



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

**ADÁLIA SAMARA GADÊLHA DE HOLANDA LIMA**

**EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES MADUROS DE**  
***Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO***

**FORTALEZA**

**2018**

ADÁLIA SAMARA GADÊLHA DE HOLANDA LIMA

EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES MADUROS DE  
*Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L696e Lima, Adália Samara Gadêlha de Holanda.  
Efeito do plasma de baixa temperatura em biofilmes maduros de *Streptococcus mutans* : estudo in vitro / Adália Samara Gadêlha de Holanda Lima. – 2018.  
-45 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.
1. Gases em plasma. 2. Placa Dentária. 3. Cárie Dentária. 4. *Streptococcus mutans*. I.  
Título.

CDD 617.6

---

ADÁLIA SAMARA GADÊLHA DE HOLANDA LIMA

EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA EM BIOFILMES MADUROS DE  
*Streptococcus mutans* - ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: 26/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ramille Araújo Lima

Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dedico esta vitória primeiramente a Deus, por me proporcionar sempre mais do que eu mereço. Aos meus familiares, por me apoiarem neste desafio e em todos os outros também, em especial ao bebê que está por vir e que já é o motivo da maior alegria e motivação, ao meu esposo, André Lima, à minha mãe, Maria Das Dôres e aos meus irmãos, Sara e Sávio que nunca me deixaram desamparados em momento algum e que celebram comigo mais esta conquista.

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará**, na pessoa do seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Henry de Holanda Campos**; à **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem**, na pessoa da sua diretora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage**; ao **Curso de Odontologia**, na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Juliano Santori Mendonça**; ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Vicente de Paulo Aragão Sabóia**, pela participação desta conceituada instituição na minha formação científica, profissional e pessoal.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha estimada **Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos**, pela dedicação, paciência, apoio, ensinamentos, palavras sábias. Exemplo de pessoa e profissional a quem devo grande parte do aprendizado obtido nestes dois anos.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage**, pelos direcionamentos, ajuda, paciência e tranquilidade com que sempre nos recebeu e pela contribuição enorme no trabalho, desde a elaboração, qualificação e principalmente nesta reta final do processo.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Duarte**, o meu reconhecido agradecimento pelo apoio nos experimentos, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho, por tão generosamente e prontamente esclarecer as nossas dúvidas durante a execução das atividades.

À **Central Analítica - UFC/CT - INFRA/MCTI - SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES. (UFC)**, na pessoa do Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel.

Aos **professores do curso de Pós-Graduação em Odontologia**, por trabalharem cada dia mais em busca de um melhor conceito do programa.

Aos **funcionários da pós-graduação, dos serviços gerais e portaria** pela cortesia e presteza nos serviços.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Paiva Marques Lima**, pela brilhante contribuição na qualificação do projeto de pesquisa.

À **Profª. Drª. Ramille Araújo Lima**, por estar sempre à disposição, pela amizade, pelo apoio incondicional no trabalho e pelo exemplo de caráter, retidão e dedicação à pesquisa.

À minha colega de pesquisa, confidente, amiga, **Hellen Súzany Freire Silva**, sem a qual este caminho teria sido muito mais difícil, por ter sido o braço direito em toda e cada etapa desta pesquisa, por me ajudar sempre e com tanto compromisso, por ser exemplo de fé e tranquilidade quando as forças me faltavam e as tribulações da vida tiravam o meu sono, pela companhia nas viagens e pelos muitos momentos de descontração.

À minha colega de pesquisa, **Daniela Nunes Pinto**, pela generosidade e doçura com que contribuiu para o meu aprimoramento no mestrado, por não deixar nunca que a correria do dia atropelasse os momentos especiais da nossa vida.

Aos colegas do grupo de pesquisa: **Roberto Haniery Pontes Alves, Paula Ventura da Silveira, Karla Shangela da Silva Alves e Maria Tayara Marques de Freitas**, pela troca de experiências e pela ajuda na execução dos trabalhos.

Aos alunos da graduação e colaboradores no laboratório: **Cibele Sales Rabelo e Victor Monteiro Pontes** por tão brilhantemente ajudarem na execução das atividades em laboratório.

Aos amigos do Laboratório, em especial **Ernanda Sales, Nara Sena, Wanessa Regis, Weslanny Moraes, Salma Araújo, Samuel Carvalho, Jamila Ricarte e David Queiroz**, sempre companheiros, tiveram a paciência de me ensinar.

Ao meu marido **André José Mota de Lima**, por se dispor a colaborar no laboratório na confecção de peças de acrílico, por contribuir nos ajustes das apresentações com o seu conhecimento na área da informática e por apoiar os meus estudos sempre e com tanto amor.

Aos meus amigos, **Patrícia Maria Costa de Oliveira, Antônia Samia Fernandes do Nascimento e Antônio Maria da Justa Sena** que sempre defenderam a educação como a maneira de transformar a vida de qualquer indivíduo e que são exemplos de onde esta ferramenta surpreendente é capaz de nos levar.

A todos que torceram por mim, o meu muito obrigada.

