens foram caracterizados como menos susceptíveis ao tratamento do que biofilmes mais velhos. Isto estaria relacionado à estrutura mais aberta do biofilme jovem e seu alto estado metabólico comparado aos biofilmes mais velhos. Esta característica sugere que a forma de tratamento seria promissora para biofilmes mais velhos, pois tipicamente respondem menos a outras formas de tratamento.

Bactérias estariam presentes na cavidade oral na forma planctônica (isolada), ou organizadas em biofilmes. Estudos demonstraram que a ação de agentes antimicrobianos é ineficaz quando as bactérias encontram-se organizadas em biofilmes. Fontana et al. (2009) avaliaram a efetividade da

terapia fotodinâmica sobre bactérias organizadas em biofilmes comparada à ação em bactérias encontradas na forma planctônica. Amostras da placa dental foram obtidas de 10 voluntários diagnosticados com periodontite crônica. A suspensão dos microrganismos da placa de 5 voluntários foi sensibilizada com 25 µg/ml de azul de metileno por 5 minutos, seguidos da aplicação de luz vermelha. Multiespécies microbianas estruturadas em biofilme a partir da amostra da placa destes 5 voluntários foram sensibilizadas com 25 µg/ml de azul de metileno por 5 minutos seguida da aplicação de luz vermelha.

Em uma segunda parte do estudo, as multiespécies bacterianas estruturadas em biofilme foram sensibilizadas com 50 µg/ml de azul de metileno por 5 minutos seguida da aplicação de luz vermelha. Após a aplicação da TFD, as unidades formadoras de colônia foram contadas para estabelecer a eficácia dos tratamentos (Fontana et al. (2009)).

Em suspensão, a TFD produziu aproximadamente 63% da morte das bactérias em sua forma isolada, planctônica. Enquanto, para as bactérias organizadas em biofilme ocorreu redução de microrganismo em uma escala bem menor, cerca de 32% das formas viáveis (Fontana et al. (2009)).

Portanto, com os resultados deste estudo se conclui que os microrganismos organizados em biofilme são menos afetados pela TFD do que os microrganismos encontrados em sua fase planctônica. O efeito antibacteriano da TFD foi reduzido em bactérias organizadas em biofilme, mas, pode ser considerado superior ao tratamento com antibióticos quando aplicado em condições semelhantes (Fontana et al. (2009)).

2.4) Uso do aloe vera em Odontologia

Desde a civilização egípcia até os dias atuais, os produtos naturais são fontes medicinais importantes e base para descoberta de novos fármacos. Sugeriu-se o desenvolvimento de estudos científicos e clínicos sobre tais produtos, em especial os fitoterápicos, possibilitando sua utilização pela população com segurança (Barne (2006)).

O aloe vera é da família das liliáceas, popularmente conhecida no Brasil como babosa. A denominação ocorre por causa da existência de um gel mucilaginoso no interior da folha, frequentemente utilizado em diversas áreas, como produtos alimentícios, cosméticos e na área da saúde (Reynolds & Dweck (1999)).

Esse gel é formado por componentes potencialmente ativos, como aminoácidos, açúcares, enzimas, vitaminas e minerais, os quais proporcionam propriedades importantes como penetração em tecidos, efeito anti-inflamatório, função imunorreguladora e propriedades antimicrobianas (Reynolds & Dweck (1999)).

De acordo com Barreto et al. (2005), o gel mucilaginoso do aloe vera contém aloferon, que auxilia na reparação tecidual; acemannan que é um mucopolissacarídeo com ação antiviral, antifúngica e antimicrobiana; possui capacidade de ativar o sistema imunológico e estimular a produção de anticorpos; também contém antraquinona, que é antisséptico.

A proposta para o uso do Aloe vera em Odontologia tem sido relacionada à sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória (Semenoff et al. (2008); Rieger & Carson (2002))

3) Proposição:

Comparar *in vitro* a capacidade de redução microbiana nas superfícies maquinadas de discos de titânio após diferentes tratamentos envolvendo:

- Irrigação com digluconato de clorexidina a 0,2%;
- Irrigação com enxaguatório de Aloe vera;
- Aplicação de irradiação com aparelho laser diodo semiconductor associada a um fotossensibilizador para realizar a terapia fotodinâmica.

4) Material e Métodos:

4.1) Discos de titânio

Foram utilizados 56 discos feitos de titânio puro (titânio grau 4) com espessura de 1 mm e diâmetro de 8 mm, com superfície maquinada (Figura 1), com média de rugosidade de $0,33 \mu\text{m}$.

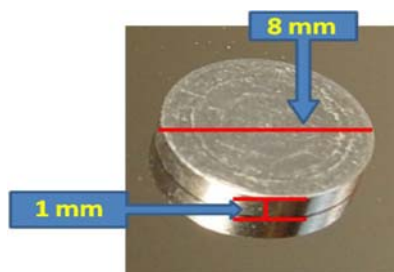


Figura 1. Característica dos discos de titânio utilizados no estudo

O valor da rugosidade da superfície dos discos de titânio foi obtido com o uso de um aparelho rugosímetro (Handsurf- Modelo E-35A, Seimitsu Tokyo, Japão) (Figura 2). Após avaliar 3 medidas da rugosidade de cada disco, fez-se a média para caracterizar a rugosidade da superfície dos discos de titânio com superfície maquinada usados neste estudo.



Figura 2. Rugosímetro usado na análise das superfícies dos discos.

Para o estudo, os discos foram esterilizados em autoclave (Vitale, 12L, Cristófoli Equipamentos de Biossegurança Ltda, Campo Mourão, PR, Brasil).

