



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

**MARCELO HENRIQUE TONIN**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO LASER EM BAIXA  
INTENSIDADE E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA –  
ESTUDO *IN VITRO***

**MARINGÁ**

**2020**



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

**MARCELO HENRIQUE TONIN**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO LASER EM BAIXA  
INTENSIDADE E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA –  
ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Samira Salmeron

**MARINGÁ**

**2020**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

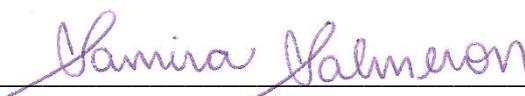
MARCELO HENRIQUE TONIN

### AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE E DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA – ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação em formato de artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Maringá, 15 de Junho de 2020.

#### BANCA EXAMINADORA



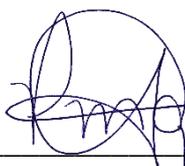
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Samira Salmeron  
UNINGÁ



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elcia Maria Varize Silveira  
Unisagrado



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Polyane Mazucatto Queiroz  
UNINGÁ

---

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho...*

*A Deus por minha vida, por minha saúde, pela oportunidade de realizar este sonho, por me guiar e me dar forças.*

*Aos meus pais Edvaldo Tonin e Marlí Tavares Tonin por confiarem em mim, por não medir esforços para realização de meu sonho e por estar sempre ao meu lado me apoiando guiando e incentivando me dando base e motivação.*

*A minha irmã Racchel Elis Tonin por sempre estar ao meu lado me dando base, compartilhando conhecimentos e sempre me incentivando.*

*A Minha namorada Daniela Lemes da Silva por todo seu amor, carinho e confiança, sempre me motivando, incentivando e me dando base.*

---

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

*À Prof. Dr<sup>a</sup>. Samira Salmeron, minha orientadora a qual possuo grande admiração e inspiração, agradeço por todos seus ensinamentos, paciência dedicação e compreensão, aos conselhos, sugestões e permanente valorização do trabalho e entusiasmo de forma contagiante que foram determinantes para a realização e desenvolvimento desse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Jose Ricardo Mariano, por seus ensinamentos, por sua colaboração mesmo que breve, por seus conselhos, orientações e experiência que foi sendo passada ao longo do curso.*

*À Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariana Lopes Ortiz, pela sua disposição, dedicação e ajuda na realização da pesquisa e por todos seus ensinamentos.*

*Ao Prof. Dr. Vilmar Dívanir Gottardo, pela convivência, experiência compartilhada, ensinamentos, dicas e paciência.*

*Ao Prof. Dr. Helder César Figueira Junior, pelos ensinamentos, convivência, experiência e casos compartilhados, e por todas suas dicas e paciência.*

*Ao Prof. Ms. Renato Victor de Oliveira, por seus ensinamentos amizade e experiência compartilhada na área de implantodontia que foram fundamentais para a conclusão deste curso.*

---

---

---

---

*Aos meus amigos e colegas de mestrado pela companhia, motivação, experiência compartilhada, por toda amizade e companheirismo de todos.*

*Ao Dr. Ricardo Benedito de Oliveira, REITOR do Centro Universitário INGÁ UNINGÁ;*

*Ao Prof. Me. Roberto César de Oliveira, PRESIDENTE da mantenedora;*

*À Profa. Me. Maria Albertina Ferreira do Nascimento, PRÓ-REITORA de ensino do Centro Universitário INGÁ UNINGÁ;*

*Ao Prof. Dr. Eduardo Moreschi, coordenador do curso de Graduação em Odontologia do Centro Universitário INGÁ UNINGÁ;*

*À Profa. Dra. Karina Maria Salvatore de Freitas, Coordenadora do Mestrado Profissional em Odontologia do Centro Universitário INGÁ UNINGÁ.*

---

---

# RESUMO

---

---

---

---

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os implantes dentários, hoje, constituem uma opção de tratamento previsível para os casos de reabilitação oral; entretanto, complicações como doenças peri-implantares estão aumentando a cada dia. **PROPOSIÇÃO:** O objetivo deste trabalho foi verificar a efetividade, *in vitro*, de dois protocolos contra culturas de *Staphylococcus aureus* e biofilme oral. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizadas placas de Petri (n=4) divididas em: grupos-controle positivos (CP-SA e CP-B) - placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* e biofilme oral sem tratamento; grupos laser em baixa intensidade (LBI-SA e LBI-B): placas inoculadas com *S. aureus* e biofilme oral e tratadas com laser em baixa intensidade (660 nm, 30 mW, 50 J/cm<sup>2</sup>, 47s); grupos terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT-SA e aPDT-B): placas inoculadas com *S. aureus* e biofilme oral e tratadas com terapia fotodinâmica antimicrobiana (mesmo protocolo de LBI + TBO 100 µg/mL, 1 min). Após realizados os tratamentos, o conteúdo de todas as placas foi diluído e semeado para contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs). Os resultados foram analisados utilizando teste ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey, e teste t independente, com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Ambos tratamentos, aPDT e LBI, reduziram o número de UFCs de forma significativa para os dois tipos de cultura, aPDT-SA (3,23 x 10<sup>6</sup> ± 0,10), LBI-SA (4,10 x 10<sup>6</sup> ± 0,12), aPDT-B (2,79 x 10<sup>6</sup> ± 0,13) e LBI-B (3,69 x 10<sup>6</sup> ± 0,20) quando comparados aos grupos-controle positivos CP-SA (5,81 x 10<sup>6</sup> ± 0,16) e CP-B (5,18 x 10<sup>6</sup> ± 0,43), respectivamente (p = 0,000). Quando comparados os grupos aPDT-SA e aPDT-B e LBI-SA e LBI-B, separadamente, também houve diferença estatisticamente significativa (p = 0,000). Embora, nenhum dos protocolos foi capaz de eliminar completamente os microrganismos cultivados. **CONCLUSÃO:** Os protocolos do laser em baixa intensidade e da terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizados mostraram-se efetivos na redução das culturas de biofilme oral e *S. aureus in vitro*, com superioridade da aPDT contra o biofilme oral.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descontaminação. Lasers. Terapia fotodinâmica. Biofilme. *Staphylococcus aureus*.

