FLÁVIA LUIZA RANCAN

Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de *S. gordonii* formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio

São Paulo

2017

FLÁVIA LUIZA RANCAN

Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de *S. gordonii* formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre

Área de concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Adde

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rancan, Flávia Luiza.
Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de S. gordonii formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio / Flávia Luiza Rancan; orientador: Carlos Alberto Adde -- São Paulo, 2017.
66 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão Corrigida.

1. Implante dentário. 2. Terapia fotodinâmica. 3. Periimplantite. 4. Descontaminação. 5. Curcumina. I. Adde, Carlos Alberto. II. Título.

Rancan FL. Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de *S. gordonii* formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio. – São Paulo – 2017 Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 13/03/2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

A todos os pesquisadores, meus irmãos, noivo e amigos, pelo tempo que que deixamos de estar juntos...

Aos meus pais, Alberto e Regina, a eles todos os créditos...

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos, concedido oportunidades e me mantido firme nesta jornada.

Aos meus pais, irmãos, avós, tios, noivo e amigos pelas mais diversas formas de amor.

A minha equipe de trabalho, sua organização tornou meu desafio de lidar com o tempo possível.

A Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Faculdade de Odontologia, sempre com admiração e respeito.

A CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa em forma de bolsa de estudos

Ao meu orientador Prof Dr. Carlos Alberto Adde que com muita simplicidade e amorosidade mostrou o melhor caminho.

Aos professores e funcionários da disciplina de Clínica Integrada do departamento de Estomatologia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Munhoes Romano, pelo bom humor, orientações, broncas, ensinamentos e pelo tempo dispendido neste período de aprendizado.

A Prof.ª Drª Marcia Pinto Alves Mayer, por ter me acolhido tão bem, incentivado, passado seus conhecimentos técnicos e científicos, mas principalmente pelo carinho e conselhos.

Aos meus colegas de pós-graduação que tornaram um período de longa dedicação em algo mais leve e divertido (Julia, Thais, Danielle, Lucas).

Ao colega Prof. Dr. Bruno Bueno que me ajudou em tantos questionamentos no laboratório.

Ao Leo Cruz, técnico do laboratório, que sempre com sorriso no rosto, me inseriu ao dia-a-dia do laboratório.

Ao Prof. Dr Mario Sergio Soares que idealizou o projeto e ao Prof. Dr Vanderley Salvador Bagnato da USP- São Carlos que tornou o projeto possível cedendo conhecimento, apoio científico e equipamentos.

A todos os colegas do laboratório de microbiologia oral do ICBII-USP, que dividiram comigo o espaço, dúvidas e tempo, madrugadas e fins de semanas.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram e me ajudaram a realizar este trabalho.

"É melhor tentar e falhar; que preocupar-se e ver a vida passar;
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."

Martin Luther King

RESUMO

Rancan FL. Efeito de terapia fotodinâmica utilizando curcumina como fotossensibilizante sobre o biofilme de *S. gordonii* formado sobre superfícies lisa e rugosa de titânio. Dissertação. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida

A prevenção das doenças periimplantares baseia-se em procedimentos de rotina na clínica, com a remoção mecânica do biofilme associada ou não de agentes antimicrobianos locais e sistêmicos. No entanto, o controle do biofilme oral sobre a superfície de implantes é dificultado particularmente sobre as superfícies rugosas do titânio, que apesar de facilitarem a osseointegração, também favorecem a formação do biofilme. **Objetivos:** Objetivou-se analisar in vitro o efeito da TFD (Terapia fotodinâmica) usando curcumina como fotossensibilizador sobre o biofilme formado na superfície de discos de titânio com superfície rugosa e lisa. **Material e Métodos**: Biofilme mono espécie de *Streptococus gordonii*, colonizador inicial do biofilme dental, foi formado em superfícies lisas (usinadas) e rugosas (tratadas) de discos de titânio por 72 horas. Os discos lisos e rugosos foram então distribuídos em 3 grupos: tratados por 5 minutos com curcumina (60µM), clorexidina 0,12% como controle positivo e solução de DMSO (dimetilsufóxido), etanol e água como controle negativo (veículo da curcumina). As amostras foram divididas em 2 sub-grupos: ativado por LED azul (455-492nm) por 7 minutos e não-ativado. A atividade metabólica do biofilme foi determinada pelo método de redução do Sal tetralisol XTT e os resultados analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados:** Na ausência de luz, apenas o tratamento com clorexidina promoveu redução microbiana (controle positivo). O tratamento com curcumina ativada pela luz azul reduziu o número de bactérias viáveis no biofilme em 71% nos discos lisos e em 77% nos rugosos, não havendo diferença estatística com o controlepositivo.**Conclusão:** Os dados in vitro indicam que TFD associada à curcumina tem atividade sobre biofilme microbiano, sugerindo seu potencial no controle do biofilme oral sobre a superfície de titânio, e que este efeito independe da topografia da superfície.

Palavras-Chaves: Implante dentário, Terapia Fotodinâmica, Periimplantite, Descontaminação, Curcumina

ABSTRACT

Rancan FL, Effect of photodynamic therapy using curcumin as a photosensitizer on the *S. gordonii* biofilm formed on smooth and rough surfaces of titanium. Dissertation. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida

Prevention of periimplant diseases is based on routine procedures in the clinic, with the mechanical removal of biofilm associated or not with local and systemic antimicrobial agents. However, the control of oral biofilm on the surface of implants is particularly difficult on the rough surfaces of titanium, which, although facilitating osseointegration, also favors biofilm formation. **Objectives**: The objective of this study was to analyze in vitro the effect of PDT using curcumin as a photosensitizer on the biofilm formed on the surface of titanium discs with a rough and smooth surface. **Material and Methods**: Biofilm mono species of *Streptococus gordonii,* initial colonizer of the dental biofilm, was formed on smooth (machined) and rough (treated) surfaces of titanium discs for 72 hours. The smooth and rough discs were then divided into 3 groups: treated for 5 minutes with curcumin (60 μM), 0.1% chlorhexidine as a positive control and DMSO, ethanol and water solution as a negative control. The samples were divided into 2 subgroups: activated by blue LED (455-492nm) for 7 minutes and non-activated. The metabolic activity of the biofilm was determined by the reduction XTT salt method and the results analyzed statistically by ANOVA followed by the Tukey's test ($p < 0.05$) **Results:** In the absence of light, only the chlorhexidine treatment promoted microbial reduction (positive control). The blue light-activated curcumin treatment reduced the number of viable bacteria in the biofilm in 71% in the smooth discs and in 77% in the wrinkles, and there was no statistical difference with the positive control. **Conclusion:** In vitro data indicate that PDT associated with curcumin has activity on microbial biofilm, suggesting its potential in the control of oral biofilm on the titanium surface, and that this effect is independent of surface topography.

Keywords: Dental Implant, Photodynamic Therapy, Periimplantitis, Decontamination, Curcumin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 4.1-Divisão dos grupos experimentais.....42

Figura 4.1-Placas de 24 e 96 poços no dia do experimento 41

Figura 4.2-Placa com 2 discos de titânio em cada poço com caldo 43

Figura 4.3-Dissolução da Curcumina com gral e pistilo de vidro.....44

Figura 4.4-Biotable ligado com a placa de 24 poços.....44

Figura 4.5-Placa contendo xtt nos poços para leitura em ELISA 44

Gráfico 5.1-Média da atividade metabólica de *S. gordonii* em discos lisos 46

Gráfico 5.2-Média da atividade metabólica de *S. gordonii* em discos rugosos.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-Média da leitura de xtt em DO 490NM dos discos lisos..... 45

Tabela 5.2-Média da leitura de xtt em DO 490NM dos discos rugosos 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	terapia fotodinâmica
XTT	2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-5-[(phenylamino)carbonyl] -2H -tetrazolium-hydroxide
LED	Light Emiting Diodo
C	celsius
cm	centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	grama
J	Jaules
L	litro
µL	microlitro
µMol	microMol
mg	miligrama
mm	milímetro
mM	miliMol
mW	miliwatts
min	minuto
nm	nanômetro
P	porcentagem
PBS	Phosphate Buffer Saline
RCT	Randomized Clinical Trial
s	segundo
PR	potência real
ΔP	irradiância
ΔE	densidade de energia
t	tempo de aplicação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DE LITERATURA 25
2.1 Doenças periimplantares 25
2.2 Tratamento da doença periimplantar 29
2.3 Terapia fotodinâmica (TFD) 31
2.4 Curcumina 34
3 PROPOSIÇÃO. 37
3.1 Objetivo específico 37
4 MATERIAL E MÉTODOS 39
4.1 Desenho experimental 39
4.2 Cepas bacterianas e condições de cultura 39
4.3 Obtenção dos discos de titânio 40
4.4 Solução fotossensibilizante 40
4.5 LED de comprimento de onda azul 40
4.6 Ensaio de formação de biofilme 40
4.7 Grupos de tratamento 41
4.8 Determinação da atividade metabólica nos filmes 43
5 RESULTADOS 45
6 DISCUSSÃO 47
7 CONCLUSÃO 53
REFERÊNCIAS 55
APÊNDICES 63

1 INTRODUÇÃO

A implantodontia contemporânea proporciona grandes benefícios e possibilidades terapêuticas, assim como o surgimento de novos desafios com o aumento da prevalência de doenças nos tecidos periimplantares (Mombelli, 2012).

O *Sixth European Workshop in Periodontics* realizado em 2008 ajudou a definir conhecimentos e conceitos importantes a respeito das doenças periimplantares, e evidenciou dados de alguma forma preocupantes, como a taxa de incidência de mucosites em torno de 80% dos pacientes e em 50% dos implantes; e periimplantite observada em 28-56% dos pacientes e 12-43% dos implantes. (Lindhe; Meyle, 2008).

Os biofilmes orais formados sobre mucosas são geralmente controlados pela descamação epitelial. No entanto os mecanismos de imunidade inata não são tão efetivos contra os biofilmes formados sobre superfícies não descamativas, como dos dentes e outras superfícies duras, materiais restauradores ou implantes. Assim, medidas de higiene oral como a escovação e o uso de fio dental são necessárias para a sua remoção periódica, entretanto, mesmo em indivíduos com boa higiene oral, existem áreas mais protegidas das forças de abrasão, em que as comunidades microbianas se acumulam e podem sofrer alterações, levando ao desenvolvimento de doenças como cárie, doenças periodontais e doenças periimplantares (Jakubovics et al., 2015).