4.2) Local para a realização do estudo:

Todas as fases relacionadas ao cultivo, incubação, colonização, tratamento e análise dos resultados pela contagem das unidades formadoras de colônia foram feitas no Laboratório de Extração de Princípios Ativos de Plantas Brasileiras da Universidade Paulista.

4.3) Cultura e incubação do microrganismo *Streptococcus sanguinis*:

A cepa liofilizada de *Streptococcus sanguinis* IAL 1832 foi obtida comercialmente (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil) e suspensa em meio BHI caldo em aerobiose por 48 horas, mantida em estufa a 37°C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, as células cultivadas foram enxaguadas com solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil). Para confecção da placa mãe fez-se a semeadura das células bacterianas em placa de Petri contendo o meio Ágar Sangue Colúmbia (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), mantidas em estufa a 37°C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil) em aerobiose por 48 horas (Figura 3) .



Figura 3. Características de obtenção da cepa liofilizada e da placa mãe obtida com o microrganismo *Streptococcus sanguinis*.

Após o período de 48 horas, fez-se a replicação das células bacterianas para utilizar colônias bacterianas frescas. As colônias de *Streptococcus sanguinis* foram coletadas da placa mãe, e novamente semeadas em aerobiose em placa de Petri com o meio Ágar Sangue Colúmbia (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), mantidas em estufa a 37°C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 48 horas.

Constatado o crescimento bacteriano após a replicação, células foram coletadas e dispensadas em um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil).

Em seguida, fez-se a contagem das células bacterianas viáveis pela aplicação do método utilizado por Kreisler et al. (2002), no qual se quantificou o número de células bacterianas presentes em suspensão com o uso da escala de densidade óptica Farland a 0,5 (Tubidometer, Oxoid, Hampshire, Reino Unido), sendo que para a inoculação bacteriana sobre a superfície dos discos, a concentração das células foi de $1,5 \times 10^8$ células/ml.

Para a obtenção desta concentração da suspensão de células bacterianas foram utilizados 9 ml de solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil), depositados em tubo de ensaio, seguidos do acréscimo de células bacterianas frescas obtidas a partir da placa replicada com uso de alça de platina. As bactérias foram acrescidas no tubo de ensaio contendo solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil) até alcançar a concentração 0,5 de McFarland (Figura 4).



Figura 4. Coleta de células bacterianas da placa de Petri, e confirmação da obtenção da concentração de células bacterianas pela escala de Farland.

Previamente a contaminação dos discos de titânio, a solução contendo as bactérias viáveis foi agitada em um agitador de tubos (AP56 Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) para que as células bacterianas fossem homogeneizadas.

4.4) Modelo de colonização:

A porção central do disco de titânio foi selecionada para contaminação em todos os grupos, seguida do seu espalhamento por toda a superfície. Os

discos foram contaminados com 10 µl obtidos a partir de uma micropipeta automática (Eppendorf Research, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5), mergulhada na suspensão de células bacterianas frescas de *Streptococcus sanguinis*, com concentração de $1,5 \times 10^8$ células/ml, que se encontrava em um tubo de ensaio contendo solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil). Seguindo as orientações de Kreisler et al. (2003), após a contaminação dos discos, estes foram levados novamente a estufa em aerobiose, a 37° C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil), por 1 hora, para propiciar o crescimento bacteriano.



Figura 5. Contaminação dos discos de titânio realizada em cada grupo.

4.5) Tratamentos:

Em seguida, para a contaminação dos discos de titânio com a suspensão de *Streptococcus sanguinis* (IAL 1832), estes foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos, com 8 discos de titânio por grupo:

- Grupo 1 (G1): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis*;

- Grupo 2 (G2): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* irrigadas com 10 ml da solução estéril de soro fisiológico (Laboratório Tayuyna Ltda, Nova Odessa, SP, Brasil), com uso de pipetadora automática (Easypet, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6).

A média do tempo de irrigação foi de 29,85 segundos para cada disco. Usou-se a irrigação com soro fisiológico para não mascarar a ação mecânica dos agentes usados para irrigação, no caso enxaguatório de aloe vera e enxaguatório de digluconato de clorexidina 0,2%.

- Grupo 3 (G3): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* tratadas com irrigação com 10 ml de enxaguatório de digluconato de clorexidina a 0,2%, com uso de pipetadora automática (Easypet, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6). A média do tempo de irrigação foi de 33,32 segundos para cada disco.

Foram obtidos 150 ml de enxaguatório de digluconato de clorexidina a 0,2% pela manipulação (Bioativa Farmácia de Manipulação, Araras, SP, Brasil) de digluconato de clorexidina a 0,2% em veículo qsp.

- Grupo 4 (G4): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* tratadas com irrigação com enxaguatório aloe vera, com uso de pipetadora automática (Easypet, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), com média do tempo de irrigação de 28,63 segundos para cada disco.

Foram obtidos 150 ml do enxaguatório de aloe vera pela manipulação (Bioativa Farmácia de Manipulação, Araras, SP, Brasil) de 99% de extrato de aloe vera estabilizado, associado a 0,2% de alantoína e 0,2% de metilparabeno

como conservante, segundo relatado por Rieger & Carson (2002). Utilizaram-se para irrigação 10 ml do enxaguatório (Figura 6).



Figura 6. Irrigação efetuada com 10 ml de soro fisiológico (Grupo G2), enxaguatório de digluconato de clorexidina a 0,2% (Grupo G3) e enxaguatório de aloe vera (Grupo G4).