---

---

# **ABSTRACT**

---

---

---

---

## ABSTRACT

### EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF LOW INTENSITY LASER AND ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY – *IN VITRO* STUDY

**BACKGROUND:** Dental implants, nowadays, are a predictable treatment option for cases of oral rehabilitation; however, complications such as peri-implant diseases are increasing every day. **PROPOSITION:** Aim of this study was to verify the effectiveness, *in vitro*, of two protocols against *Staphylococcus aureus* and oral biofilm cultures. **MATERIAL AND METHODS:** Petri dishes (n=4) divided into groups were used: positive control groups (CP-SA and CP-B) - plates inoculated with *Staphylococcus aureus* and oral biofilm untreated; low intensity laser groups (LBI-SA and LBI-B): plates inoculated with *S. aureus* and oral biofilm and treated with low intensity laser (660 nm, 30 mW, 50 J/cm<sup>2</sup>, 47s); antimicrobial photodynamic therapy groups (aPDT-SA and aPDT-B): plates inoculated with *S. aureus* and oral biofilm and treated with antimicrobial photodynamic therapy (same LBI protocol + TBO 100µg/mL, 1 min). After treatments, all plates content was diluted and seeded for counting of colony forming units (CFUs). Results were analyzed using one-way ANOVA and Tukey test, and independent t-test, with 5% significance level. **RESULTS:** Both treatments, aPDT and LBI, significantly reduced the number of CFUs for two types of culture, aPDT-SA ( $3.23 \times 10^6 \pm 0.10$ ), LBI-SA ( $4.10 \times 10^6 \pm 0.12$ ), aPDT-B ( $2.79 \times 10^6 \pm 0.13$ ) and LBI-B ( $3.69 \times 10^6 \pm 0.20$ ) when compared to positive control groups CP-SA ( $5.81 \times 10^6 \pm 0.16$ ) and CP-B ( $5.18 \times 10^6 \pm 0.43$ ), respectively ( $p = 0.000$ ). When APDT-SA and aPDT-B and LBI-SA and LBI-B groups were compared separately, there was also statistically significant difference ( $p = 0.000$ ). Although none of protocols was able to eliminate completely cultured microorganisms. **CONCLUSIONS:** Low intensity laser and antimicrobial photodynamic therapy protocols used proved to be effective in reducing cultures of oral biofilm and *S. aureus in vitro*, with superiority of aPDT against oral biofilm.

**KEYWORDS:** Decontamination. Lasers. Photodynamic therapy. Biofilm. *Staphylococcus aureus*.

---

---

---

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### - FIGURAS

**Figura 1** - Esquema representativo dos grupos experimentais .....22

**Figura 2** - **A)** Placa contendo microrganismos e corante TBO aplicado por 1 minuto antes da irradiação. **B)** Irradiação da placa com laser vermelho de acordo com o protocolo .....24

**Figura 3** - Placa sendo irradiada com laser em baixa intensidade de acordo com o protocolo.....25

### - GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Distribuição das médias e desvios padrão de UFCs nos grupos experimentais.....28

---

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Protocolo de irradiação com laser em baixa intensidade (BATALHA, 2019).....24
- Tabela 2** - Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônia (UFCs) dos grupos experimentais (comparação intergrupos – *Staphylococcus aureus*).....27
- Tabela 3** - Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônia (UFCs) dos grupos experimentais (comparação intergrupo – Biofilme oral).....27
- Tabela 4** - Médias de desvio padrão das unidades formadoras de colônia (UFCs) dos grupos-teste comparados separadamente (aPDT) .....28
- Tabela 5** - Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônia (UFCs) dos grupos-teste comparados separadamente (LBI).....28
- 
-

---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS .....	22
3.2	CULTURA DOS MICRORGANISMOS .....	23
3.3	DESCONTAMINAÇÃO .....	23
3.3.1	Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).....	23
3.3.2	Laser em baixa intensidade .....	24
3.4	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCs) .....	25
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>

---

---

# **1 INTRODUÇÃO**

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários, atualmente, constituem uma opção de tratamento altamente previsível para os casos de reabilitação oral, com altas taxas de sucesso (QUIRYNEN et al., 2014). Entretanto, com o aumento no número de implantes instalados e o “envelhecimento” desses implantes na cavidade oral cresce, também, o número de casos de complicações relacionadas a esse tipo de tratamento como, por exemplo, as doenças peri-implantares (SINJAB et al., 2018).

As doenças peri-implantares, segundo classificação recente, incluem a mucosite peri-implantar e a peri-implantite (CATON et al., 2018). A mucosite peri-implantar é definida como uma lesão inflamatória que afeta a mucosa ao redor dos implantes sem perda de osso de suporte (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018). Trata-se de uma condição reversível, uma vez eliminado o biofilme, caracterizada por sangramento à sondagem e sinais visuais de inflamação (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018). A prevalência da mucosite peri-implantar é estimada que fique em torno de 50% dos implantes (FIGUERO et al., 2014). Os fatores associados à mucosite peri-implantar incluem acúmulo de biofilme, fumo e radioterapia (HEITZ-MAYFIELD; SALVI, 2018).

A peri-implantite, por sua vez, apresenta um quadro bem mais crítico do ponto de vista clínico. Trata-se de uma condição patológica associada ao biofilme que envolve os tecidos ao redor dos implantes, caracterizada por inflamação da mucosa peri-implantar e perda óssea subsequente e progressiva (SCHWARZ et al., 2018). Embora dados atuais ainda sejam limitados, estima-se que a peri-implantite atinja de 12-43% dos implantes (FIGUERO et al., 2014). O diagnóstico inclui presença de sinais visíveis de inflamação, sangramento à sondagem, aumento na profundidade de sondagem comparada às medidas no *baseline* e perda óssea progressiva (SCHWARZ et al., 2018). Apresentam risco aumentado de desenvolver peri-implantite pacientes com histórico de periodontite, pobre controle de placa e que não fazem terapia de manutenção após reabilitação com implantes (SCHWARZ et al., 2018).

Evidências recentes indicam que a mucosite peri-implantar é precursora da peri-implantite do mesmo modo que a gengivite é da periodontite (RENVERT;

---

POLYZOIS, 2018). Assim como o biofilme também é considerado principal fator etiológico para doenças peri-implantares e periodontais (CATON et al., 2018; BERGLUNDH et al., 2018; LANG et al., 1993). A mucosa peri-implantar possui várias características semelhantes aos tecidos gengivais que circundam os dentes (RENVERT; POLYZOIS, 2018). Entretanto, apesar das similaridades, diferenças também são identificadas. A ausência de inserção de fibras colágenas no titânio, com disposição apenas paralela e circular dessas fibras em relação ao implante, quando comparadas aos dentes, garantem certa desvantagem à penetração bacteriana (BELIBASAKIS, 2014).

Os estudos mostram que a sequência de eventos imunopatológicos, composição qualitativa das células imunológicas e resposta inflamatória são semelhantes na peri-implantite e na periodontite (BELIBASAKIS, 2014). Entretanto, dados sugerem que a progressão da peri-implantite parece ser mais rápida do que da periodontite (BERGLUNDH et al., 2018) e a destruição inflamatória tecidual na peri-implantite, também, é mais rápida e extensa (BELIBASAKIS, 2014).