Os biofilmes polimicrobianos são definidos como uma coleção variada de organismos (fungos, bactérias e vírus) que existem numa fase ou numa interface densa e são revestidas numa matriz hidratada derivada do hospedeiro ou dela mesma, consistindo frequentemente em polissacarídeo (Ng et al., 2016).

Assim como as doenças periodontais, as doenças periimplantares são doenças inflamatórias em resposta ao biofilme em desequilíbrio. O controle do biofilme sobre as superfícies duras, sejam elas naturais como as superfícies dos dentes ou não naturais, como superfícies de materiais restauradores ou de implantes, é essencial para a prevenção e controle destas doenças (Dewhirst et al., 2010).

O biofilme formado sobre superfícies duras da cavidade oral é iniciado pela colonização nas primeiras horas por microrganismos pioneiros, principalmente representados por espécies de Streptococcos. Nesta fase, outros gêneros presentes são *Actinomyces, Gemella, Neisseria e Veillonella*. A seguir, o equilíbrio entre os colonizadores iniciais se altera, e os *Streptococcus spp*. se multiplicam mais rapidamente, resultando em declínio gradual na proporção de *Actinomyces spp*. no biofilme em aproximadamente 48 h. Entre 18 h e 4 dias, os colonizadores iniciais continuam predominando, mas a diversidade microbiana aumenta, com aumento do número e proporção de organismos dos gêneros *Porphyromonas, Fusobacterium, Prevotella, Veillonella e Capnocytophaga* (Jakubovics et a., 2015).

Streptococcus gordonii é uma das bactérias colonizadoras que inicia a formação de placas. Sua capacidade de interagir *e ser reconhecida pela P. gingivalis* é considerada importante para a colonização da bolsa periodontal pela mesma *P. gingivalis* (Ng et al., 2016). Com o decorrer do tempo, o biofilme pode sofrer alterações que resultam em um desequílibrio microbiano, associado a diferentes doenças associadas ao biofilme oral.

Assim como na periodontite crônica, as bactérias anaeróbicas Gram negativas estão mais envolvidas, sendo frequentemente identificadas a *Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Capnpcytophaga, Campylobacter rectus e Actinobacillus actinomycetencomitans* (Mombelli et al., 1987).

A condição fundamental para o sucesso no tratamento das doenças periimplantares, é a descontaminação da superfície do implante. Entretanto, devido ao aumento da rugosidade como consequência das modificações da superfície para maior qualidade da osseointegração e a presença de fortes ligações protéicas e aminoácidos, a descontaminação tornou-se mais difícil (Buser et al., 2004).

Em relação ao uso de antimicrobianos, alguns aspectos referentes ao acesso de agentes tópicos ao biofilme, além da possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana (Sreenivasan; Gaffar, 2002) e o risco de superinfecção (Verdugo et al., 2016), justificam o estudo de estratégias alternativas para controlar e tratar a doença periodontal e periimplantar.

A Terapia Fotodinâmica se encaixa como uma terapia alternativa, e tem sido apontada como um método promissor, devido principalmente a sua ação seletiva, por não afetar as células sadias (Hayek et al., 2005).

Nesta terapia, os agentes fotossensibilizadores desempenham grande importância na sua eficácia. Na odontologia, existem muitos estudos sobre a eficácia de diversos agentes como o azul de metileno, azul de toluidina, as clorinas e ainda foi possível observar evidências de que a curcumina pode ser capaz de controlar a atividade microbiana quando iluminada com comprimento de onda específico. (Araújo et al., 2014). Apesar de existir um número crescente de publicações sobre o efeito da TFD utilizando curcumina como fotossensibilizante na redução bacteriana (Hayek et al., 2005; Dovigo et al., 2011; Leite et al., 2014), ainda não há estudo do uso da mesma para o tratamento/prevenção da doença periimplantar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças periimplantares

O termo periimplantite foi introduzido para descrever condições infecciosas em torno dos implantes (Mombelli et al., 1987). No primeiro workshop sobre periodontia, em 1993, foi acordado que este nome deveria ser usado para processos inflamatórios destrutivos em torno de implantes osseointegrados em função, levando a formação de bolsas periimplantares e a perda de osso (Albrektsson et al.; 1994).

O termo mucosite periimplantar é atribuído quando se observa inflamação dos tecidos moles sem perda de tecido ósseo maior que a atribuível ao processo de remodelação. Outros sinais, como sangramento após sondagem suave com instrumento contundente, supuração da bolsa, edema, vermelhidão dos tecidos, podem ou não se manifestarem, e não há geralmente presença de dor. O termo periimplantite é utilizado quando ocorre perda óssea ao redor do implante. O defeito ósseo típico é circunferencial em torno do implante, e é bem demarcado. Esta destruição óssea pode prosseguir sem sinais notáveis de mobilidade dos implantes. (Mombelli et al., 1987; Mombelli; Lang, 1998).

A perda do implante é considerada precoce quando ocorre até um ano após a inserção, ou tardia, quando ocorre após esse período (Mombelli, et al.2011).

A etiologia da periimplantite é multifatorial e bem complexa, e alguns indivíduos parecem ser mais suscetíveis (Tonetti et al., 2015). Alguns fatores de risco estão relacionados com o insucesso dos implantes e ao desenvolvimento de doenças periimplantares, como o fumo (com risco significativamente maior de complicações na presença de uma lesão de polimorfismo combinado de genótipo de IL-1 positiva), histórico de periodontite, falta de colaboração e higiene oral limitada, doenças sistêmicas (por exemplo, diabetes mellitus mal controlada, doença cardiovascular, imunossupressão), causas iatrogênicas (por exemplo, "cementitis"), defeitos nos tecidos moles ou tecidos moles de má qualidade na área de implantação (por exemplo, falta de gengiva queratinizada) (Zitzmann et al., 2006; Smeets et al., 2014; Tonett et al., 2015).

Outros fatores adicionais podem ser considerados, como sobrecarga do implante, falhas nos materiais e técnicas, má qualidade óssea na área do implante, doenças sistêmicas e terapias medicamentosas que inibem modulações ósseas (Zitzmann et al., 2006; Smeets et al., 2014)

A avaliação de saúde dos tecidos periimplantares (mucosa e osso) e a intervenção preventiva devem ser realizadas com um prazo máximo de 6 meses de intervalo (Slots; Jorgensen; 2000; Salvi,; Lang 2004; Patel, 2014; Tonetti et al., 2015). Se existir evidência de perda óssea progressiva, é importante determinar se a causa é sobrecarga oclusal ou inflamação induzida pelo biofilme, e no caso de qualquer sobrecarga oclusal, precisa ser corrigida (Patel, 2014).

Existem alguns estudos em seres humanos e animais, que sugerem evidências de que o fator etiológico primário na inflamação periimplante é o acúmulo do biofilme em torno das margens da mucosa dos implantes (Berghlundh et al., 1992; Ericsson et al., 1996), como é o caso da gengivite de dentes naturais. Para confirmar a etiologia relacionada ao biofilme da inflamação periimplante, diversos estudos têm demonstrado que após a remoção do biofilme evidencia-se a resolução da mucosite periimplantar (Berghlundh et al., 1992; Ericsson et al., 1996; Zitzmann et al., 2002; Lang et al., 2011).

Os biofilmes que colonizam as superfícies dos dentes estão entre os mais variados e complexos que existem na natureza. Evidências mostram que células em biofilmes estão em um estado fisiológico que difere das partes planctônicas e tendem a ser menos susceptíveis a agentes antimicrobianos (Batchelor et al., 1997).

O biofilme oral é constituído de 70 a 80% por microrganismos e 30% por elementos não microbianos, como por exemplo, polissacarídeos, mucina salivar, detritos alimentares, leucócitos, enzimas, sais minerais, proteínas e células epiteliais descamadas (Jorge, 1998). Localiza-se no sulco gengival ao redor de dentes e implantes, difere na composição supra e subgengival, com características predominantemente Gram positivas e Gram negativas, respectivamente.

A resposta do tecido à formação de placas foi estudada em cão (Berglundh et al., 1992). O infiltrado inflamatório emergente, como resultado da formação de biofilme, foi similar aos dentes e implantes adjacentes, indicando que a resposta

inicial na mucosa periimplante e em gengiva era igual. A presença de biofilme em implantes durante 6 meses induziu uma lesão inflamatória no tecido conjuntivo do periimplante mucosa que foi dominada pelo plasma célular e linfócitos (Zitzmann et al., 2002).

A colonização bacteriana e maturação de biofilmes dependem de ambiente ecológico favorável, havendo mudanças na composição e comportamento da microbiota endógena que pode se tornar intolerável aos tecidos (Lindhe; Meyle; 2008).

O primeiro passo na formação de um biofilme é a ligação de um organismo a uma superfície sólida. No biofilme supragengival, a película adquirida que forma sobre uma superfície de dente limpo dentro de algumas horas é derivado a partir da saliva e fluido crevicular gengival (Socransky; Haffajee, 2002). Esta "película adquirida" fornece vários receptores para a ligação de bactérias orais, tais como as proteínas ácidas que se ligam a bactérias colonizadoras como a *Streptococcus gordonii*.

Os Estreptococos Viridans, que incluem *Streptococcus gordonii*, são bactérias pioneiras orais que iniciam a formação dos biofilmes dentários. As bactérias sésseis em um biofilme exibem um modo de crescimento que é distinto do de bactérias planctônicas, com mecanismos de adesão estreptocócica inicial (Loo et al., 2000). A *Porphyromonas gingivalis*, uma das bactérias presentes no biofilme associada a periimplantite depende de bactérias colonizadoras iniciais para se aderir à superficie.

Durante um período de observação de 10 anos num grupo de pacientes com periodontite, cepas bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans e Porphyromonas gingivalis* foram detectadas na mucosa oral dos pacientes (Zitzmann et al., 2006).

No caso de periodontite, as alterações podem se estender a tecidos mais profundos, sendo que o número de bactérias Gram-negativas pode aumentar para 70% do total da flora (Jorge, 1998), na maioria anaeróbias estritas ou facultativas (Slots; Jorgensen, 2000).