- Grupo 5 (G5): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* tratadas com fotossensibilizador azul de metileno, com concentração de 0,005%, em solução aquosa (Chimiolux, Aptivalux, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Utilizaram-se 3ml do fotossensibilizador, sendo 2ml irrigado com seringa plástica descartável (BD Plastipak, Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sobre a superfície dos discos de titânio, em seguida, estes foram mergulhados em 1ml do fotossensibilizador nos poços de placas de cultura de células (92024, TPP, Switzerland), por 5 minutos (Figura 7).

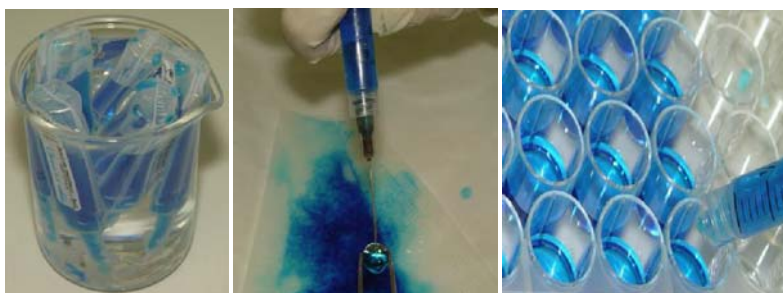


Figura 7. Característica de uso do fotossensibilizador azul de metileno.

- Grupo 6 (G6): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* tratadas com fotossensibilizador azul de metileno, com concentração de 0,005%, em solução aquosa (Chimiolux, Aptivalux, Belo Horizonte, MG, Brasil), associado ao laser diodo semiconductor InGaAlP (Twin Laser, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm.

As características de uso do aparelho foram de Potência de 40 mW, Tempo de irradiação de 3 minutos, Energia Total de 7,2 Joules (Hayek et al. (2005)), Irradiância de $0,08 \text{ W/cm}^2$, Dose de $14,4 \text{ J/cm}^2$.

Utilizaram-se 3ml do fotossensibilizador, sendo 2ml irrigado com seringa plástica descartável (BD Plastipak, Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sobre a superfície dos discos de titânio, em seguida, estes foram mergulhados em 1ml do fotossensibilizador nos poços de placas de cultura de células (92024, TPP, Switzerland), por 5 minutos (Figura 7).

Após, a ponta do aparelho foi posicionada no centro de cada disco, a uma distância de 5 mm a partir de sua superfície, realizando movimento circular em toda a sua extensão, caracterizando a aplicação por varredura,

durante 3 minutos. O feixe da luz laser foi posicionado perpendicularmente ao disco (Figura 8).

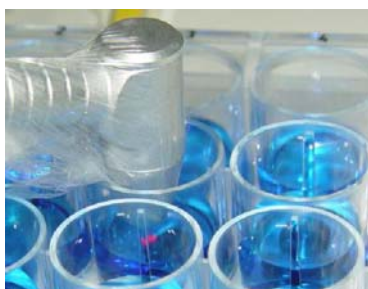


Figura 8. Aplicação da irradiação laser no grupo G6.

- Grupo 7 (G7): superfícies dos discos de titânio contaminadas com *Streptococcus sanguinis* tratadas com laser diodo semiconductor InGaAlP (Twin Laser, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm (Figura 9).



Figura 9. Aplicação da irradiação laser no grupo G7.

As características de uso do aparelho foram de Potência de 40 mW, Tempo de irradiação total 3 minutos, Energia Total de 7,2 Joules (Hayek et al. (2005)), Irradiância de $0,08 \text{ W/cm}^2$, Dose de $14,4 \text{ J/cm}^2$.

Posicionou-se a ponta do aparelho a partir do centro de cada disco a uma distância de 5 mm a partir de sua superfície, com movimento circular em toda a sua extensão, caracterizando a aplicação por varredura, durante 3 minutos. O feixe da luz laser foi posicionado perpendicularmente ao disco.

4.6) Avaliação dos resultados:

Após a execução dos tratamentos propostos, os discos de titânio foram dispostos em poços de placas de cultura de células (92024, TPP, Switzerland), contendo 3 ml de solução estéril de BHI, e mantidos em aerobiose a 37°C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 48 horas (Figura 10).

Após este período, as placas de cultura de células (92024, TPP, Switzerland) foram homogeneizadas em um agitador (Mini Orbital Shaker, Bellco Glan Inc, Vineland, NJ, USA) por 15 segundos na velocidade 4, cuja escala varia de 0 até 10. Em seguida, o conteúdo de cada poço das placas de cultura de células (92024, TPP, Switzerland) passou por uma série de 6 diluições, com porcentagem de cada diluição de 900 µl (Figura 10).



Figura 10. Discos de titânio dispostos em poços de placas de cultura com meio BHI, após 48 horas placas posicionadas no agitador, para efetuar as 6 diluições do conteúdo de cada poço.

Após efetuar as diluições, obteve-se 10µl dos poços que continham as diluições 4, 5, e 6 para semear em duplicata placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Sangue Colúmbia. As placas de Petri foram mantidas em aerobiose a 37°C (Estufa de cultura 502 – Oriom – Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 48 horas.