Com relação à microbiota, sugere-se que a composição dos biofilmes seja semelhante entre a periodontite e a peri-implantite, com algumas diferenças importantes (MOMBELLI; DECAILLET, 2011). A microbiota da peri-implantite é bastante complexa e heterogênea e ainda permanece incompleta (SCHWARZ et al., 2018). A peri-implantite foi associada à várias espécies bacterianas, incluindo *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (PERSSON; RENVERT, 2014), além de patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (LEONHARDT; RENVERT; DAHLEN, 1999; MOMBELLI; DECAILLET, 2011; RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016), fungos e vírus *Epstein-Barr* (RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016). Dados recentes mostram que a microbiota da peri-implantite consiste em periodontopatógenos anaeróbicos gram-negativos e microrganismos oportunistas quase que na mesma proporção (RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016).

Uma revisão sistemática (LAFABRIE et al., 2017) mostrou que implantes saudáveis e com peri-implantite são colonizados por microrganismos periodontopatógenos (*P. gingivalis* e, especialmente, *Prevotella intermedia/nigrescens* podem ser mais frequentes nas doenças peri-implantares). Persson e Renvert (2014) coletaram amostras de diferentes indivíduos com implantes

---

saudáveis e acometidos por peri-implantite e realizaram análise de hibridização DNA-DNA. Esses autores encontraram um perfil bacteriano distinto na peri-implantite incluindo *P. gingivalis*, *S. aureus*, *S. anaerobius*, *Streptococcus intermedius*, *S. mitis*, *T. forsythia* e *T. socranskii*.

Vários estudos mostram taxas de microrganismos identificados na peri-implantite que são menos comuns na periodontite, como *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (PERSSON; RENVERT, 2014). A explicação biológica para o envolvimento de espécies de *Staphylococcus* é sua capacidade de aderir firmemente à superfície de titânio (HARRIS; RICHARDS, 2004). Na verdade, *S. aureus* e *S. anaerobius* foram encontrados em maior número em biofilmes obtidos de implantes com peri-implantite do que implantes saudáveis (PERSSON; RENVERT, 2014). Infecção por *S. aureus* pode ser importante no desenvolvimento da peri-implantite (PERSSON; RENVERT, 2014; CAI et al., 2019) uma vez que, durante a formação do biofilme, esse microrganismo age como um colonizador primário, criando condições favoráveis à adesão e colonização de bactérias tardias (PERSSON; RENVERT, 2014).

Desse modo, assim como na periodontite, a remoção do biofilme se torna vital nos casos de peri-implantite (TASTEPE et al., 2012; HEITZ-MAYFIELD; LANG, 2010; FRAGA et al., 2018); a prevenção e tratamento desta condição é, inclusive, críticos para a manutenção dos implantes a longo prazo (FRAGA et al., 2018). Sugere-se que o sucesso nos quadros de peri-implantite se baseia na remoção do biofilme associado à descontaminação da superfície do implante interrompendo, assim, a progressão da doença (ROSEN et al., 2018).

Nesse contexto, vários protocolos para tratamento da peri-implantite e formas de realizar a descontaminação da superfície do implante são vistos na literatura (KOTSOVILIS et al., 2008; CAI et al., 2019). Diversos métodos químicos e mecânicos têm sido propostos ainda sem definição de um protocolo considerado ideal para o tratamento da peri-implantite até momento (KOTSOVILIS et al., 2008; SALMERON et al., 2013). A redução da carga bacteriana em áreas com peri-implantite apenas utilizando debridamento mecânico é bastante complicada devido ao desenho e topografia de superfícies desses implantes (RENVERT et al., 2009). A maioria deles apresenta características de rugosidade de superfície que melhoram o tempo e a

---

qualidade da osseointegração. Ao mesmo passo em que são favoráveis aos processos biológicos de cicatrização, tais estruturas também podem dificultar o tratamento da peri-implantite, uma vez instalada, inclusive facilitar a colonização bacteriana (RENVERT; POLYZOIS, 2018).

Métodos mecânicos como uso de curetas, ultrassom ou jatos de pós abrasivos podem danificar a superfície dos implantes sem descontaminação efetiva, logo, terapias adjuntas como agentes antimicrobianos e antibióticos têm sido propostos. O uso de lasers e terapia fotodinâmica antimicrobiana para descontaminação das superfícies dos implantes de titânio também está sendo estudado com resultados bastante promissores (KREISLER et al., 2005; SALMERON et al., 2013). A grande vantagem das terapias a laser é que não apresentam algumas consequências observadas por outros métodos como irritação local e desenvolvimento de resistência bacteriana, mas, dependendo da potência, como no caso dos lasers em alta intensidade, pode causar danos térmicos (CAI et al., 2019).

Foi demonstrado, anteriormente, que o laser apresenta capacidade de cicatrização sobre os tecidos periodontais, de modo geral, por meio da descontaminação desses tecidos e modulação ou ativação do metabolismo celular nos tecidos adjacentes (CHENG et al., 2016). O efeito do laser como descontaminante das superfícies de implantes é controverso na literatura. Há trabalhos que relatam bons resultados (SALMERON et al., 2013) e outros que relatam não haver diferenças do laser para os tratamentos convencionais (DEPPE; HORCH; NEFF, 2007; SCHWARZ et al., 2011). Nas últimas décadas, a associação de lasers em baixa intensidade (LBI) à fotossensibilizadores também tem sido usada para reduzir ou eliminar bactérias, na chamada terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (SALMERON et al., 2013; CHENG et al., 2016).

O mecanismo envolvido na aPDT consiste na combinação de corante não tóxico, sensível à luz, denominado fotossensibilizador, a uma fonte de luz de baixa energia com comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do corante, gerando formação de radicais livres de oxigênio singleto, altamente reativo, capaz de destruir as bactérias (HAYEK et al., 2005; DE OLIVEIRA; SCHWARTZ-FILHO, 2007; FRAGA et al., 2018). Fraga et al. (2018) realizaram revisão sistemática e meta-análise para avaliar a eficácia da aPDT na alteração microbiológica benéfica

---

aos tratamentos de peri- implantite e verificaram que essa terapia parece ser eficaz na redução bacteriana e tem potencial como alternativa nos casos de peri-implantite. Outra revisão sistemática sobre o tema (CHAMBRONE; WANG; ROMANOS, 2018) avaliou a eficácia da aPDT como terapia adjunta à terapia cirúrgica e não cirúrgica em pacientes com periodontite e peri-implantite e concluiu que aPDT pode fornecer melhoras clínicas semelhantes à terapia convencional em termos de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção para ambos pacientes.