Li et al., 2004, em um estudo objetivando elucidar os primeiros colonizadores dentro do biofilme dentário in vivo e estabelecer mudanças populacionais potenciais que ocorrem durante as fases iniciais da formação do biofilme, mostraram que nos estágios muito iniciais, os colonizadores de dentes encontrados foram predominantes espécies de *Actinomyces.*; a proporção relativa de estreptococos, em particular *Streptococcus mitis e S. oralis*, aumentou à custa de espécies de *Actinomyces* entre 2 e 6 h enquanto o nível absoluto de *Actinomyces* permaneceu inalterado. Os agentes patogênicos periodontais, como *Tannerella forsythensis, Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, bem como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, estavam presentes em níveis extremamente baixos em todos os intervalos de tempo examinados neste grupo de indivíduos saudáveis. Assim, os deslocamentos populacionais bacterianos ocorrem nas primeiras horas de formação de biofilme e os primeiros colonizadores da superfície do dente consistem predominantemente em microrganismos benéficos.

Em um estudo para determinar a ordem de sucessão de espécies bacterianas na reorganização de biofilmes supra e subgengivais Teles et al. (2012) concluíram que imediatamente após a limpeza profissional, a constituição do biofilme supragengival em indivíduos com periodontite e em indivíduos saudáveis foram semelhantes. Após 1 dia, *Streptococcus mitis* e *Neisseri*a apresentaram proporções aumentadas, seguidas por *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens, Veillonella parvula e Streptococcus oralis* de 1 a 4 dias. De 4 a 7 dias, *Campylobacter recto, Campylobacter showae, Prevotella melaninogenica* e *Prevotella nigrescens* tornaram-se aumentados. A reconstrução da placa subgengival foi mais lenta e muito diferente da reconstrução da placa supragengival. As proporções aumentadas foram observadas pela primeira vez para *S. mitis*, seguida por *V. parvula e C. gingivalis* e, em 7 dias, por *Capnocytophaga sputigena* e *P. nigrescens*. Nenhum aumento significativo nas proporções de patógenos periodontais foi observado em nenhum dos grupos. (Teles et al., 2011)

As infecções associadas ao biofilme são notoriamente resistentes a agentes antimicrobianos, e vários fatores parecem contribuir para essa resistência, como a proteção por polímero extracelular, substâncias que conduzem ao agente

antimicrobiano para penetrar no biofilme e a adoção de um estado fisiológico ou fenótipo relacionado à natureza multicelular do biofilme (Hoyle; Coesterton, 1991; Mombelli et al., 2011).

Os biofilmes desempenham um papel importante na disseminação da resistência aos antibióticos. Dentro da população bacteriana densa, existe transferência horizontal eficiente de genes de resistência e virulência. (Mombelli et al., 2011)

Smeets et al. (2014), em uma revisão bibliográfica recente, concluíram que a microbiota associada com doença periimplante está misturada, bastante variável, e na maioria dos casos dominados por diversas bactérias anaeróbias Gram-negativas.

2.2 Tratamento da doença periimplantar

Dependendo da gravidade da doença (mucosite, periimplantite moderada ou grave), o tratamento de infecções periimplantes compreende abordagens conservadoras (não cirúrgicas) e cirúrgicas. As terapias conservadoras podem ser suficientes ou associadas ao tratamento cirúrgico quando necessário. (Lang et al., 2000; Smeets et al., 2014; Tonetti et al., 2015; Alshehri, 2016)

Ao monitorar os tecidos periimplantares nas consultas de revisão, que não devem ultrapassar 6 meses de intervalo, é essencial ser metódico, a fim de detectar os primeiros sinais de periimplantite (Patel, 2014).

Os tratamentos denominados “não cirúrgicos” incluem limpeza mecânica dos implantes com curetas de titânio ou plástico, ultra-sons ou polimento com ar. Além disso, a terapia antimicrobiana como a terapia fotodinâmica, bem como uso de outros agentes locais como o Gluconato de Clorexidina, peróxido de hidrogênio, percarbonato de sódio, povidona-iodo, podem estar associadas (Lang, 2000; Smeets et al., 2014; Patel, 2014).

A inflamação induzida por biofilme é usualmente tratada não cirurgicamente nos estágios iniciais, mas isso depende da apresentação clínica inicial. As lesões com uma profundidade de sondagem de 5mm ou mais e perda óssea maior que 2mm necessitaria de intervenção cirúrgica, conforme recomendado por Salvi e Lang (2004).

Ao remover o cálculo supragingival das coroas do implante, é importante não usar curetas de aço inoxidável porque elas vão danificar as superfícies de titânio. Recomenda-se um material que seja mais macio que o titânio, seja com curetas de ouro ou com instrumentos de plástico reforçado, carbono-teflon ou titânio. O uso de ultra-sons em torno dos implantes é controverso, pois com o resfriamento insuficiente existe o risco de aquecimento do implante, o que pode danificar a interface osso-implante (Patel, 2014).

A solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, embora muito utilizada, apresenta resultados ainda insatisfatórios. Ela combate, principalmente, bactérias Gram positivas (G+), sendo pouco eficaz contra Gram negativas (G-). Seu uso contínuo ou em concentrações mais elevadas pode levar a um aumento da resistência bacteriana, devido a adaptação fisiológica da parede celular para prevenir a entrada do biocida (Thomas et al., 2000).

O uso de antimicrobianos sistêmicos é indicado por muitos autores (Lindhe et al., 2008, Mombelli et al., 2011). Entretanto outros autores comentam a ocorrência *in vitro* da resistência de algumas bactérias responsáveis pela periimplantite aos antibióticos como clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou metronidazol. (Sreenivasan; Gaffar, 2002; Rams et al., 2014), além do risco de superinfecção bacteriana.

O debridamento do biofilme através de jatos de ar com pós abrasivos podem danificar a superfície dos implantes. Neste caso indica-se o pó de glicina como padrão usado em dispositivos de polimento de ar, para diminuir esse dano. (Drago, et al., 2014)

Os procedimentos cirúrgicos para tratamento da periimplantite incluem instrumentação com cirurgia de retalho aberto com debridamento mecânico da superfície do implante, condicionamento químico, além de processos regenerativos do osso, e antibiótico tópico (Mombelli; Lang, 1998; Lang et al., 2000; Persson, 2001; Lindhe; Meyle, 2008).

Para tratamento de periimplantite, além da terapia cirúrgica, pode ser utilizada terapia conservadora em adição a medicação e ao tratamento manual, com curetas, sistemas de polimento por ultrassons e por ar (Hayek et al., 2005; Smeets et al., 2014; Tonetti et al., 2015). Outras técnicas inovadoras tais como métodos de terapia suportados por laser e fotodinâmica são descritas como opções terapêuticas conservadoras.

2.3 Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD consiste na associação de um agente fotossensibilizante e uma fonte de luz objetivando-se a morte celular antimicrobiana e antitumoral. O mecanismo de ação acontece quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado. Na presença de um substrato, como o oxigênio ou a água, o agente fotossensibilizante transfere a energia ao substrato ao retornar para seu estado natural, formando espécies de vida curta e altamente reativas, como o oxigênio singleto, que pode provocar sérios danos a microrganismos via oxidação irreversível de componentes celulares. Vários autores relatam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular. A ação seletiva da TFD, por não afetar as células sadias, é uma das mais importantes características dessa terapia (Hayek et al., 2005).

A terapia fotodinâmica tem sido empregada nas diversas especialidades da Odontologia com o objetivo de redução bacteriana. A terapia fotodinâmica em bactérias orais começou a ser investigada mais profundamente a partir da década de 90, quando Dobson e Wilson (1992) e Wilson et al., (1993) demonstraram bons resultados em redução bacteriana utilizando o laser de Hélio-Neônio associado aos fotossensibilizadores azul de toluidina, azul de metileno, ftalocianina e

hematoporfirina. Foram testadas *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum e Porphyromonas gingivalis* recuperadas do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica. Os autores concluíram que a combinação laser e corante alcançou uma significativa redução bacteriana.

Mais de 400 substâncias são conhecidas como fotossensibilizantes, incluindo corantes, drogas, cosméticos e compostos naturais. Os fotossensibilizadores mais utilizados na redução microbiana em Odontologia são: azul de metileno, verde de malaquita, azul de orto-toluidina, cristal violeta, fitalocianinas, hematoporfirinas e protoporfirina (Wood et al., 2006).

Wilson et al. (1993) avaliaram a ação da terapia fotodinâmica em bactérias patogênicas variando o fotossensibilizador e microrganismos. Um dos fotossensibilizadores foi o AM (azul de metileno) utilizado geralmente em concentração de 25 µg/mL, que é geralmente utilizada. Na ausência de luz, e nesta concentração, não causou redução estatisticamente significante em nenhuma das bactérias testadas (Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans), porém, com a irradiação com laser de He-Ne, houve diferença significativa na redução dos microrganismos.

Yilmaz et al. (2002), em um estudo clínico, compararam a eficácia da TFD em relação ao tratamento convencional periodontal por raspagem e alisamento radicular. (685 nm, 30 mW, 1,6 J/cm² e azul de metileno a 0,05%); e concluíram que a TFD foi mais eficiente no tratamento da doença periodontal, quando aliada à técnica convencional.

Sculean et al., 2015 em uma avaliação de revisões sistemáticas sobre real benefício clínico da TFD afirmaram que em pacientes com periodontite crônica, a combinação de raspagem e alisamento de raiz (RACP) e FTD pode resultar em melhorias clínicas de curto prazo substancialmente mais elevadas. Em pacientes com periodontite agressiva, o uso de TFD não deve substituir a administração sistêmica de amoxicilina e metronidazol.

Hayek et al. (2005) compararam os efeitos da TFD com a terapia convencional (raspagem e irrigação com clorexidina a 0,12%) na redução

microbiana em periimplantite induzidas por ligadura em cães. Foi utilizado o laser de diodo de AsGaAl (660 nm), com potência de 49 mW, energia de 7,2 J por 3 minutos. Os autores concluíram que a TFD é um método não-invasivo, efetivo no tratamento da periimplantite comparado com a elevação mucoperiostal para raspagem da superfície do implante. O uso do azul de metileno como fotossensibilizador mostrou-se efetivo contra os microorganismos periimplantares e não comprometeu a superfície do implante e nem dos tecidos ao redor.