Para avaliar a efetividade dos tratamentos executados no estudo, isto é, se houve crescimento bacteriano semelhante ao grupo G1, sem tratamento, ou apenas redução da contaminação dos discos de titânio, ou ainda, se não ocorreu crescimento bacteriano algum, demonstrando total descontaminação; fez-se a contagem das unidades formadoras de colônia/ ml (ufc/ml) das placas de Petri que foram semeadas com a diluição 5 e atribuiu-se os escores:

0	ausência de colônias;
1	1 a 10 ufc/ml;
2	11 a 50 ufc/ml;
3	51 a 100 ufc/ml;
4	101 a 300 ufc/ml;
5	> 300 ufc/ml.

4.7) Análise estatística:

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal – Wallis. Este teste foi complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos ao nível de significância de 5%, feito

com o uso do programa Bioestat 5.0 (Bioestat, Belém, PA, Brasil) para Windows XP (Microsoft, Redmond, WA, USA).

A comparação dos grupos experimentais através de escores atribuídos ao número total de ufc/ml de cada grupo estimou a eficiência de cada tratamento para a redução ou eliminação completa da contaminação microbiana dos discos de titânio de superfície maquinada.

5) Resultados

Após a realização dos tratamentos, semeadura e incubação das placas de Petri contendo o meio Ágar Sangue Colúmbia, fez-se a contagem das unidades formadoras de colônia em cada grupo (Figura 10).



Grupo G1, onde não foi realizado tratamento.



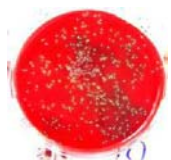
Grupo G2, irrigação com soro fisiológico.



Grupo G3, irrigação com enxaguatório de digluconato de clorexidina a 0,2%.



Grupo G4, irrigação com enxaguatório de aloe vera.



Grupo G5, aplicação apenas do fotossensibilizador.



Grupo G6, aplicação da terapia fotodinâmica.



Grupo G7, aplicação apenas da irradiação laser.

Figura 11. Características do crescimento microbiano em cada grupo.

Após a contagem das unidades formadoras de colônia e atribuição dos escores, observou-se variação nos valores distribuídos para cada grupo como se constata no Gráfico 1, que caracteriza os valores mínimo, máximo (max) e da mediana dos escores distribuídos para cada grupo.

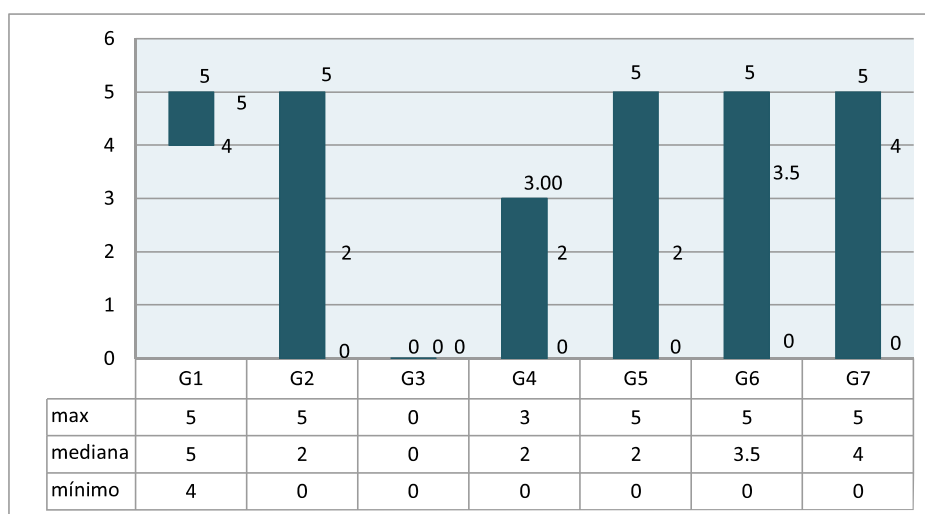


Gráfico 1. Característica da distribuição dos escores em cada grupo.

Em seguida, os grupos experimentais foram comparados, quanto aos escores atribuídos à quantidade de unidades formadoras de colônias presentes após a aplicação dos tratamentos propostos, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Este teste foi complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos ao nível de significância de 5%.

Observou-se a redução da contaminação dos discos de titânio em todos os grupos tratados comparados ao grupo G1, sendo que o teste de Kruskal-Wallis ressaltou diferença significativa entre os grupos, complementado pelo teste de Dunn ($p < 0,05$), como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1. Características dos escores das ufc, análise descritiva e resultado do teste estatístico de Dunn.

Grupo (G)	Escore das ufc			Média	Desvio Padrão	Dunn*
	Mediana	Mínimo	Máximo			
G1	5	4	5	4.81	± 0.40	a
G2	2	0	4	2.06	± 1.06	bc
G3	0	0	0	0	± 0	bd
G4	2	0	3	1.75	± 0.85	bc
G5	2	0	5	1.78	± 1.87	bce
G6	3.5	0	5	2.68	± 2.05	bce
G7	4	0	5	3.31	± 1.88	be

*No sentido vertical, letras minúsculas diferentes demonstram

significância estatística entre os grupos tratados e não tratado ($p < 0,05$).

No grupo G3 não houve crescimento bacteriano, o que caracterizou a efetiva descontaminação dos discos de titânio, comparado aos demais grupos tratados, conforme demonstrado pelo teste de Dunn ($p < 0.05$).

Enquanto, que os tratamentos realizados nos grupos G4 e G2, propiciaram redução da contaminação bacteriana, e apresentaram significância estatística em relação à redução da contaminação bacteriana apresentada pelo tratamento aplicado no grupo G7, conforme demonstrado pelo teste de Dunn ($p < 0.05$).