Um estudo realizado com discos de titânio de diferentes rugosidades de superfícies avaliou o poder de desinfecção da aplicação de antissépticos com aPDT (635 nm + TBO 100 µg/mL) sobre biofilme de *S. aureus* e verificou que a combinação de clorexidina ou água oxigenada com aPDT foi mais efetiva em erradicar o microrganismo do que cada tratamento sozinho (CAI et al., 2019). Salmeron et al. (2013) avaliaram, também em discos de titânio, o poder de descontaminação do laser em baixa intensidade sozinho, do corante TBO sozinho e da aPDT e concluíram que os três tratamentos foram igualmente eficientes na descontaminação, com leve superioridade da aPDT no período inicial de observação.

Sendo assim, devido ao grande número de questionamentos acerca do tema e apresentação de uma gama de protocolos descritos na literatura, o presente trabalho teve como objetivo verificar a efetividade de dois protocolos contra culturas de *Staphylococcus aureus* e biofilme oral *in vitro*.

---

---

## **2 PROPOSIÇÃO**

---

---

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi verificar a efetividade *in vitro* de dois protocolos envolvendo terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e laser em baixa intensidade (LBI) contra culturas de *Staphylococcus aureus* e biofilme oral.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

As placas de Petri foram distribuídas nos seguintes grupos (n = 4) (Figura 1):

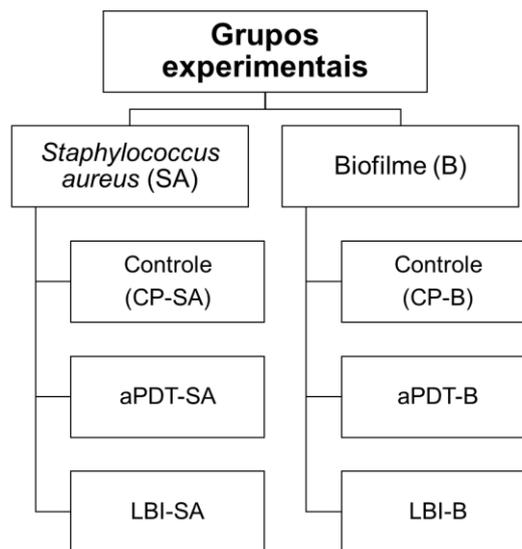


Figura 1 : Esquema representativo dos grupos experimentais

- GRUPO CP-SA: placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* sem qualquer tratamento.
- GRUPO aPDT-SA: placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* e tratadas com terapia fotodinâmica antimicrobiana.
- GRUPO LBI-SA: placas inoculadas com *Staphylococcus aureus* e tratadas com laser em baixa intensidade.
- GRUPO CP-B: placas inoculadas com biofilme oral sem qualquer tratamento.
- GRUPO aPDT-B: placas inoculadas com biofilme oral e tratadas com terapia fotodinâmica antimicrobiana.
- GRUPO LBI-B: placas inoculadas com biofilme oral e tratadas com laser em baixa intensidade.

Também foram realizados testes para garantir a esterilidade do meio de cultura.

### **3.2 CULTURA DOS MICRORGANISMOS**

A amostra de biofilme oral utilizada nesta pesquisa foi obtida anteriormente por um estudo dentro desta linha de pesquisa. Essa amostra, coletada de um voluntário com diagnóstico de periodontite crônica localizada severa (ARMITAGE, 1999), encontrava-se congelada e faz parte do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Ingá – Uningá (Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ / CAAE 96891018.7.0000.5220 – aprovação 3.072.210). Para *Staphylococcus aureus* foi utilizada cepa padrão *American Type Culture Collection* (ATCC 25923) pertencente ao acervo de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Ingá – Uningá que estavam congeladas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Kasvi – São José dos Pinhais/PR/Brasil) com 15% de glicerol. Para o uso, as cepas foram descongeladas e transferidas para placas contendo meio de cultura e, em seguida, incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, para reativação.

Para o preparo dos inóculos, tanto o biofilme oral quanto a cepa de *S. aureus* foram padronizados por meio da transferência de colônias desses microrganismos para tubo com solução salina, até atingir turvação correspondente à escala de MacFarland 0,5 que corresponde a, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Foram utilizadas quatro placas, contendo 5 mL de inóculo padronizado para cada microrganismo, como controle positivo, para o crescimento microbiano.

### **3.3 DESCONTAMINAÇÃO**

#### **3.3.1 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)**

Após o preparo dos inóculos, foram transferidos 5 mL de inóculo, para placas de Petri estéreis (n = 4), de cada microrganismo de acordo com os grupos aPDT-SA e aPDT-B. Todas as placas receberam tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana, em capela de fluxo laminar, sendo colocados 5 mL do corante azul de toluidina O – TBO (Sigma-Aldrich – Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo/SP/Brasil) nas placas durante um minuto (Figura 2A), na concentração de 100 µg/mL (SALMERON

---

---

et al., 2013). Em seguida, foi realizada a irradiação com o equipamento Whitening Lase II (DMC Equipamentos Ltda – São Carlos/SP/Brasil) (Figura 2B), de acordo com o protocolo abaixo (BATALHA, 2019) (Tabela 1).

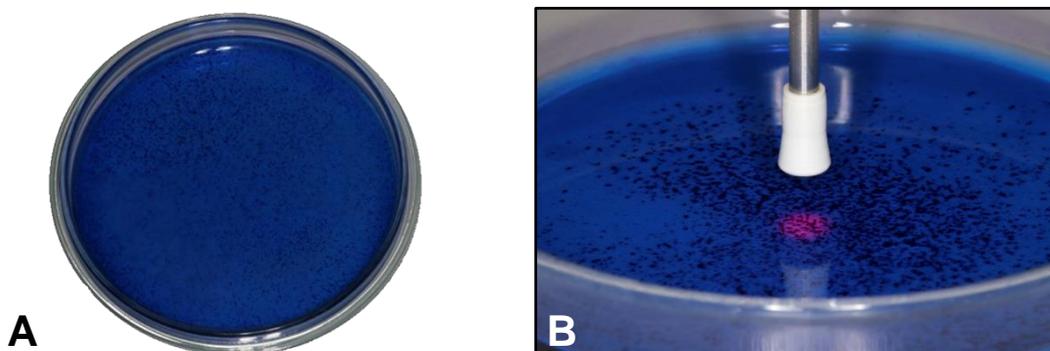


Figura 2 – A) Placa contendo microrganismos e corante TBO aplicado por 1 minuto antes da irradiação. B) Irradiação da placa com laser vermelho de acordo com protocolo

Tabela 1 – Protocolo de irradiação com laser em baixa intensidade (BATALHA, 2019)

Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Fluência (J/cm <sup>2</sup> )	Modo de emissão	Modo de aplicação	Tempo de exposição (s)
660 (vermelho)	30	50	Contínuo	Varredura	47

### 3.3.2 Laser em baixa intensidade

Da mesma maneira, após o preparo dos inóculos foram transferidos 5 mL de inóculo, para placas de Petri estéreis (n = 4), de cada microrganismo de acordo com os grupos LBI-SA e LBI-B que receberam tratamento com laser em baixa intensidade. As placas foram irradiadas com laser vermelho (Whitening Lase II, DMC Equipamentos Ltda – São Carlos/SP/Brasil) (Figura 3), por um único operador, de acordo com o protocolo citado para a aPDT (BATALHA, 2019) (Tabela 1).