O azul de metileno a 0,01% foi utilizado em um estudo para avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica sobre as bactérias *P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia, A. actinomycetemcomitans e S. sanguis*. Foram utilizados dois lasers; He-Ne (632 nm, 30 mW) e diodo de AsGaAl (665 e 830 nm, 100 mW). O laser de He-Ne foi utilizado por 30 e 60 segundos, com fluências de 3,2 J/cm² e 6,4 J/cm², enquanto o laser de diodo, no mesmo tempo, gerou fluências de 10,6 J/cm² e 21,2 J/cm². Os resultados mostraram que a terapia foi tempo-dependente para ambos os sistemas de laser. O laser de diodo de 830nm, entretanto, foi o mais efetivo com exposição por 60s e fluência de 21,2 J/cm², promovendo a redução de 99 a 100% das bactérias P.*gingivalis, P.intermedia e S. sanguis*. Já para as espécies de *A. actinomycetemcomitans e F. nucleatum,* o tratamento pela TFD promoveu redução de 95 e 96%, respectivamente. Os autores relataram que somente o corante ou a luz, não tiveram nenhum efeito sobre a redução bactéria e que o corante não converteu a energia da irradiação em calor, comprovando a baixa toxicidade e confiabilidade da técnica (Chan; Lai, 2003).

O azul de metileno também foi utilizado por Gad et al. (2004) na TFD com laser de 665nm, 40J/cm², em colônias de *Staphylococcus epidermoides e S. aureus* com alterações na cápsula e na produção de exotoxinas.

Shibli et al. (2006) avaliaram o efeito da TFD na periimplantite induzida em cães sobre diferentes superfícies de implantes dentais. O grupo controle recebeu apenas o tratamento convencional, enquanto ao grupo teste foi acrescida à TFD com laser de diodo AsGaAl 830 nm, 50 mW, 80 s, 4 J/cm² e azul de orto-toluidina 100 µg/mL. Concluiu-se que a TFD aliada a terapia convencional apresentou uma melhor re-osseointegração dos implantes nas áreas adjacentes ao defeito induzido

da periimplantite, independente do tipo de superfície do implante, com a vantagem de não promover seleção de microorganismos resistentes e ser de fácil aplicação.

Marotti et al. (2013) avaliaram in vitro, a eficácia da TFD na descontaminação de superfície de implantes utilizando Laser de diodo e o azul de metileno como fotossensibilizante.

Schär et al. (2013) e Basseti et al. (2014) avaliaram TFD como alternativa potencial aos antibióticos locais em um estudo RCT (estudo clínico randomizado) comparando tratamento não-cirúrgico de periimplantites incipiente (Locais com Profundidade à sondagem de 4-6 mm, Sangramento à sondagem positivo e perda óssea radiográfica maior que 2 mm) por meio de debridamento mecânico seguido pelo uso de antibióticos locais (por exemplo, minociclina) ou a aplicação de TFD. Os resultados ao final de 6 meses e ao final de 1 ano não revelaram diferenças estatisticamente ou clinicamente significativas entre os 2 protocolos, sugerindo que a TFD pode representar uma alternativa valiosa aos antibióticos no tratamento não-cirúrgico de periimplantites incipiente.

2.4 Curcumina

A curcumina é um pigmento amarelo-alaranjado, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*, comumente usada como tempero na tradicional culinária asiática e na medicina chinesa, onde já foram comprovadas diversas outras propriedades farmacológicas, como antiinflamatórias, antitumorais, antifúngicas, antibacterianas e anticarcinogênicas (Sharma et al., 2005; Priyadarsini et al., 2009)

Algumas dessas propriedades são ampliadas após a ativação pela luz (Tonnesen et al., 1987; Koon et al., 2206). No caso da curcumina, a luz azul é uma opção interessante para sua fotoativação. A faixa azul do espectro de luz (455-492nm) é capaz de promover efetiva ativação da curcumina além de ser mais segura e estar numa faixa do espectro comumente utilizada nos consultórios odontológicos para fotopolimerização das resinas compostas, por meio do uso de aparelhos do tipo LED ou de luz halógena.

Priyadarsini (2009), estudando a ação antimicrobiana da curcumina, cita que ela é um potencial fotossensibilizador em TFD para infecções localizadas superficialmente. Neste estudo, foi mostrado que a curcumina, usada como fotossensibilizador em TFD, possui efeito antimicrobiano. Os efeitos tóxicos da curcumina associada a luz, contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, foram investigados em determinadas preparações aquosas. A curcumina também pode ser considerada um fotossensibilizador alternativo viável para inativação bacteriana na cavidade bucal. Estudos como de Haukivick et al. (2009) e Dahl et al. (1989) mostram que a curcumina é utilizada como medicamento anticancerígeno e tem mostrado ter efeitos antibacterianos com efeitos de toxicidade e foto toxicidade em bactérias.

Dovigo et al. (2011), trataram soluções de Candida albicans *in vitro* com nove concentrações de curcumina e exposição a diferentes parâmetros de luz LED azul. Foi observada neste estudo uma redução significante da viabilidade da Candida albicans após a terapia fotodinâmica, sendo o melhor tempo de pré-irradiação encontrado de 20 minutos e a melhor fluência de 18J/cm^2. Dovigo et al. (2011) também avaliou o efeito da curcumina como agente fotossensibilizador sobre outros tipo de Candidas, como *C. albicans, C. glabrata e C. tropicalis*, isolado como em biofilme, com resultados mostrando redução de 85%, 85% e 73% respectivamente, utilizando-se fluência de 18J/cm^2.

Araújo et al. (2012), avaliaram a descontaminação utilizando a curcumina como fotossensibilizador e luz azul (450nm), de toda a cavidade bucal, através da avaliação da flora salivar. Após a terapia fotodinâmica foi verificado que houve redução de 68% do total de bactérias. O mesmo autor também avaliou o efeito da curcumina sobre patógenos cariogênicos como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. Foi reportado redução de 99.9% de *S. mutans* utilizando-se curcumina na concentração de 1.5g/L e redução menor de até 37.6% para *L. acidophilus*. Ribeiro et al. (2013) avaliaram o efeito da curcumina como fotossensibilizador em *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. A concentração de 20µm foi capaz de resultar na morte da linhagem estudada. Paschoal et al. (2015) ,usando uma luz azul Emitting Diode (LED) para fotoativar a curcumina em contato com culturas planctônicas de *Streptococcus mutans* relataram uma redução de 70% na viabilidade bacteriana após a exposição à luz.

Leite et al. (2014), fizeram um ensaio clínico randomizado com três grupos de tratamento: (1) TFD, curcumina (30 mg / L) + luz azul (455 - 30 nm) 400mW com 5 min de aplicação, (2) o grupo apenas com a luz azul,e (3) o grupo apenas com curcumina. O grupo TFD mostrou uma redução microbiana em comparação com os grupos de luz e curcumina até 2 h após o tratamento.

Mahdi et al. (2015), estudaram efeito da TFD, in vitro, usando combinação de curcumina (60µM), H2O2 (0,3mM) e eritrosina (22µM) em cultura planctônica de *Porphyromona gingivallis* e *Fusobacterium nucleatum*, que são bactérias relacionadas à perda óssea periodontal e inflamação dos tecidos moles respectivamente. Os resultados mostraram que as três substâncias possuem efeito bactericida sem a presença de luz (60% de redução bacteriana após 5 minutos), porém com 5 minutos de ativação com luz azul (450nm), houve uma redução bacteriana de 100%.

Da Frota et al. (2015) estudando o efeito da TFD (20 µM de curcumina e 5 min de pré-irradiação) em canais de raízes de cachorros contaminados com *Enterococcus faecalis,* obtiveram resultado efetivo após irradiação por 5 minutos com luz azul (redução bacteriana de 41%), porém não encontraram resultado efetivo em 10 minutos de irradiação.

Hugar et al. (2016), mostraram redução significativa da inflamação gengival no 30º dia e 45º dia, maior redução na placa e redução de pontuação PPD (Profundidade de bolsa à sondagem) nos sítios experimentais (curcumina) sem a presença de luz, em relação ao grupo clorexidina.

3 PROPOSIÇÃO

Visando contribuir com o desenvolvimento de nova opção de terapia para o controle e prevenção da infecção em sítios peri implantares, o presente estudo tem como objetivo estudar *in vitro* o desempenho da terapia fotodinâmica (TFD) na redução do biofilme bacteriano sobre a superfície de titânio.

3.1 Objetivo específico

Determinar *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica associada a curcumina como fotossensibilizador sobre biofilme formado em superfícies de discos de titânio, por *Streptococcus gordonii*, um microrganismos associado a colonização inicial de superfícies duras na cavidade bucal.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

.

A avaliação microbiana foi realizada no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram desenvolvidos biofilmes monoespécie sobre discos de titânio com e sem tratamento superficial (rugoso e usinado) utilizando as cepas Streptococcus gordonii. Os biofilmes foram tratados com solução de Curcumina (60 µM), e submetidos a TFD. A atividade microbiana nos biofilmes foi determinada pelo método de XTT. Foram realizados 2 experimentos independentes, sendo cada experimento em triplicata, totalizando um n=6 para cada grupo para cada tipo de disco, rugoso ou usinado. (Quadro 4.1)

4.2 Cepas bacterianas e condições de cultura

Streptococcus gordonii de referência DL1 (Hsu et al., 1994)) foi utilizada. A cepa foi mantida em caldo BHI contendo 20% de glicerol em freezer a -80ºC.

A amostra foi cultivada em placas de ágar BHI sob atmosfera de microaerofilia, obtida em atmosfera contendo 10% CO_2, à 37ºC, por 48h. Após o desenvolvimento das colônias, estas foram transferidas para 8ml de caldo BHI (Marca) suplementado com 5mg/ml de hemina e 1 mg/ml de menadione, sacarose a 1% e extrato de levedura a 0,1% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Após incubação, em atmosfera de 85% N2, 10% CO2 e 5% H2 em câmara de anaerobiose (Plas Labs, EUA) por 16 horas, as culturas bacterianas foram ajustadas à DO_{660nm}~0,5 por mensuração em espectrofotômetro (Therma, EUA) e utilizadas para o preparo do inóculo no ensaio de formação de biofilme. (Figura 4.2)

4.3 Obtenção dos discos de titânio

Foram confeccionados discos de 5,9 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura, com a mesma barra de titânio utilizada para confecção de componentes protéticos, fornecidos pela empresa Dabi Atlante®, fabricante dos implantes PROSS®. Os discos lisos não receberam ataque ácido e os rugosos recebem um duplo ataque ácido por imersão.

4.4 Solução fotossensibilizante

Foi utilizada Solução Aquosa de Curcumina a 60µM, a partir da Curcumina em pó (PDT Pharma®). O pó de curcumina foi triturado em grau de porcelana e com auxílio de um pistilo, e utilizado para preparo da solução estoque de curcumina a 1,5g/L(40,7mM) que apresenta a seguinte composição: 0,15% de curcumina a 0,1% de DMSO dissolvidos em etanol 98%. A solução aquosa de curcumina 60µM foi preparada diluindo-se 0,74mL de solução estoque (à 1,5g/L) em 49,26 mL de água.