6) Discussão

A contaminação da superfície de implante é um dos principais obstáculos para sua manutenção a longo prazo. Esta condição tem levado a Implantodontia a pesquisar protocolos de descontaminação para a superfície de implante menos invasivos e que não alterem a sua superfície. Portanto, este estudo *in vitro* foi desenvolvido com o intuito de comparar a eficácia da descontaminação de superfícies maquinadas de disco de titânio após a aplicação de terapia fotodinâmica e uso de agentes para irrigação devido à falta de estudos que englobem e comparem essas formas de tratamento.

Neste experimento, a escolha da contaminação dos discos de titânio com a forma planctônica da espécie bacteriana *Streptococcus sanguinis* foi relacionada ao fato de ser considerado um dos primeiros microrganismos a colonizar as superfícies de esmalte e titânio na cavidade oral e por propiciar condições para a coagregação de bactérias patogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis* (Stinson et al. (1991); Heuer et al. (2007); Hauser-Gerspach et al. (2007); Bürgers et al. (2010)).

Em concordância com Kreisler et al. (2002), a contaminação com este tipo de microrganismo propicia o desenvolvimento de um experimento com metodologia simples e de fácil reprodução, por se tratar de bactéria gram-positiva anaeróbica facultativa (Teixeira et al. (2008)).

Ao comparar a metodologia empregada neste experimento com os demais estudos que avaliaram a aplicabilidade de diferentes tratamentos da superfície de discos de titânio contaminados com o microrganismo *Streptococcus sanguinis*, houve variação no tempo de contaminação dos discos de titânio. Silva et al. (2005), estabeleceram o tempo de contaminação

para os discos de titânio de 7 dias, enquanto Bürgers et al. (2010), estabeleceram o tempo de contaminação de 2 horas.

Em concordância com Gröbner-Schreiber et al. (2001); Kreisler et al. (2002), e Kreisler et al. (2003), o tempo de contaminação estabelecido para os discos de titânio no presente estudo foi de 1 hora. De acordo com os resultados observados no grupo que não recebeu tratamento, grupo G1, este tempo foi suficiente para a ocorrência da contaminação bacteriana.

O tempo de contaminação também é relacionado com a fase de desenvolvimento bacteriano, isto é, planctônica ou biofilme, como também à idade deste biofilme, cujas características diferem em relação à aderência microbiana à superfície, ao seu metabolismo, que determina maior ou menor acessibilidade dos microrganismos aos tratamentos aplicados (Zanin et al. (2006); Fontana et al. (2009)).

Segundo Dobson & Wilson (1992), para haver a formação de biofilme é necessária a incubação de 3 a 4 dias, portanto, no presente estudo a forma de trabalho com *Streptococcus sanguinis* pode ser caracterizada como planctônica, devido ao tempo de incubação de 1 hora sobre a superfície do disco de titânio.

Estudos anteriores demonstraram a possibilidade de eliminar bactérias na forma planctônica com a aplicação da terapia fotodinâmica (Gad et al. (2004); Bevilacqua et al. (2007); Goulart et al. (2010)). A terapia fotodinâmica é baseada na interação entre a aplicação de luz laser visível e um agente fotossensibilizador, que origina agentes citotóxicos relacionados à produção de moléculas de oxigênio na forma singlete e tripleto ou outras macromoléculas presentes no meio, que levam à destruição dos constituintes celulares,

semelhantes às organelas, proteínas, ácidos nucleicos, o que leva à morte celular (Peloi et al. (2008); Street et al. (2010)).

Segundo Araújo et al. (2009), o oxigênio é obtido a partir do meio para a ocorrência destas reações, enquanto Rosein et al. (2006) e Parise Jr & Busaid (2006) afirmaram que o uso de um fotossensibilizador composto por água leva à obtenção do oxigênio, o que permite a realização desses procedimentos *in vitro*. No presente estudo, o fotossensibilizador utilizado está em solução aquosa, que origina moléculas de oxigênio na forma singleto e tripleto quando associado à irradiação da luz laser.

Para muitas espécies de microrganismos que não conseguem absorver a luz visível, há necessidade do uso do fotossensibilizador, que possibilita a sensibilização da parede celular e penetração da luz laser na célula bacteriana (Dobson & Wilson (1992)). Nesta pesquisa, o grupo G7 recebeu, como forma de tratamento, apenas a irradiação laser, propiciando um dos piores escores na redução da contaminação microbiana dos discos de titânio. Isto pode estar relacionado a não formação de moléculas reativas de oxigênio pela ausência do fotossensibilizador.

O azul de metileno é um fotossensibilizador, que tem demonstrado atuar na destruição do DNA das células bacterianas, e menor ação em sua membrana celular. O tempo de contato do fotossensibilizador pode contribuir para a localização do azul de metileno no interior da célula, e influenciar a eficácia da fotodestruição celular (Usacheva et al. (2001); Bevilacqua et al. (2007)).

O tempo de contato utilizado neste estudo foi de 5 minutos, o qual coincide com o usado por Araújo et al. (2009) e Bevilacqua et al. (2007). A

associação do tempo de contato com as características de ação do azul de metileno podem ser considerados fatores que propiciaram a redução da contaminação microbiana no grupo G5, no qual foi aplicado apenas o fotossensibilizador, coincidindo com resultados encontrados por Dobson & Wilson (1992) e Bevilacqua et al. (2007).

Usacheva et al. (2001) afirmaram que o grau de fotodestruição é dependente do tipo de fotossensibilizador utilizado, sua concentração, o tipo bacteriano irradiado, a fluência e intensidade da luz laser aplicada. Segundo Street et al. (2010), a eficácia da terapia fotodinâmica *in vitro* é altamente dependente da dose aplicada, a taxa de morte microbiana reduz com menor dose de energia total.