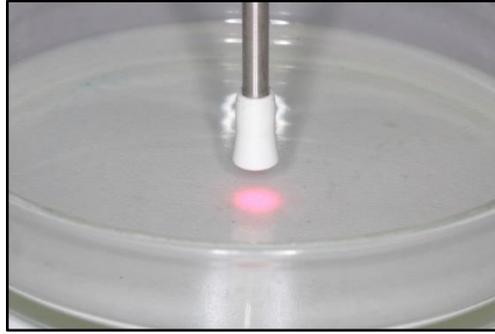


Figura 3 – Placa sendo irradiada com laser em baixa intensidade de acordo com protocolo

### **3.4 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCs)**

Após realizados os tratamentos antimicrobianos, o material de todas as placas, inclusive dos grupos-controle positivos, foram diluídos até a concentração de  $10^{-3}$  e 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra e diluição foram transferidos para placas de ágar sangue, em duplicata, as quais foram armazenadas em jarra de  $\text{CO}_2$ , garantindo uma condição de microaerofilia e acondicionadas em estufa por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , para permitir o crescimento das colônias. Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs), a olho nu (ZAPATA et al., 2012), por um examinador calibrado.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação das unidades formadoras de colônias entre os quatro grupos foi utilizado o teste ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey. Para a comparação das unidades formadoras de colônias entre os grupos B e SA que receberam os tratamentos com aPDT e LBI, separadamente, foi utilizado o teste t independente. Os testes foram realizados com auxílio do *software Statistica* (Statistica for Windows versão 10.0, Statsoft – Tulsa/Oklahoma/EUA). Os dados foram considerados significantes para  $p < 0,05$ .

---

---

# **4 RESULTADOS**

---

---

## 4 RESULTADOS

Houve diferença estatisticamente significativa no número de unidades formadoras de colônias (UFCs) entre os grupos avaliados, tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para biofilme oral (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônias (UFCs) dos grupos experimentais (comparação intergrupos – *Staphylococcus aureus*)

Grupos	aPDT-SA	LBI-SA	CP-SA	p
<b>UFCs</b>	3,23 x 10 <sup>6</sup> (0,10) <sup>b</sup>	4,10 x 10 <sup>6</sup> (0,12) <sup>c</sup>	5,81 x 10 <sup>6</sup> (0,16) <sup>d</sup>	0,000*

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Tabela 3. Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônias (UFCs) dos grupos experimentais (comparação intergrupos – Biofilme oral)

Grupos	aPDT-B	LBI-B	CP-B	p
<b>UFCs</b>	2,79 x 10 <sup>6</sup> (0,13) <sup>b</sup>	3,69 x 10 <sup>6</sup> (0,20) <sup>c</sup>	5,18 x 10 <sup>6</sup> (0,43) <sup>d</sup>	0,000*

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Ambos tratamentos, terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e laser em baixa intensidade (LBI), reduziram o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de forma significativa para os dois tipos de cultura, aPDT-SA ( $3,23 \times 10^6 \pm 0,10$ ), LBI-SA ( $4,10 \times 10^6 \pm 0,12$ ), aPDT-B ( $2,79 \times 10^6 \pm 0,13$ ) e LBI-B ( $3,69 \times 10^6 \pm 0,20$ ) quando comparados aos grupos-controle positivos CP-SA ( $5,81 \times 10^6 \pm 0,16$ ) e CP-B ( $5,18 \times 10^6 \pm 0,43$ ), respectivamente ( $p = 0,000$ ) (Gráfico 1).

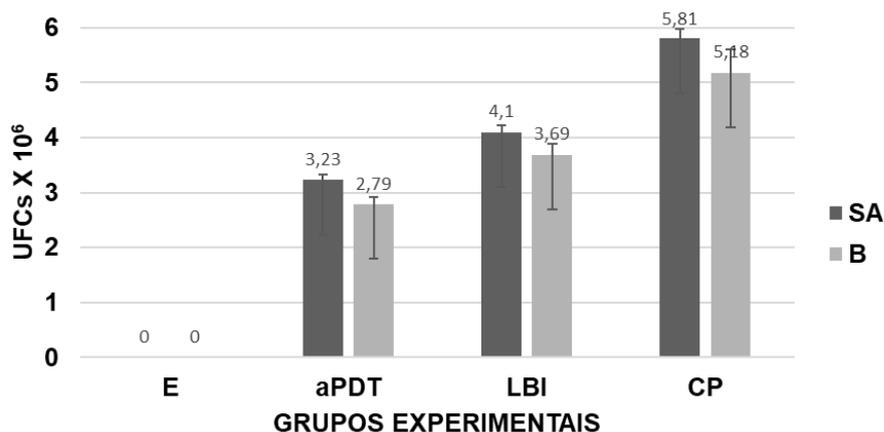


Gráfico 1 - Distribuição das médias e desvios padrão de UFCs nos grupos experimentais

Quando comparados os grupos aPDT-SA e aPDT-B e LBI-SA e LBI-B também houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,000$ ). A terapia fotodinâmica antimicrobiana reduziu mais o número de UFCs do que o laser em baixa intensidade tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para biofilme oral (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4. Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônias (UFCs) dos grupos-teste comparados separadamente (aPDT)

Grupos experimentais	aPDT-SA	aPDT-B	p
UFCs	$3,23 \times 10^6$ (0,10)	$2,79 \times 10^6$ (0,13)	0,000*

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$

Tabela 5. Médias e desvios padrão das unidades formadoras de colônias (UFCs) dos grupos-teste comparados separadamente (LBI)

Grupos experimentais	LBI-SA	LBI-B	p
UFCs	$4,10 \times 10^6$ (0,12)	$3,69 \times 10^6$ (0,20)	0,000*

\*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$

A ação antimicrobiana de ambos tratamentos foi mais efetiva contra o biofilme do que contra o *S. aureus* ( $p = 0,000$ ). Entretanto, nenhum deles conseguiu eliminar por completo os microrganismos (grupo E =  $0,00 \times 10^6 \pm 0,00$ ;  $p = 0,000$ ).