4.5 LED de comprimento de onda azul

Foi utilizado o protótipo Biotable de 24 ponteiras do Centro de Pesquisa em Ótica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Carlos, com 450nm de comprimento de onda e 30mW/s de potência por ponteira.

4.6 Ensaio de formação de biofilme

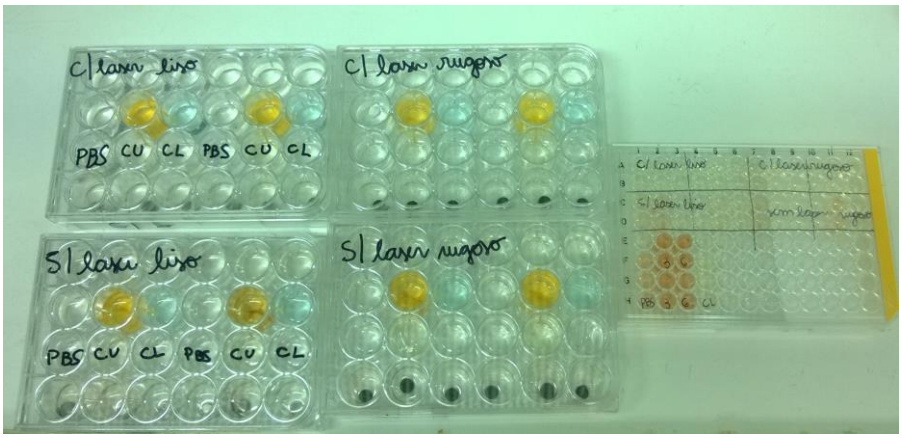
A cultura de *S. gordonii* ajustada a DO_{660nm} ~ 0,5 foi diluída 1:20 (correspondente a $5X10^6$UFC/ml) e alíquotas de 1,2mL adicionadas a poços de placas de 24 poços (Pro Lab, Brasil), contendo 2 discos de titânio cada poço e incubadas em anaerobiose (85% N_2, 10% CO_2 e 5% H_2) em câmara de anaerobiose,

a 37°C, durante 48 horas para a formação do biofilme. (Figura 4.2). Após 24 horas, 50% da cultura planctônica foi removida, e acrescido o mesmo volume de meio fresco. Após o período de incubação, os discos foram removidos com auxílio de pinça estéril, e lavados por três vezes, em 1,5mL PBS (phosphate buffer saline) para que as células bacterianas não aderidas fossem removidas.

4.7 Grupos de Tratamento

Após a lavagem, os discos lisos e rugosos, com biofilme pré-formado, foram transferidos individualmente em condições de assepsia, para outros poços (placas de 24 poços), e então submetidos aos diferentes tratamentos em 1,2 mL de solução de curcumina (60µM), 1,2 mL de gluconato de clorexidina 0,12% (Colgate®, Brasil) (controle positivo) ou 1,2 mL de solução de DMSO, etanol e água, nas mesmas concentrações da solução de curcumina (controle negativo). As amostras foram subdivididas em 2 grupos: ativado por LED azul (455-492nm) por 7 minutos e não-ativado por LED, em equipamento Biotable de 24 ponteiras, permanecendo todas nas mesmas condições de atmosfera, umidade e temperatura, porém com o equipamento de LED desligado (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Placas de 24 e 96 poços no dia do experimento



Fonte: o autor

Quadro 4.1 – Divisão dos grupos experimentais

L+ com LED ligado e Discos Lisos	**Tratamento utilizado**
L+ L n=3	Solução solvente da Curcumina
L+ L n=3	Solução de Curcumina
L+ L n=3	Gluconato de Clorexidina
L - LED desligado e Discos Lisos	**Tratamento utilizado**
L- L n=3	Solução solvente da Curcumina
L- L n=3	Solução de Curcumina
L- L n=3	Gluconato de Clorexidina
L + com LED ligado e Discos Rugosos	**Tratamento utilizado**
L+ R n=3	Solução solvente da Curcumina
L+ R n=3	Solução de Curcumina
L+ R n=3	Gluconato de Clorexidina
L - LED desligado e Discos Rugosos	**Tratamento utilizado**
L- R n=3	Solução solvente da Curcumina
L- R n=3	Solução de Curcumina
L- R n=3	Gluconato de Clorexidina
Total de Discos Lisos:	n=18
Total de Discos Rugosos:	n=18

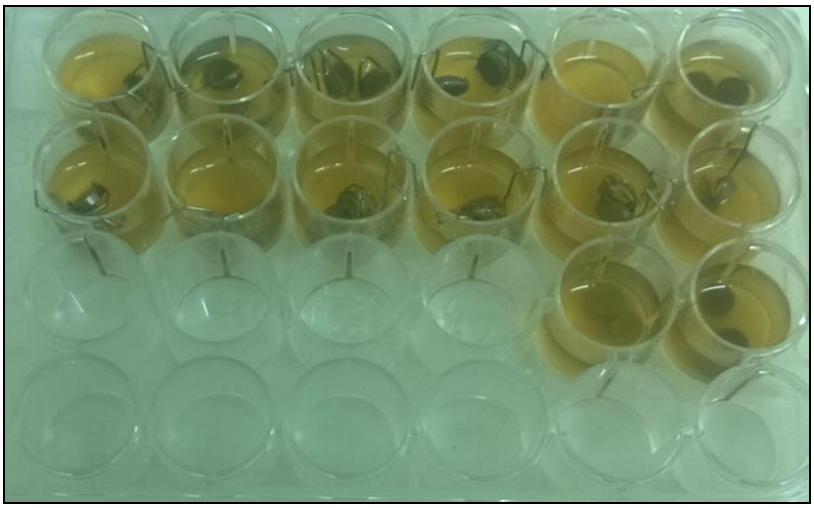
L+ = LED ligado, L- = LED desligado, n= quantidade de discos, L=Disco Liso R= Disco Rugoso

4.8 Determinação da atividade metabólica nos biofilmes

Após os tratamentos, os discos recobertos pelo biofilme tratados foram imediatamente lavados com PBS por 3 vezes para remoção das bactérias não aderidas. Alíquotas de 200 µl de solução aquosa de 0,1% de 2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide (XTT, Sigma) e 16 µL de solução de menadione (1 mM em acetona; Sigma) foram adicionadas a cada poço da microplaca contendo o disco de titânio (Figura 4.5). As placas foram então incubadas a 37°C por 3 horas, longe da luz ambiente, cobertas por papel alumínio.

A redução do XTT é um ensaio colorimétrico de redução do composto XTT que determina a atividade metabólica de bactérias. O sistema de transporte de elétrons na membrana celular das células bacterianas reduz o sal tetrazolio XTT em formazan XTT, resultando em alteração colorimétrica que é mensurada por leitura em espectrofotômetro a 490 nm (Orsinger-Jacobsen, et al. 2013). Os dados foram comparados entre os discos submetidos aos agentes fotossensibilizadores e radiação e aqueles submetidos apenas aos agentes fotossensibilizadores. Discos inoculados com a bactéria e submetidos apenas ao solvente da Curcumina (DMSO, etanol e água) ou clorexidina foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 4.2 – Placa com 2 discos de titânio em cada poço com caldo

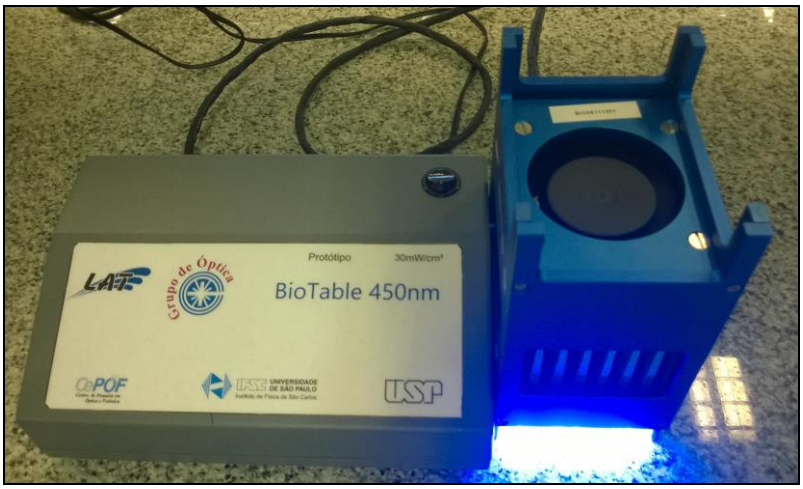


Fonte: Próprio autor

Figura 4.3 - dissolução da curcumina com gral e pistilo de vidro

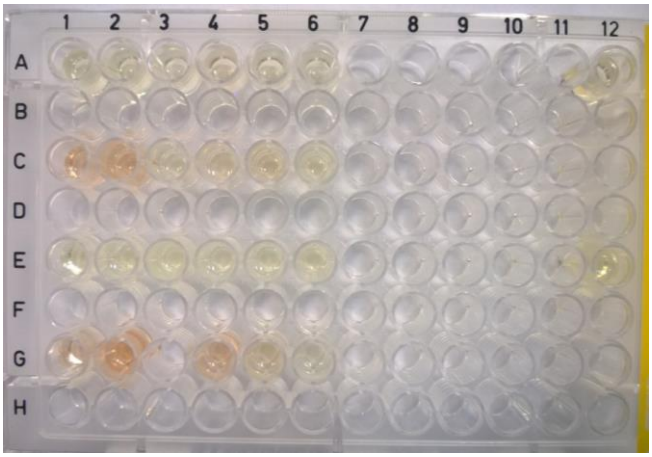
Fonte: Próprio autor

Figura 4.4.- Biotable ligado com placa de 24 poços



Fonte: Próprio autor

Figura 4.5.- Placa de 96 poços contendo xtt para leitura em do 490nm



Fonte: Próprio autor

5 RESULTADOS

O protocolo empregado permitiu a formação do biofilme de *S. gordonii*, como evidenciado pelos altos valores do teste de XTT, tantos nos discos lisos como rugosos, nos controles negativos, não havendo diferença nos valores observados entre os discos com as diferentes superfícies. Também pode ser observado que o tratamento com a curcumina sem a ativação com LED não levou a redução da atividade metabólica do biofilme, não havendo diferença entre os valores observados entre o controle negativo (tratado com solução solvente da curcumina) e o tratamento com curcumina sem laser. Por outro lado, o tratamento com curcumina ativada pela luz azul promoveu redução de 71% na atividade metabólica de biofilme de *S. gordonii* formado nos discos lisos (Tabela 5.1) e em 77% nos rugosos (Tabela 5.2). A análise de ANOVA seguida de Tukey mostrou que a redução da atividade metabólica promovida pelo tratamento com curcumina seguida de aplicação de laser foi significante quando comparada ao controle negativo, e não houve diferença signifcante estatisticamente quando o grupo tratado foi comparado com o controle positivo (clorexidina a 0,12%).