As características de aplicação da terapia fotodinâmica feita no grupo G6 deste estudo possibilitou apenas a redução da contaminação bacteriana, já os resultados apontados por Bevilacqua et al. (2007) caracterizaram que o uso da terapia fotodinâmica propiciou tanto a redução quanto a eliminação da contaminação bacteriana.

Outra hipótese para a ocorrência apenas da redução da contaminação bacteriana e não de sua eliminação nos grupos G6 e G7 do presente estudo pode ser a interação entre a luz laser e a superfície do metal. Esta interação é determinada pela fluência de energia, o grau de sua absorção, condutividade térmica e composição do material. As características da capacidade de reflexão e o coeficiente de absorção de cada metal são semelhantes, sendo dependentes do comprimento de onda do laser. A capacidade de reflexão do titânio para a luz laser próxima ao infravermelho está entre 50% a 60%, sendo aumentada para 96% com 10^3 nm (Kreisler et al. (2003)).

O uso da luz laser no comprimento de onda de 660 nm sobre o disco de titânio nos grupos tratados com aplicação apenas do laser ou associado ao fotossensibilizador pode ter tido a sua efetividade comprometida, associada à característica de reflexão da luz sobre a superfície do metal, o que resultou em redução, mas não eliminação completa da contaminação bacteriana.

Segundo Stübinger et al. (2010), dentre as vantagens para o uso do laser diodo semiconductor está a terapia fotodinâmica, possibilitando ação antibacteriana, ausência da alteração de temperatura do implante e dos tecidos ao seu redor, embora, Street et al. (2010), relataram que com o uso de uma dose de energia de $9,4 \text{ J/cm}^2$ houve aumento de temperatura de até 3°C . No presente estudo, a dose de energia utilizada foi de $14,4 \text{ J/cm}^2$, portanto, a alteração da temperatura deve ser investigada em estudos posteriores, utilizando esta metodologia.

A literatura cita também que o uso do laser diodo semiconductor não gera alterações na superfície do titânio que propiciem o acúmulo bacteriano quando usado em comprimento de onda inferior a 810 nm e não associado à alta potência (Romanos et al. (2009)).

Segundo Bürgers et al. (2010), a aderência bacteriana em superfícies de titânio texturizadas, em estudos *in vitro* e *in vivo*, é primeiramente influenciada pela rugosidade da superfície, havendo menor importância para a energia livre de superfície. Em seu estudo, a superfície de titânio maquinada apresentava rugosidade de $0,15 \text{ }\mu\text{m}$, e propiciou menor acúmulo de *Streptococcus sanguinis*. Enquanto Silva et al. (2005), relataram o uso de superfícies de titânio maquinadas com rugosidade de $0,17 \text{ }\mu\text{m}$, que levou também ao menor acúmulo bacteriano.

Nesta pesquisa a média de rugosidade dos discos de titânio de superfície maquinada foi de 0,33 μm . Segundo Wennerberg et al. (2009), superfícies de titânio maquinadas com média de rugosidade \leq a 0,96 μm são consideradas lisas.

A característica da superfície maquinada dos discos de titânio associada à fase planctônica de crescimento em que a bactéria se encontrava neste estudo, pode ter favorecido a menor aderência bacteriana e propiciado a redução da contaminação dos discos de titânio com a irrigação de 10 ml de soro fisiológico feita como forma de tratamento no grupo G2. Estes resultados estão em concordância com Cousido et al. (2010), que citaram em seu estudo, a redução da contaminação bacteriana durante 30 segundos de irrigação com água estéril.

Dentre os agentes químicos com atividade antimicrobiana utilizados para irrigação, o digluconato de clorexidina está indicado devido a sua eficácia demonstrada através de sua aplicação em estudos *in vitro* e *in vivo* que enfatizaram sua ação antimicrobiana (Berchier et al. (2010)). Neste estudo, a irrigação com 10 ml de digluconato de clorexidina a 0,2% aplicada ao grupo G3, propiciou a completa eliminação da contaminação dos discos de titânio, sendo o tratamento mais eficaz empregado, em concordância com o resultados de Dennison et al. (1994) e Koslovsky et al. (2006).

No presente estudo, a superioridade do grupo tratado com irrigação de digluconato de clorexidina a 0,2%, grupo G3, em comparação ao grupo tratado apenas com a irradiação da luz laser, grupo G7, também é citada por Kreisler et al. (2003), que usaram irradiação da luz laser para descontaminação da superfície de titânio.

A eficácia do digluconato de clorexidina a 0,2% utilizado no presente estudo pode ser relacionada à sua substantividade, que segundo Cousido et al. (2010), em um estudo *in vivo*, usando 10ml deste produto para irrigação durante 30 segundos, sua substantividade foi mantida até 7 horas após o procedimento. Neste trabalho, o tempo de irrigação foi semelhante ao usado por Cousido et al. (2010), cerca de 33,32 segundos.

A irrigação com enxaguatório de aloe vera realizada como forma de tratamento no grupo G4 propiciou redução da contaminação bacteriana após a irrigação com 10 ml pelo tempo médio de 28,63 segundos, em concordância com os relatos de Mangelson et al. (1992), e Rieger & Carlson (2002).

Podendo ser considerado, o segundo melhor tratamento realizado ao observar as médias dos escores do grupo G4 comparando-os aos escores atribuídos aos demais grupos tratados. A eficácia antimicrobiana do aloe vera é relacionada à presença de antraquinona em sua composição, que em pequenas concentrações propicia esta ação (George et al. (2009)).