# **5 DISCUSSÃO**

---

---

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho, por meio de estudo *in vitro*, utilizando laser em baixa intensidade (LBI) e terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), mostraram-se favoráveis quanto ao emprego desses métodos para redução no número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de culturas de biofilme oral e *Staphylococcus aureus*. Conforme dito anteriormente, a peri-implantite é uma condição clínica complexa e que apresenta microbiota igualmente complexa, variável e heterogênea (SCHWARZ et al., 2018) composta, em sua maioria, por microrganismos anaeróbicos Gram negativos, principalmente, periodontopatógenos e microrganismos oportunistas (RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016).

Relatos na literatura sugerem que, uma vez contaminada a superfície do implante, são necessários tratamentos especiais para a remoção do biofilme (FREUDENBERG; GALANOS, 1990). Métodos mecânicos apresentam bons resultados, mas parecem não serem suficientes para a descontaminação completa do titânio em virtude das irregularidades de superfície que dificultam o processo de limpeza (RENVERT et al., 2009). Sendo assim, a associação de métodos adjuntos, por meio do uso de antimicrobianos e antibióticos, pode melhorar os resultados do ponto de vista de erradicação dos microrganismos. Sob essa ótica, encontrar qual método químico é mais efetivo contra os tipos de microrganismos envolvidos no quadro clínico da peri-implantite representa um importante passo no estabelecimento de protocolos para o tratamento da doença.

O biofilme oral utilizado neste estudo encontrava-se armazenado congelado e foi coletado, anteriormente (BATALHA, 2019; BUENO, 2019), de um voluntário diagnosticado com periodontite crônica (ARMITAGE, 1999). Essa amostra de biofilme subgingival foi selecionada devido às semelhanças com a microbiota apresentada nos casos de peri-implantite, referente aos patógenos periodontais aeróbicos Gram negativos. A análise morfotintorial realizada logo após a sua coleta (BATALHA, 2019; BUENO, 2019) revelou a presença de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, entretanto, não houve caracterização do biofilme com identificação dos microrganismos em virtude da necessidade de análises mais complexas e que demandam maior custo e equipamentos específicos. Mesmo diante dessas limitações,

---

o modelo escolhido é bastante representativo e já foi utilizado em experimentos anteriores, inclusive por este grupo e dentro dessa linha de pesquisa, com resultados bastante interessantes (ZAPATA et al., 2012; BATALHA, 2019; BUENO, 2019). Já a cepa de *S. aureus* selecionada é padrão (ATCC 25923).

O *S. aureus* parece ser um microrganismo que merece atenção especial em todo esse processo devido a sua capacidade de aderir firmemente à superfície de titânio (HARRIS; RICHARDS, 2004) e participação na formação do biofilme como colonizador primário, criando condições favoráveis à adesão de bactérias de colonização tardia (PERSSON; RENVERT, 2014). Desse modo, a infecção por *S. aureus* pode ser importante no desenvolvimento da peri-implantite (PERSSON; RENVERT, 2014; CAI et al., 2019) sendo relevante a descoberta de protocolos realmente eficazes contra esse microrganismo.

Neste estudo, foram propostos dois protocolos de ação antimicrobiana utilizando LBI e aPDT. O protocolo referente ao laser em baixa intensidade foi adaptado de um protocolo utilizado por Salmeron et al. (2013) para descontaminação de discos de titânio contaminados por biofilme oral *in situ* e avaliado *in vivo*. A adaptação foi com relação aos parâmetros de fluência e tempo de exposição que precisaram ser alterados em virtude do equipamento utilizado. No estudo desses autores, a fluência e o tempo de exposição foram menores, 45 J/cm<sup>2</sup> e 30 segundos, respectivamente, mas apresentaram resultados semelhantes ao deste trabalho, com bom potencial de descontaminação dos discos utilizando LBI. Os resultados aqui apresentados sugerem boa efetividade do LBI, nos parâmetros utilizados, com redução significativa no número de UFCs tanto no grupo do biofilme oral (LBI-B: 3,69 x 10<sup>6</sup>) quanto no grupo do *S. aureus* (LBI-SA: 4,10 x 10<sup>6</sup>) comparados aos grupos-controle positivos (CP-B: 5,18 x 10<sup>6</sup> e CP-SA: 5,81 x 10<sup>6</sup>) (p = 0,000).

Sousa et al. (2016) utilizaram o mesmo comprimento de onda e a mesma potência (660 nm; 30 mW) e obtiveram redução no crescimento de *S. aureus* com a diferença de que utilizaram fluências menores que as usadas neste estudo. Inclusive, esses autores discutem que, independentemente do espectro de luz, elementos como potência, esquema de pulsos e frequência também são fatores determinantes para inibição do crescimento bacteriano (SOUSA et al., 2016).

---

Efeitos diferentes podem ser verificados na ação do laser sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas (SOUSA et al., 2016) o que pode explicar, em parte, os melhores resultados obtidos, neste estudo, pelo LBI na redução do biofilme oral quando comparado ao *S. aureus*. Bactérias Gram positivas apresentam paredes mais espessas e sua parede celular, geralmente, contém uma variedade de substâncias aniônicas que podem se ligar fortemente a peptídeos/proteínas catiônicas, como o ácido lipoteicoico (LTA) e peptidoglicanos, ao contrário das Gram negativas cujas paredes são mais finas e possuem uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos (SOUSA et al., 2016). Tais diferenças estruturais podem afetar a penetração da irradiação a laser e mediar diferenças na suscetibilidade a essa irradiação (SOUSA et al., 2016). Uma hipótese que pode ser levantada sobre o efeito inibitório da irradiação com laser refere-se à absorção de fótons (SOUSA et al., 2016). Cromóforos intracelulares conseguem excitar oxigênio por meio da cadeia de transporte de elétrons em células eucarióticas (KUSHIBIKI et al., 2013). A porfirina intracelular também pode ser responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (PAPAGEORGIOU; KATSAMBAS; CHU, 2000) que podem promover efeitos tóxicos associados com o estresse oxidativo, culminando na morte celular (VATANSEVER et al., 2013).