Tabela 5.1 - Média da leitura de xtt em do 490nm dos discos Lisos

S L-L	*Cu L- L*	*CL L- L*	*S L+ L*	*Cu L+ L*	*CL L+ L*
0,463	0,430	0,128	0,340	0,098	0,109

S=controle negativo; L+=com luz,L-= sem luz; Cu= Curcumina; CL=controle positivo; L=disco liso e R= disco rugoso

Tabela 5.2 -.Média da leitura de xtt em do 490nm dos discos rugosos

S L-R	*Cu L- R*	*CL L- R*	*S L+ R*	*C L+ R*	*CL L+ R*
0,449	0,515	0,098	0,432	0,098	0,110

S=controle negativo; L+=com luz,L-= sem luz; Cu= Curcumina; CL=controle positivo; L=disco liso e R= disco rugoso

As Tabelas 5.1 e 5.2 detalham a média da OD do XTT em 490 nm de cada um dos grupos estudados.Os dados completos encontram-se nos apêndices A e B.

Gráfico 5.1 – Atividade metabólica de biofilme de *S. gordonii* em discoslLisos

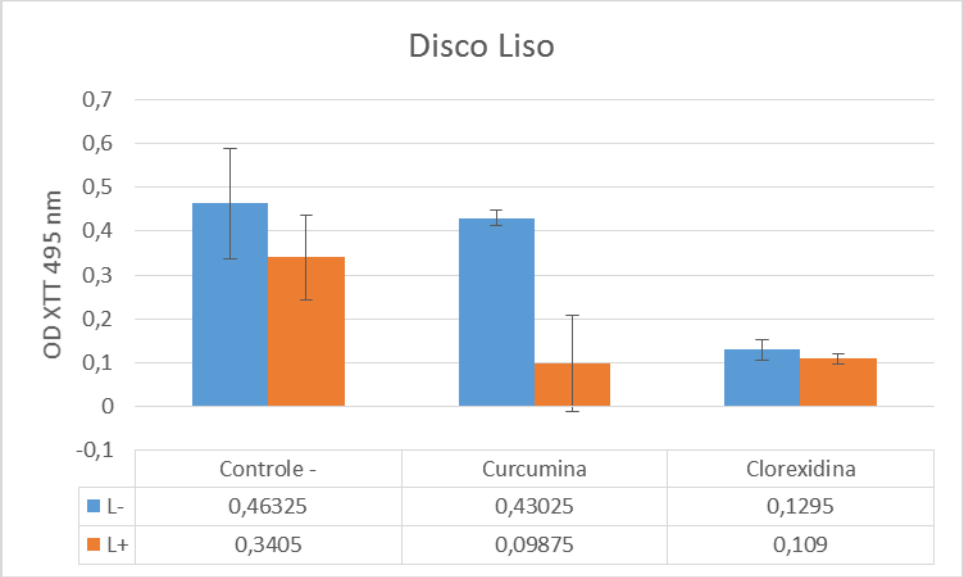
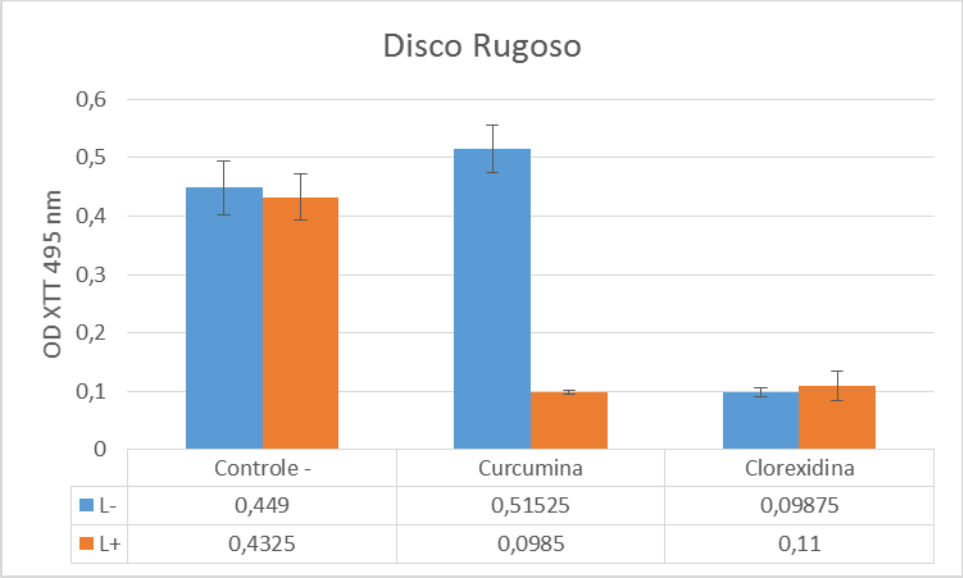


Gráfico 5.2 – Atividade metabólica de biofilme de S gordonii em discos rugosos



O gráfico 5.1 mostra a atividade metabóblica d e biofilme de *S gordonii* em discos lisos e o 5.2 em discos rugosos., evidenciando a clara diferença entre os grupos tratados com curcumina na presença (L+) e ausência (L-) de luz.

6 DISCUSSÃO

O acúmulo do biofilme em torno das margens dos implantes pode ser considerado o fator etiológico primário na inflamação do tecido periimplantar (Ericsson et al., 1992), como é o caso da gengivite de dentes naturais, com evidente necessidade de remoção para a resolução da mucosite (Lang; Berghundh, 2011).

Jakubovics (2105) enfatiza que mesmo em indivíduos com boa higiene oral, existem áreas mais protegidas das forças de abrasão, em que as comunidades microbianas se acumulam e podem sofrer alterações, levando ao desenvolvimento de doenças como cárie, doenças periodontais e doenças periimplantares.

Com o decorrer do tempo, o biofilme formado sofre alterações que resultam em um desequílibrio microbiano associado a diferenças doenças associadas ao biofilme oral. *Streptococcus gordonii* é uma das bactérias colonizadoras iniciais que iniciam a formação de placas e a capacidade de *P. gingivalis* de reconhecer e interagir especificamente com *S. gordonii* é considerada importante para sua colonização na bolsa periodontal (Ng et al., 2016).

Como demonstrado por Li et al. (2004) e Teles et al. (2011), o biofilme dental inicial não é colonizado por bactérias patogênicas, por isso, a prevenção baseia-se na remoção do biofilme inicial. Se este biofilme for mantido sempre jovem, não haverá condições de colonização por patógenos, particularmente das espécies anaeróbias estritas, proteolíticas, cuja capacidade de adesão deireta à película adquirida do esmalte é baixa, como *P gingivallis, Tannerela forsytia e Treponema denticola*, e não se tornará deletério aos tecidos de suporte do dente (Ng et al., 2016)

Devido às grandes dificuldades encontradas no tratamento da periimplantite, evidenciada por diversos autores (Mombelli et al., 1998; Lang et al., 2000; Persson et al., 2001; Sreenivasan; Gaffar, 2002; Lindhe; Meyle, 2008; Rams et al., 2014), direcionamos nossos estudos na tentativa de encontrar uma alternativa que incremente maior eficiência do controle do biofilme, enfatizando a importância da prevenção da doença.

Os cuidados mecânicos diários realizados pelos próprios pacientes, assim como os cuidados profissionais mostram-se essenciais para o controle do biofilme (Gaetti-Jardim et al., 2007).

Nos métodos profissionais indicados para a remoção do biofilme e cálculo supra gengival das coroas sobre implantes, recomenda-se o uso de material que seja mais macio que o titânio para evitar danos à superfície do titânio, mesmo em relação ao uso de ultrassons pois com o resfriamento insuficiente existe o risco de aquecimento do implante, o que pode danificar a interface osso-implante (Patel 2014). O debridamento do biofilme através de jatos de ar com pós abrasivos também pode danificar a superfície dos implantes (Drago 2014).

Os antimicrobianos locais e sistêmicos são associados às terapias mecânicas. Assim como o Gluconato de Clorexidina (que é eficiente, principalmente em bactérias Gram positivas, e pouco eficiênte contra Gram negativas) demonstra a possibilidade de aumento da resistência bacteriana com uso contínuo ou em concentrações mais elevadas (Thomas et al., 2000); os antibióticos como clindamicina, amoxicilina, doxiciclina ou metronidazol propiciam a ocorrência in vitro da resistência de algumas bactérias responsáveis pela periimplantite (Sreenivasan; Gaffar, 2002; Rams et al., 2014), além do risco de superinfecção bacteriana.

A terapia fotodinâmica tem sido empregada nas diversas especialidades da Odontologia com o objetivo de redução bacteriana. Sua ação seletiva, por não afetar as células sadias, é uma das mais importantes características dessa terapia. (Hayek 2005). Assim como seu mecanismo de ação até o momento não propiciam evidências de desenvolvimento de resistência bacteriana.

A partir dos estudos de Araújo et al. (2012), sobre os efeitos da curcumina na descontaminação da cavidade bucal com uso de luz azul (450nm), encontrando redução de 68% do total de bactérias, 99.9% de *S. mutans* e de até 37,6% para *L. acidophilus*, e os bons resultados dos estudos de Ribeiro et al., 2013 e Paschoal et al. (2015). Sobre este fotossensibilizador, nos encorajou a questionar seu efeito sobre o controle do biofilme pertinente às doenças infecciosas do periimplante.

Outros estudos também sugerem que a TFD pode ser uma estratégia de tratamento útil no tratamento da periimplantite. Dörtbudak et al. (2001), evidenciaram

a significante redução da carga patogênica nos sulcos periimplantares de pacientes com Periimplantite após a TFD. Além de Hayek et al. (2005), Marotti et al. (2013), também relataram diminuição das contagens bacterianas após TFD. Marotti et al, (2013), ainda especularam que a TFD usada como terapia adjuvante para o debridamento mecânico para a Periimplantite pode ser mais eficaz do que o tratamento convencional sozinho.