Novos estudos *in vitro* devem ser realizados seguindo esta linha de pesquisa, para avaliar a efetividade dos tratamentos empregados com variações nas características da superfície do disco de titânio a ser utilizado, na espécie bacteriana empregada e a sua fase de crescimento utilizada para a contaminação dos discos de titânio.

7) Conclusão:

Dentro dos limites deste estudo *in vitro*, pode-se afirmar que todos os tratamentos realizados possibilitaram a redução da contaminação microbiana por *Streptococcus sanguinis* da superfície maquinada dos discos de titânio, sendo que a irrigação com digluconato de clorexidina a 0,2% foi o tratamento mais eficaz por eliminar completamente a contaminação dos discos de titânio.

8) Referências:

Araújo PV, Teixeira KIR, Lanza LD, Cortes ME, Poletto LTA. *In vitro* lethal photosensitization of *S mutans* using methylene blue and toluidina blue O as photosensitizers. Acta Odontol Latinoam 2009; 22(2): 93-7.

Baldi D, Menini M, Pera F, Ravera G, Pera P. Plaque accumulation on exposed titanium surfaces and peri-implant tissue behavior. A preliminary 1-year clinical study. Int J Prosthodont 2009; 22(5): 447- 55.

Barne J. Pharmacovigilance of Herbal Medicines: Current state and future directions. Drug Saf 2006; 29: 341-70.

Barreto VL, Feitosa AMSCA, De Araújo TJ, Chagas FK, Costa LK. Acción antimicrobiana *in vitro* de dentífricos conteniendo fitoterápicos. Av Odontoestomatol. 2005; 21(4): 195-201.

Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of chlorhexidine mouthrinse compared with 0,2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. J Clin Periodontol 2010; 37: 829-39.

Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnara JR A, Teodoro GR, Zângaro RA, Pacheco MTT. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in planktonic culture. Photomed Laser Surg 2007; 25(6): 513-8.

Cavezzi Jr O, Biondi Filho O, Zanatto ARL, Fernandes PA, Gromatzki A, Bretz WA. Efeitos de bochecho de clorexidina na saúde gengival em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos. Rev Periodontia 1996; 5(3): 309-11.

Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. Clin Oral Impl Res 2010; 21:156–64

Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. Biofilm in implant infections: its production and regulation. Int J Artif Organs 2005; 28: 1062-68.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318–22.

Cousido MC, Carmona IT, Garcia-Caballero L, Limeres J, Diz P. In vivo substantivity of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. Clin Oral Invest 2010; 14: 397- 402.

Deppe H, Horch HH. Laser applications in oral surgery and implant dentistry. Lasers Med Sci 2007; 22(4): 217-21.

Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. Clin Pharmacol Ther 2007; 82: 204–9.

Dennison DK, Huerzeler MB, Quinones C, Cafesse RG. Contaminated implant surface: an *in vitro* comparison of implant surface coating and treatment modalities for descontamination. J Periodontol 1994; 65: 942-8.

De Souza SC, Junqueira JC, Balducci I. Photosensitization of different *Candida albicans* species by low power laser light. J Photochem Photobiol B 2006; 83: 34-8.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. Arch Oral Biol. 1992; 37(11): 883-7.

Drake DR, Paul J, Keller JC. Primary bacterial colonization of implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 226- 32.

Duarte PM, Reis AF, de Freitas PM, Ota-Tsuzuki C. Bacterial adhesion on smooth and rough titanium surfaces after treatment with different instruments. *J Periodontol* 2009; 80(11): 1824-32.

Ericsson I, Person LG, Berlundh T, Edlund T, Lindhe J. The effect of antimicrobial therapy on peri-implantitis lesions. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implant Res* 1996; 7: 320-8.

Fine DH, Furgang D, Lieb R, Korik I, Vincent JW, Barnett ML. Effect of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 444- 5.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque derived biofilms. *J Periodontol Res* 2009; 44 (6): 751-9.

Fox SC, Moriarty JD, Kusy RP. The effects of scaling a titanium implant surface with the metal and plastic instruments: An in vitro study. *J Periodontol* 1990; 61: 485-90.

Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. Clin Oral Implants Res 2007; 18: 501-8.

Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram positive pathogenic bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(6): 2173-8.

George D, Bhat SS, Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes. An in vitro study. Gen Dent 2009; 238-41.

Gröbner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H, Göbel UB. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. Clin Oral Impl Res 2001; 12: 543-51.

Grossman E, Reiter OP, Sturzenberger M et al. Six month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. J Periodontal Res 1986; 21(Suppl. 16): 33-43.

Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. Clin Oral Implants Res 1997; 8: 249-54

Hayek RRA, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista Sobrinho CA, Yamada Jr AM, Ribeiro MS. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and convencional therapy on microbial reduction in ligature-induced Peri-implantitis in dogs. J Periodontol 2005; 76: 1275-81.

Heuer W, Elter C, Demling A, Neumann A, Suerbaum S, Hannig M et al. Analysis of early biofilm formation on oral implants in man. J Oral Rehabil. 2007; 34(5): 377-82.

Hillman JD, Chen A, Duncan M, Lee SW. Evidence that L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency is lethal in *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1994; 62: 60—4.

Hojo K, Nagaoka S, Oshima T, Maeda N. Bacterial interacions in dental biofilm development. J Dent Res 2009; 88(11): 982-90.