Os estudos ainda apresentam dados controversos com relação a ação antimicrobiana do laser, considerando a dificuldade de padronização dos protocolos pela quantidade de parâmetros envolvidos e o tipo de laser empregado. Nas últimas décadas, a associação de LBI à fotossensibilizadores também tem sido usada para reduzir ou eliminar bactérias, na chamada terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (SALMERON et al., 2013; CHENG et al., 2016). Neste estudo, o protocolo de aPDT utilizado foi o mesmo usado por Batalha (2019) em seu experimento para descontaminação de implantes *in vitro*, buscando validar os bons resultados apresentados. Assim como no trabalho de Batalha (2019), embora empregando metodologias diferentes, neste estudo a aPDT também teve resultados significativos na redução do número de UFCs tanto para biofilme oral (aPDT-B:  $2,79 \times 10^6$ ) quanto para *S. aureus* (aPDT-SA:  $3,23 \times 10^6$ ) comparados aos grupos-controle positivos (CP-B:  $5,18 \times 10^6$  e CP-SA:  $5,81 \times 10^6$ ) ( $p = 0,000$ ). Salmeron et al. (2013), utilizaram esse mesmo protocolo de aPDT, apenas diferente nos parâmetros de irradiação do LBI, e obtiveram resultados semelhantes. Zapata et al. (2012) utilizaram o mesmo protocolo

---

de Salmeron et al. (2013) e tiveram resultados positivos com descontaminação *in vitro* de discos de titânio. Embora esses resultados tenham sido semelhantes aos aqui apresentados, esses estudos foram realizados em discos de titânio e não sobre os microrganismos em cultura, além disso, verificaram apenas ação sobre biofilme oral.

Os efeitos da aPDT envolvem vários parâmetros, não só referentes ao LBI, mas referentes ao corante também. Os corantes azuis, azul de metileno e azul de toluidina O (TBO) são os mais utilizados (PASSANEZI et al., 2015). A interação desses corantes fotossensibilizadores com o comprimento de onda do laser é fundamental para o correto funcionamento do mecanismo de ação da aPDT (JORI, 2006; PASSANEZI et al., 2015). O TBO possui intensa absorção na região de 620 – 660 nm (WAINWRIGHT; GIDDENS, 2003). Há relatos na literatura que a máxima absorção do TBO ocorre quando é exposto a comprimento de onda de 630 nm, onde apresenta melhores resultados na aPDT (ZEINA et al., 2001). O TBO tem sido preferido por interagir melhor com os lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas mesmo sem a luz (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2010), conforme trabalhos apresentados na literatura relatando uso sozinho do corante (SALMERON et al., 2013; DÖRTBUDAK et al. (2001). Estudos mostram que o TBO é efetivo contra várias bactérias, inclusive da cavidade oral (SARKAR; WILSON, 1993). Além disso, pode ser uma opção interessante para uso no tratamento da peri-implantite por apresentar pH ácido, em torno de 4,0 (DAMANTE et al., 2016), que tem potencial bactericida (BAL; EREN; BALOS, 1990).

Embora tenha sido bastante satisfatória a redução no número de UFCs para ambas culturas com ambos protocolos, ainda não foi suficiente para eliminar por completo os microrganismos. Isso sugere que, talvez, o caminho seja mesmo a associação de métodos físicos e químicos, conforme sugerido por Cai et al. (2019). Outro achado interessante foi a diferença significativa entre a redução apresentada pela aPDT comparada ao LBI, separadamente, para ambas culturas. A terapia fotodinâmica antimicrobiana reduziu mais o número de UFCs do que o laser em baixa intensidade tanto para *S. aureus* quanto para biofilme oral, apresentando ação antimicrobiana superior. A efetividade de ambos tratamentos foi melhor contra o biofilme oral do que contra o *S. aureus* ( $p = 0,000$ ) sugerindo que, talvez, protocolos diferenciados sejam necessários para melhor eficácia contra esse microrganismo.

---

Sendo assim, com base nos achados aqui e na literatura, nota-se que o emprego do LBI e da aPDT vem se mostrando eficaz para combater o crescimento de vários microrganismos, principalmente a aPDT que parece apresentar leve superioridade com relação à ação antimicrobiana, demonstrando que a sua utilização pode ser uma alternativa como terapia adjunta nos tratamentos das doenças peri-implantares. Entretanto, protocolos e terapias que empregam o laser possuem limitações, ou seja, não existem formas de aplicação específicas, salientando a necessidade da realização de novos estudos para aperfeiçoar e aprimorar os protocolos pré-existentes, já que essas terapias se demonstram bastante promissoras.

Dadas as circunstâncias, percebe-se a relevância dos estudos aqui apresentados e a necessidade de maiores esclarecimentos sobre o tema. Pesquisas que possam desenvolver um protocolo específico para aplicação clínica nos casos de peri-implantite envolvem não apenas o entendimento de toda a patogênese da doença mas, também, conhecimento da microbiota presente e da complexa formação do biofilme peri-implantar, além da real ação dos métodos de descontaminação sobre esses biofilmes impregnados nas superfícies dos implantes dentários. Maiores estudos envolvendo a microbiota presente e a ação dos métodos descontaminantes são necessários para melhor compreensão dos efeitos dos tratamentos na descontaminação das superfícies dos implantes.

---

---

## **6 CONCLUSÃO**

---

---

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e considerando as limitações deste estudo *in vitro*, foi possível concluir que os protocolos do laser em baixa intensidade e da terapia fotodinâmica antimicrobiana utilizados mostraram-se efetivos na redução das culturas de biofilme oral e *S. aureus*, com superioridade da aPDT contra o biofilme oral.

---

---

# REFERÊNCIAS

---

---

## REFERÊNCIAS

ARMITAGE, G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

BAL, B. et al. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. **J Nihon Univ Sch Dent.**, v. 32 n. 4 p. 281-93, 1990.

BATALHA, V. **Ação descontaminante da terapia fotodinâmica antimicrobiana (apdt) sobre superfície de implantes dentários – estudo microbiológico *in vitro***. 2019. 44f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro Universitário Ingá, Maringá, 2019.

BELIBASAKIS, G.N. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. **Arch Oral Biol.**, v. 59, n. 1, p. 66-72, 2014.

BERGLUNDH, T. et al. Periimplant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Clin Periodontol.**, v. 45, n. 20, p. 286-29, 2018.

CAI, Z. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. **Photodiagn Photodyn.**, v. 25 p. 382-388, 2019.

CATON, J.G. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and Key changes from the 1999 classification. **J Periodontol.**, v.89 n.1 p.S1-S8, 2018.

CHAMBRONE, L. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of periodontitis and peri-implantitis: An American Academy of Periodontology best evidence review. **J Periodontol.**, v. 89 n. 7 p. 783-803, 2018.