Em contrapartida, alguns estudos clínicos relataram resultados contraditórios (De Angelis et al., 2012; Esposito et al., 2013; Bassetti et al., 2014; Schar et al., 2013; Deppe et al., 2013).

Esposito et al. (2013) compararam os efeitos das técnicas de debridamento mecânico e cirúrgico com e sem TFD em pacientes com periimplantite, avaliando os parâmetros inflamatórios periimplantares (isto é, PPD, biofilme e escores de sangramento). Os resultados mostraram uma redução semelhante entre os dois grupos, com ou sem TFD. Resultados semelhantes foram relatados por De Angelis et al. (2012).

Uma explicação para os resultados discrepantes pode ser a grande variabilidade na severidade da periimplantite entre os estudos clínicos (De Angelis, et al., 2012; Bassetti et al., 2014; Esposito et al., Schar et al., 2013). Por exemplo, em estudos de Schar et al. (2013) e De Angelis et al. (2012), a PPD média foi de 4,29 e 6,34 mm, respectivamente. Um estudo de Deppe et al. (2013) não encontraram efeito significativo da TFD em pacientes com periimplantite grave (PPD 5-8 mm) em comparação com pacientes com a doença moderada (PPD 3-5 mm). Portanto, pode ser que a eficácia do debridamento convencional com ou sem TFD dependa da severidade da doença. Mesmo assim, a frequência (1-4 vezes) e a duração (10-80 s) de TFD variaram consideravelmente entre os estudos clínicos acima mencionados (De Angelis et al., 2012; Bassetti et al., 2014; Esposito et al., 2013; Schar et al., 2013). Além disso, em muitos dos estudos clínicos faltaram um grupo de teste padronizado (debridamento mecânico com TFD adjuvante) ou grupo controle (debridamento mecânico sozinho) (Bassetti et al., 2014, Schar et al., 2013). Deste modo, a eficácia clínica da TFD como um tratamento adjunto às técnicas convencionais de debridamento no tratamento de periimplantite continua a ser discutível.

Neste estudo, o tratamento com a TFD associada a curcumina ativada pela luz azul reduziu o número de bactérias viáveis no biofilme mono espécie de *S. gordonii* em 71% nos discos lisos e em 77% nos rugosos.

Fontana et al. (2015) concluíram em mais de um estudo, que em exposições diárias e de curto prazo de luz azul em bolsas periodontais de seres humanos com gengivite ou periodontite, levam a redução da carga de agentes patogênicos principais em placa, resultando assim, num aumento da microbiota associada com a saúde, podendo a Luz, sozinha, servir como adjuvante ao controle mecânico do biofilme, um tratamento profilático e barato para doença periodontal. Estes dados sugerem que o LED azul visível pode ser usado profilaticamente para estabilizar a composição microbiana normal de eliminando a BPB potencialmente patogênica.

Entretanto, neste estudo, nem a curcumina nem a Luz quando utilizados sozinhos, foram capazes de ter efeito bactericida, de fato, os resultados mostraram a necessidade de conjugação de corante-luz para garantir a eficácia da TFD. Este resultado está de acordo com outros estudos de TFD (Dovigo et al., 2011; Araújo et al., 2012; Zago et al., 2016). Na ausência de luz, apenas o tratamento com clorexidina (padrão) promoveu redução microbiana.

Alguns estudos como de Mahdi et al. (2015), concluíram que em bactérias como *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces odontyculus*, a simples irradiação com o LED azul, produz a morte desses microorganismos, mostrando que só com a irradiação com luz, já existe morte de microorganismos BPB (Black Pigmentad Bacteria), o que não ocorre em biofilme de *S. gordonii.*

O fato de ter uma quantidade maior de bactérias em discos rugosos (tratados), pode ser justificado justamente pela sua rugosidade, que aumenta tamanho da superfície e facilita a aderência de bactérias.

A Literatura mostra que o efeito bactericida da TFP é dose dependente tanto da concentração do fotossensibilizante, quanto da energia final emitida pela luz. (Dovigo et a., 2011; Pillegiet al., 2013, Zago et al., 2016). Quanto maior a potência do aparelho, menor a quantidade de tempo necessário para emitir mesma quantidade de energia final:

$E\ (J/cm^2) = \Delta P\ (W/cm^2) \times t\ (s)$

$E\ (J) = PR\ (W) \times t\ (s)$

PR=Potência real do aparelho (mW/s); área do feixe (cm²); ΔP= irradiância (mW/cm²); ΔE=densidade de energia (J/cm²) e t=tempo de aplicação(s)

Pillegi et al (2013) e Zago et al. (2016) testaram várias concentrações e diferentes períodos de pré-irradiação e de irradiação com a luz, tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes. Neste estudo utilizamos a concentração de 60 µM, mesma concentração utilizada por Mahdi et al. (2015) que obteve uma redução significativa do número de bactérias após 3 min de irradiação (102J/cm²).

Araújo et al. (2014) mostraram uma menor eficácia da FTD de iguais concentrações de fotossensibilizante em dentina cariada, do que em cultura planctônica. A TFD só foi eficiente na dentina em altas concentrações, o que pode ser justificado pela dificuldade de penetração do corante devido a matriz celular, maior complexidade e proteção mútua das bactérias no biofilme estruturado.

Andrade et al. (2013) em um estudo com espécies de *Candida* mostraram que a fotoinativação de culturas planctónicas não foi dependente do tempo de pré-irradiação (1 a 20 min), porém, nas culturas de biofilme, mostrou a necessidade de maiores intervalos de tempo para a Curcumina penetrar nas estruturas do biofilme. Pillegi et al (2013) mostraram redução bacteriana de 100% com 4 min de irradiação. Tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes estruturados com um período de pré-irradiação de 30 minutos e com concentração mais baixa de curcumina (1 a 10µM), Mahdi et al., (2015), Zago et al. (2016), utilizaram só 5 minutos de pré-irradiação, e maior concentração de curcumina (60 e 71,25 µM) com irradiação de 5 minutos e também obtiveram redução de 100% das bactérias. Maiores concentrações de curcumina não se mostraram tóxicas para as células do organismo, porém um tempo de pré-irradiação tão grande, se torna inviável quando pensamos em transportar este tratamento para condições clínicas.

A dificuldade em atingir o sucesso no tratamento da periimplantite, nos faz acreditar que a eficácia na prevenção e o tratamento da inflamação gengival inicial ao redor dos implantes são essenciais para a longevidade dos tratamentos envolvendo implantes dentários. As doenças periimplantares são altamente

prevalentes e é imperativo para o clínico saber examinar, avaliar e controlar seus fatores de risco.

A prevenção e a controle da mucosite periimplantar são fundamentais na manutenção a longo prazo dos implantes. Embora não existam ainda estudos sobre a prevenção primária, recentes revisões sistemáticas indicam a importância do controle do biofilme na redução dos sinais clínicos de inflamação periimplantar. (Smeets et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

Os dados in vitro sugerem que TFD associada a curcumina apresenta-se como método promissor para o controle do biofilme na superfície de titânio.

REFERÊNCIAS[1]

Albrektsson TO, Johansson CB, Sennerby L. Biological aspects of implant dentistry: osseointegration. Periodontol 2000. 1994 Feb;4:58-73.

Alshehri FA. The role of lasers in the treatment of peri-implant diseases: Areview. Saudi Dent J. 2016 Jul;28(3):103-8.

Andrade MC, Ribeiro AP, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of Candida spp.Arch Oral Biol. 2013 Feb;58(2):200-1

Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. Photomed Laser Surg. 2012 30 (7):393-99.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. Lasers Med Sci. 2014 Mar;29(2):629-35.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. Photomed Laser Surg. 2012 Jul;30(7):393-9.

Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2014 Mar;25(3):279-87.

Batchelor SE, Cooper M, Chhabra SR, Glover LA, Stewart GS, Williams P, Prosser JI. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol. 1997 Jun;63(6):2281-6.

Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B. Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. 1992 Mar;3(1):1-8

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res. 2004 Jul;83(7):529-33.

Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2003;18(1):51-5.

da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG chemotherapy on Streptococcus mutans using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. Lasers Med Sci. 2015 Feb;30(2):885-90.

Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. Arch Microbiol. 1989;151(2):183-5.

De Angelis N, Felice P, Grusovin MG, Camurati A, Esposito M. The effectiveness of adjunctive light-activated disinfection (LAD) in the treatment of peri-implantitis: 4-month results from a multicentre pragmatic randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol. 2012 Winter;5(4):321-31.

Deppe H, Mücke T, Wagenpfeil S, Kesting M, Sculean A. Nonsurgical antimicrobial photodynamic therapy in moderate vs severe peri-implant defects: a clinical pilot study. Quintessence Int. 2013;44(8):609-18

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. J Bacteriol. 2010 Oct;192(19):5002-17.

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

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res. 2001 Apr;12(2):104-8.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. Lasers Surg Med. 2011 Nov;43(9):927-34.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against Candida albicans. Photochem Photobiol. 2011 Jul-Aug;87(4):895-903.

Drago L, Del Fabbro M, Bortolin M, Vassena C, De Vecchi E, Taschieri S. Biofilm removal and antimicrobial activity of two different air-polishing powders: an in vitro study. J Periodontol. 2014 Nov;85(11):e363-9.

Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. Clin Oral Implants Res.1992 Sep;3(3):99-103.

Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Edlund T, Lindhe J. The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. 1996 Dec;7(4):320-8.

Esposito M, Grusovin MG, De Angelis N, Camurati A, Campailla M, Felice P. The adjunctive use of light-activated disinfection (LAD) with FotoSan is ineffective in the treatment of peri-implantitis: 1-year results from a multicentre pragmatic randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol. 2013 Summer;6(2):109-19.

Fontana CR, Song X, Polymeri A, Goodson JM, Wang X, Soukos NS. The effect of blue light on periodontal biofilm growth in vitro. Lasers Med Sci. 2015 nov;30(8):2077-86.

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 Jun;48(6):2173-8

Gaetti-Jardim E Junior, Gaetti- Jardim EC, lins AS, Oliveira SR, Semenoff A segundo. Susceptibilidade de bactérias anaeróbias isoladas de infecções periimplantares e periodontais ao metronidazol, licosamidas, macrolídeos e tetraciclina. Ver. Odonto Cienc. 2007;22(56):131-7.

Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie. 2009 Oct;64(10):666-73.

Hayek RR, Araújo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, Ribeiro MS. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. J Periodontol. 2005 Aug;76(8):1275-81.

Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Prog Drug Res. 1991;37:91-105.