Jones CG. Chlorexidine: Is it still the gold standard? Periodontol 2000 1997; 15: 55-62.

Kozlovsky A, Sintov A, Zubery Y, Tal H. Inhibition of plaque formation and gingivitis in beagle dogs by topical use of a degradable controlled-release system containing chlorhexidine. J Dent Res 1992; 71: 1577-81.

Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RBN. Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *J Periodontol* 2006; 77(7): 1194-200.

Kreisler M et al.. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with na Er :YAG laser and an air powder system. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 36–43.

Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Schoof J, Langnau E, Jansen B et al. Antimicrobial efficacy of semiconductor laser irradiation on implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(5): 706–11.

Kreisler M, Kohnen W, Marinello C, Götz H, Duschner H, Jansen B et al. Bactericidal effect of the Er: YAG laser on dental implant surfaces: an in vitro study. *J Periodontol* 2002; 73(11): 1292-8.

Kreisler M, Götz H, Duschner H, D'Hoedt B. Effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er: YAG, CO₂ and GAAIAs laser irradiation on surface properties of endosseous dental implant. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17(2): 202–11.

Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005; 187: 7193–203.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3944–55.

Lang NP, Brex M. Chlorexidine digluconate: An agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res* 1986; 21(Suppl.): 74-89

Lizarelli RFZ. Protocolos Clínicos Odontológicos. Uso do laser de baixa intensidade. 2^a ed., São Carlos, Bons Negócios Editora, 2002.

Mangelson ML, Carson RE, Uyeda GT, Moore TE, Cucchiara AJ. Effects of aloe vera irrigation on pathogenic microorganisms associated with moderate to advanced periodontitis. Master of Science Thesis. University of Oklahoma, 1992.

Marotti J, Pigozzo MN, Nakamae AEM, Tortamano Neto P, Laganá DC, Campos TN. Terapia fotodinâmica no tratamento da periimplantite. *Revista Implantnews* 2008; 5(4): 401-5.

Martin E. Lasers in dental implantology. *Dent Clin North Am*. 2004; 48(4): 999-1015.

Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol* 2000 1998; 17: 63-76.

Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. Plaque, bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and Listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 355- 61.

Parise Jr O, Buzaid AC. Terapia Fotodinâmica – uma nova opção no tratamento dos carcinomas superficiais de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2006; 35(2): 121-5.

Peloi LS, Soares RRS, Biondo CEG. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *J Biosci* 2008; 33: 231–7.

Pinheiro SL, Donegá JM, Seabra LMS, Adabo MD, Lopes T, do Carmo THD et al. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. *Lasers Med Sci* 2010; 25: 87–91

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 1 -19.

Reynolds T, Dweck AC. Aloe vera leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 3-37.

Rieger L, Carson RE. The clinical effects of saline and aloe vera rinses on periodontal surgical sites. *Okla Dent Assoc* 2002; 92(3): 40-3.

Rimondini L, Fare S, Brambilla E et al. The effect of surface roughness on early in vivo plaque colonization on titanium. *J Periodontol* 1997; 68: 556-62.

Romanos GE, Gutknecht N, Dieter S, Schwarz F, Crespi R, Sculean A. Laser wavelengths and oral implantology. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 961-70.

Ronsein GE, Miyamoto S, Bechara E, Di Mascio P, Martinez GR. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quim Nova* 2006; 29(3): 563-8.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res* 2005; 40: 277-85.

Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque samples from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993; 28: 204-10.

Semenoff TADV, Ferreira WRS, Semenoff-Segundo A, Biasoli ER. Efetividade in vitro de Aloe Vera in natura, gel de clorexidina a 0,12% e gel de clorexidina a 2% sobre *Enterococcus faecalis*. Rev. Odonto Cienc. 2008; 23(3): 283-6

Silva CHFP, Vidigal Jr GM, Uzeda M, Soares GA. Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguinis*: an *in vitro* study. Implant Dent 2005; 14(1): 88-93.

Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2595–601.

Spratt DA, Pratten J. Biofilms and the oral cavity. Rev Environ Science Biotech 2003; 2: 109-20.

Stinson MW, Safulko K, Levine MJ. Adherence of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* to *Streptococcus sanguis* in vitro. Infect Immun 1991; 59: 102-8.

Street CN, Pedigo L A, Loebel NG. Energy Dose Parameters Affect Antimicrobial Photodynamic Therapy–Mediated Eradication of Periopathogenic Biofilm and Planktonic Cultures. Photomed Laser Surg. 2010; 28(Suppl1): S61–S66.

Subramani K, Jung RE, Molemborg A, Hämmerle CHF. Biofilm on dental implants: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(4): 616-26.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15(5): 675–90.

Tagg JR, Dierksen KP. Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 217–23.

Teixeira LM, Merquior VLC, Trabulsi LR. *Streptococcus, Enterococcus* e gêneros relacionados, capítulo 22, p. 189 – 94. IN: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*, 5ª ed., São Paulo, Atheneu, 2008.

Ten Cate JM. Biofilm, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006; 94: 1-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001; 29(2): 165-73.

Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24: 63-74.

Whittaker CJ, Klien CM, Kolendrande PE. Mechanisms of adhesion of oral bacteria. *Annual Rev Microbiol* 1996; 50: 513-52.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2003; 37: 190–93.

Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 412–8

Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitisation of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 182–7.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 680–4.

Zanin ICJ, Brugnera Jr A, Zanin F, Gonçalves RB. Terapia Fotodinâmica na Odontologia (TFD). RGO 2003; 51(3): 179-82.

Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. Eur J Oral Sci 2006; 114: 64–9