CHENG, Y. et al. Efficacy of adjunctive laser in non-surgical periodontal treatment: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci.**, v. 31 n. 1 p. 151-63, 2016.

---

---

DAMANTE, C.A. et al. In vitro evaluation of adhesion/proliferation of human gingival fibroblasts on demineralized root surfaces by toluidine blue O in antimicrobial photodynamic therapy. **Photodiagn Photodyn.**, v. 13 p. 303-307, 2016.

DEPPE, H. et al. Conventional versus CO<sub>2</sub> laser-assisted treatment of peri-implant defects with the concomitant use of pure-phase β-tricalcium phosphate: a 5-year clinical report. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 22 n. 1 p. 79-86, 2007.

DORTBUDAK, O. et al. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of periimplantitis. **Clin Oral Implants Res.**, v. 12 n. 2 p. 104-8, 2001.

FIGUERO, E. et al. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. **Periodontol 2000.**, v. 66, n. 1, p. 255-73, 2014.

FIGUERO, E. et al. Management of periimplant mucositis and peri-implantitis. **J Periodontol.**, v. 66, n. 1, p. 255-73, 2014.

FRAGA, R. et al. Is Antimicrobial Photodynamic Therapy Effective for Microbial Load Reduction in Peri-implantitis Treatment? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Photochem Photobiol.**, v. 94 n. 4 p. 752-759, 2018.

FREUDENBERG, M.A.; GALANOS, C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. **Int Rev Immunol.**, v. 6 n. 4 p. 207-2, 1990.

HARRIS, L.G.; RICHARDS R.G. Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces. **J Mat Sci Mat Med.**, v. 15 p. 311-314, 2004.

HAYEK, R.A. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature induced peri-implantitis in dogs. **J Periodontol.**, v. 76 n. 8, p. 1275-81, 2005.

HEITZ-MAYFIELD, L.J.A.; LANG, N.P. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. **Periodontol 2000.**, v. 53, p. 167-181, 2010.

HEITZ-MAYFIELD, L.J.A.; SALVI, G.E. Peri-implant mucositis. **J Periodontol.**, v. 89, n. 1, p. 257-266, 2018.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**, v. 25, p. 505–520, 2006.

---

---

KOTSOVILIS, S. et al. Therapy of peri-implantitis: a systematic review. **J Clin Periodontol.**, v. 35, n. 7, p. 621-29, 2008.

KREISLER, M. et al. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er: YAG laser and an air powder system. **Clin Oral Implants Res.**, v. 16, n. 1, p. 36-43, 2005.

KUSHIBIKI, T. et al. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. **Photomed Laser Surg.**, v. 31 n. 3 p. 95–104, 2013.

LANG, N.P. et al. Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. **Clin Oral Implants Res.**, v. 4, n.1, p. 2-11, 1993.

LAFURIE, G.I. et al. Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review. **J Periodontol.**, v. 88, n. 10, p. 1066-1089, 2017.

LANG, N.P. et al. Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. **Clin Oral Implants Res.**, v. 4, n.1, p. 2-11, 1993.

LEONHARDT, A. et al. Microbial findings at failing implants. **Clin Oral Implants Res.**, v. 10 p. 339–345, 1999.

MOMBELLI, A.; DÉCAILLET, F. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **J Clin Periodontol.**, v. 38 n. 11 p. 203–13, 2011.

OLIVEIRA R.R.; SCHWARTZ-FILHO, H. O. Antimicrobial photodynamic therapy in the non- surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. **J Periodontol.** v. 78 p. 965–973, 2007.

PAPAGEORGIU, P. et al. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. **Br J Dermatol.**, v. 142 n. 5 p. 973–978, 2000.

PASSANEZI, E. et al. Lasers in periodontal therapy. **Periodontol 2000.** v. 67 n. 1 p. 268-91, 2015.

PERSSON R.; RENVERT S. Cluster of bacteria associated with periimplantitis. **J Periodontal Res.**, v. 51 n. 6 p. 689–698, 2014.

QUIRYNEN, M. et al. Implant therapy: 40 years of experience. **Periodontol 2000.**, v. 66, n. 1, p. 7-12, 2014.

---

---

RAKIC, M. et al. **The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review.** *Int J Oral Maxillofac Implants.*, v. 31 n. 2 p. 359-6, 2016.

RENVERT, S. et al. Mechanical non-surgical treatment of peri-implantitis: a double-blind randomized longitudinal clinical study. I: clinical results. *J Clin Periodontol.*, v. 36, p. 604–609, 2009.

RENVERT, S.; POLYZOIS, I. Treatment of pathologic peri-implant pockets. *Periodontol 2000.*, v. 76, n. 1, p. 180-190; 2018.

ROSEN P.S. et al. A pilot study on the efficacy of a treatment algorithm to detoxify dental implant surfaces affected by peri-implantitis. *Int J Periodont Rest.*, v. 38, n. 2, p. 261-267, 2018.

SALMERON, S. et al. Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol.*, v. 84, n. 5, p. 641-49, 2013.

SARKAR, S., WILSON, M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.*, v. 28 n. 3 p. 204-10, 2018.

SCHWARZ, F. et al. Impact of the method of surface debridement and decontamination on the clinical outcome following combined surgical therapy of peri-implantitis: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol.*, v. 38 p. 276-284, 2011.

SCHWARZ, F. et al. Peri-implantitis. *J Periodontol.*, v. 89, n. 1, p. 267-290, 2018.

SINJAB, K. et al. Decision making for management of periimplant diseases. *Implant Dent.*, v. 27, n. 3, p. 1-6, 2018.

SOUSA, N.T.A. et al. Red and infrared laser therapy inhibits in vitro growth of major bacterial species that commonly colonize skin ulcers. *Laser Med Sci.*, v. 31 p. 549-556, 2016.

TASTEPE, C.S. et al. Air powder abrasive treatment as an implant surface cleaning method: A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, v. 27, n. 6, p. 1461–1473, 2012.

---

---

USACHEVA, M.N. et al. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg Med.**, v. 29, p. 165–173, 2010.

VATANSEVER, F. et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **Microbiol Rev.**, v. 37, n. 6, p. 955–989, 2013.

WAINWRIGHT, M. et al. Phenothiazinium photosensitizers: choice in synthesis and application. **Dyes Pigm.**, v. 57, p. 245–257, 2003.

ZAPATA, H.F.N. et al. Análise microbiológica do efeito de terapia fotodinâmica antimicrobiana na descontaminação de superfície de titânio. **Full Dent Sci.**, v. 3 n. 11, p. 279-284, 2012.

ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.*, p.144-274, 2001.

---

---