Hsu SD, Cisar JO, Sandberg AL, Kilian M. 1994. Adhesive properties of viridans group streptococcus species. Microb Ecol Health Di. 1994;7:125-37.

Jakubovics NS, Robinson JC, Samarian DS, Kolderman E, Yassin SA, Bettampadi D,Bashton M, Rickard AH. Critical roles of arginine in growth and biofilm development by Streptococcus gordonii. Mol Microbiol. 2015 Jul;97(2):281-300.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 2. ed. E. Santos; 1998. p. 21-9.

Koon H, Leung AW, Yue KK, Mak NK. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cells. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2006;25(1-2):205-15.

Lang NP, Berglundh T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81

Lang NP, Berglundh T; Working Group 4 of Seventh European Workshop on Periodontology.. Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:178-81.

Lang NP, Wilson TG, Corbet EF.Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment. Clin Oral Implants Res. 2000; 11 Suppl 1:146-55.

Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. Photomed Laser Surg. 2014 Nov;32(11):627-32.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol. 2004;97(6):1311-8.

Lindhe J, Meyle J; Group D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. J Clin Periodontol. 2008 Sep;35(8 Suppl):282-5.

Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol. 2000 Mar;182(5):1374-82.

Mahdi Z, Habiboallh G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum. Laser Ther. 2015 Mar 31;24(2):103-11.

Marotti J, Tortamano P, Cai S, Ribeiro MS, Franco JE, de Campos TT. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2013 Jan;28(1):303-9.

Matarasso S, Quaremba G, Coraggio F, Vaia E, Cafiero C, Lang NP. Maintenance of implants: an in vitro study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures. Clin Oral Implants Res. 1996 Mar;7(1):64-72.

Mombelli A, Décaillet F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. J Clin Periodontol. 2011 Mar;38 Suppl 11:203-13.

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

Mombelli A, Van Oosten MA, Schurch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. Oral Microbiol Immunol. 1987 Dec;2(4):145-51.

Ng HM, Kin LX, Dashper SG, Slakeski N, Butler CA, Reynolds EC. Bacterial interactions in pathogenic subgingival plaque. Microb Pathog. 2016 May;94:60-9. Nov;30(8):2077-86.

Orsinger-Jacobsen SJ, Patel SS, Vellozzi EM, Gialanella P, Nimrichter L, Miranda K, Martinez LR. Use of a stainless steel washer platform to study Acinetobacter baumannii adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces. Microbiology. 2013 Dec;159(Pt 12):2594-604.

Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on Streptococcus mutans using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. Lasers Med Sci. 2015 Feb;30(2):885-90.

Patel A. Non-surgical management of peri-implant diseases. Prim Dent J. 2014 Aug;3(3):62-5.

Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res. 2001 Dec;12(6):595-603.

Pileggi G, Wataha JC, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, Bouillaguet S. Blue light-mediated inactivation of Enterococcus faecalis in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013 May;10(2):134-40.

Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. . J Photochem Photobiol C: Photochem Reviews. 2009 10:81-95

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota. Clin Oral Implants Res. 2014 Jan;25(1):82-90.

Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CA. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus and L929 fibroblasts. Lasers Med Sci. 2013 Feb;28(2):391-8.

Salvi GE, Lang NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19 Suppl:116-27.

Schär D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2013 Jan;24(1):104-10.

Sculean A, Aoki A, Romanos G, Schwarz F, Miron RJ, Cosgarea R. Is Photodynamic Therapy an Effective Treatment for Periodontal and Peri-Implant Infections? Dent Clin North Am. 2015 Oct;59(4):831-58.

Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer. 2005 Sep;41(13):1955-68.

Shibli JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FH Jr, Marcantonio E Jr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res. 2006 Jun;17(3):273-81.

Slots J, Jorgensen MG. Efficient antimicrobial treatment in periodontal maintenance care. J Am Dent Assoc. 2000 Sep;131(9):1293-304.

Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. Head Face Med. 2014 Sep 3;10:34.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.

Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. J Clin Periodontol. 2002 Nov;29(11):965-74.

Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in Pseudomonas aeruginosa and the effect of a "residual" concentration. J Hosp Infect. 2000 Dec;46(4):297-303.

Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16:S1-4.

Tønnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: Investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. J Pharm Sci. 1987 May;76(5):371-3.

Verdugo F, Laksmana T, Uribarri A. Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis. Arch Oral Biol. 2016 Apr;64:39-50.

Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. Oral Microbiol Immunol. 1993 Jun;8(3):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 Apr;57(4):680-4.

Yilmaz S, Kuru B, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. Lasers Surg Med. 2002;30(1):60-6.

Zago LHP, Feitas LM,Fontana CH. Eficácia da terapia fotodinâmica *in vitro* mediada por Azul de metileno e Curcumina contra Enterococcus faecalis. Rev Ciên Farm Básica Apl., Araraquara, 2016 v. 37 Ago, Supl. 1

Zitzmann NU, Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. Soft tissue reactions to plaque formation at implant abutments with different surface topography. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol. 2002 May;29(5):456-61

Zitzmann NU, Walter C, Berglundh T: Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Periimplantitis – eine Übersicht. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 2006, 61:642–49.

Apêndice A – Resultado de leitura de xtt em do 492nm com média e desvio padrão de cada grupo.

Liso	1 -S SEML	2- C SEML	3 CL SEML	4 S COML	5 C COML	6 CL COML
	0,341	0,480	0,116	0,241	0,134	0,102
	0,369	0,285	0,120	0,266	0,086	0,100
	0,588	0,477	0,155	0,478	0,093	0,123
	0,555	0,479	0,127	0,377	0,082	0,111
MÉDIA	0,46325	0,43025	0,1295	0,3405	0,09875	0,109
DESV PAD	0,1262	0,0968	0,0176	0,1091	0,0239	0,0105

Rugoso	7 S SEMR	8 S COMR	9 C SEMR	10 C COMR	11 CL SEM R	12 CL COMR
	0,431	0,42	0,522	0,095	0,088	0,101
	0,392	0,404	0,506	0,099	0,103	0,147
	0,491	0,491	0,467	0,099	0,103	0,093
	0,482	0,415	0,566	0,101	0,101	0,099
MÉDIA	0,449	0,4325	0,51525	0,0985	0,09875	0,110
DESV PAD	0,0463	0,0396	0,0410	0,0025	0,0072	0,0249

Apêndice B Análise de Tukey completa

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	0,033	1,0859	ns
Médias (1 a 3) =	0,3353	11,0319	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0,1228	4,0393	ns
Médias (1 a 5) =	0,3645	11,9944	< 0.01
Médias (1 a 6) =	0,3543	11,6571	< 0.01
Médias (1 a 7) =	0,0143	0,4689	ns
Médias (1 a 8) =	0,052	1,7111	ns
Médias (1 a 9) =	0,3645	11,9944	< 0.01
Médias (1 a 10) =	0,0308	1,0119	ns
Médias (1 a 11) =	0,3648	12,0026	< 0.01
Médias (1 a 12) =	0,3533	11,6242	< 0.01
Médias (2 a 3) =	0,3023	9,946	< 0.01
Médias (2 a 4) =	0,0898	2,9534	ns
Médias (2 a 5) =	0,3315	10,9085	< 0.01
Médias (2 a 6) =	0,3213	10,5712	< 0.01
Médias (2 a 7) =	0,0188	0,617	ns
Médias (2 a 8) =	0,085	2,7971	ns
Médias (2 a 9) =	0,3315	10,9085	< 0.01
Médias (2 a 10) =	0,0022	0,074	ns
Médias (2 a 11) =	0,3318	10,9167	< 0.01
Médias (2 a 12) =	0,3203	10,5383	< 0.01
Médias (3 a 4) =	0,2125	6,9926	< 0.01
Médias (3 a 5) =	0,0293	0,9625	ns
Médias (3 a 6) =	0,019	0,6252	ns
Médias (3 a 7) =	0,321	10,563	< 0.01
Médias (3 a 8) =	0,3873	12,743	< 0.01
Médias (3 a 9) =	0,0293	0,9625	ns
Médias (3 a 10) =	0,3045	10,02	< 0.01
Médias (3 a 11) =	0,0295	0,9707	ns
Médias (3 a 12) =	0,018	0,5923	ns
Médias (4 a 5) =	0,2418	7,9551	< 0.01
Médias (4 a 6) =	0,2315	7,6179	< 0.01
Médias (4 a 7) =	0,1085	3,5704	ns
Médias (4 a 8) =	0,1748	5,7504	< 0.05

Médias (4 a 9) =	0,2418	7,9551 < 0.01
Médias (4 a 10) =	0,092	3,0274 ns
Médias (4 a 11) =	0,242	7,9634 < 0.01
Médias (4 a 12) =	0,2305	7,5849 < 0.01
Médias (5 a 6) =	0,0103	0,3373 ns
Médias (5 a 7) =	0,3503	11,5255 < 0.01
Médias (5 a 8) =	0,4165	13,7056 < 0.01
Médias (5 a 9) =	0	0 ns
Médias (5 a 10) =	0,3338	10,9825 < 0.01
Médias (5 a 11) =	0,0003	0,0082 ns
Médias (5 a 12) =	0,0113	0,3702 ns
Médias (6 a 7) =	0,34	11,1882 < 0.01
Médias (6 a 8) =	0,4063	13,3683 < 0.01
Médias (6 a 9) =	0,0103	0,3373 ns
Médias (6 a 10) =	0,3235	10,6452 < 0.01
Médias (6 a 11) =	0,0105	0,3455 ns
Médias (6 a 12) =	0,001	0,0329 ns
Médias (7 a 8) =	0,0663	2,1801 ns
Médias (7 a 9) =	0,3503	11,5255 < 0.01
Médias (7 a 10) =	0,0165	0,543 ns
Médias (7 a 11) =	0,3505	11,5337 < 0.01
Médias (7 a 12) =	0,339	11,1553 < 0.01
Médias (8 a 9) =	0,4165	13,7056 < 0.01
Médias (8 a 10) =	0,0828	2,723 ns
Médias (8 a 11) =	0,4168	13,7138 < 0.01
Médias (8 a 12) =	0,4053	13,3354 < 0.01
Médias (9 a 10) =	0,3338	10,9825 < 0.01
Médias (9 a 11) =	0,0003	0,0082 ns
Médias (9 a 12) =	0,0113	0,3702 ns
Médias (10 a 11) =	0,334	10,9908 < 0.01
Médias (10 a 12) =	0,3225	10,6123 < 0.01
Médias (11 a 12) =	0,0115	0,3784 ns