## RESUMO

Atualmente, os agentes antimicrobianos disponíveis não são eficazes contra biofilmes orais maduros. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do plasma de baixa temperatura de argônio no controle de biofilmes maduros formados sobre esmalte dentário humano. Adicionalmente, verificou-se também o efeito da irradiação neste esmalte subjacente ao biofilme. Biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 foram formados sobre os blocos de esmalte humano, utilizando meio de cultivo suplementado com extrato de levedura e incubados a 37°C em atmosfera parcial de 5% de CO<sub>2</sub> durante cinco dias. No 5º dia, os espécimes foram submetidos a um dos seguintes tratamentos: ST (sem tratamento), NaF (solução de fluoreto de sódio 0,05% por dez minutos), CHX (solução de clorexidina 0,12% por dez minutos), ARG1 (fluxo de argônio por um minuto), ARG5 (fluxo de argônio por cinco minutos), ARG10 (fluxo de argônio por dez minutos), PLA1 (plasma por um minuto), PLA5 (plasma por cinco minutos) e PLA10 (plasma por dez minutos). O biofilme foi coletado para ser analisado quanto à viabilidade bacteriana (através da contagem de UFC e microscopia confocal a laser) e quanto à quantidade de polissacarídeos extracelulares (análise colorimétrica). Parte dos blocos foram submetidos ao teste de microdureza superficial, espectroscopia de Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O tratamento com plasma mostrou uma redução significativa da viabilidade dos biofilmes de *S. mutans*, com diferença estatística significativa entre os grupos controle e os grupos testes PLA5 e PLA10. Quanto à análise dos polissacarídeos solúveis e insolúveis da matriz extracelular foram observadas diferenças apenas entre o grupo clorexidina e os grupos de aplicação do plasma nos polissacarídeos solúveis. Na Microscopia Confocal a Laser, a aplicação do fluxo de argônio e plasma foi suficiente para gerar alterações visíveis em 2dimensões (2D). A perda de dureza (%PMS) foi semelhante estatisticamente entre os grupos. Na microscopia de Raman, não houve diferença estatística entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos. A MEV demonstrou regiões homogêneas e lisas no esmalte. Em conclusão, o PBT aplicado por 5 e 10 minutos foi eficaz na redução do biofilme maduro de *S. mutans* sem prejudicar a superfície do esmalte sob biofilme tratado.

**Palavras-chave:** Gases em plasma. Placa Dentária. Cárie dentaria. *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

Currently available antimicrobial agents are not effective against mature oral biofilms. This work aimed to evaluate the effect of low temperature argon plasma in the control of mature biofilms formed on human dental enamel. Additionally, the effect of irradiation on this enamel underlying the biofilm was also verified. UA159 *Streptococcus mutans* biofilms were formed on the human enamel blocks using culture medium supplemented with yeast extract and incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> partial atmosphere for five days. On the 5th day, the specimens were submitted to one of the following treatments: ST (no treatment), NaF (0.05% sodium fluoride solution for ten minutes), CHX (chlorhexidine solution 0.12% for ten minutes), ARG1 (argon flux for one minute), ARG5 (argon flux for five minutes), ARG10 (argon flux for ten minutes), PLA1 (plasma for one minute), PLA5 (plasma for five minutes) and PLA10 (plasma for ten minutes). The biofilm was collected to be analyzed for bacterial viability (through counts of CFU and confocal laser microscopy) and the amount of extracellular polysaccharides (colorimetric analysis). Part of the blocks were submitted to the surface microhardness test, Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Plasma treatment showed a significant reduction in the viability of *S. mutans* biofilms, with a statistically significant difference between the control groups and the PLA5 and PLA10 test groups. As regards the analysis of the soluble and insoluble polysaccharides of the extracellular matrix, differences were observed only between the chlorhexidine group and the groups of plasma application in the soluble polysaccharides. In Confocal Laser Microscopy, the application of the argon and plasma flux was sufficient to generate visible changes in 2 dimensions (2D). The loss of hardness (%SML) was statistically similar between the groups. In Raman microscopy, there was no statistical difference between the groups submitted to the different treatments. SEM showed homogeneous and smooth regions in the enamel. In conclusion, the PBT applied for 5 and 10 minutes was effective in reducing the mature *S. mutans* biofilm without damaging the surface of the enamel under treated biofilm.

**Keywords:** Plasma Gases. Dental plaque. Dental caries. *Streptococcus mutans*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descrição dos tratamentos aos quais os biofilmes sobre os blocos de esmalte humano foram submetidos.....	19
Figura 2 – Desenho do experimento .....	20
Figura 3 – Efeito dos diferentes tratamentos na viabilidade de <i>Streptococcus mutans</i> .....	28
Figura 4 – Efeito dos diferentes tratamentos nos polissacarídeos extracelulares solúveis em água.....	29
Figura 5 – Efeito dos diferentes tratamentos nos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água.....	29
Figura 6 – Efeito dos diferentes tratamentos ST, NaF, CHX, ARG1, PLA1 e PLA10 através da proporção bactérias vivas(verde)/mortas(vermelho) por meio da análise microscopia confocal a laser.....	30
Figura 7 – Espectro de Raman plotados juntos.....	32
Figura 8 – Análise MEV, respectivamente, aos tratamentos ST, NaF, CHX, ARG1, ARG5, ARG10, PLA1, PLA5 e PLA10 em 5000x na região desmineralizada do esmalte.....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados da dureza superficial final (Mdf) e perda da dureza de blocos submetidos a diversos tratamentos (%PMS) .....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Ampere
ARG	Argônio
BHI	Brain Heath Infusion (infusão cérebro e coração)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior
CHX	Clorexidina
GTFs	Glicosiltransferases
h	Hora
Hz	Hertz
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
min	minuto
mW	Miliwatt
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
PLA	Plasma
PBT	Plasma de Baixa Temperatura
PEC	Polissacarídeos extracelulares
SRO	Espécies reativas de oxigênio
<i>S mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TSB	Triptic Soy Broth (caldo soja triptcaseína)
UFC	Unidades formadoras de Colônia
µL	microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	17
3 METODOLOGIA.....	18
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
5 RESULTADOS .....	28
6 DISCUSSÃO .....	34
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária está entre as doenças crônicas humanas mais prevalentes. Os relatórios da Organização Mundial da Saúde descrevem que a prevalência de cárie é de 60% a 90% em crianças em idade escolar e praticamente universal entre adultos e a saúde bucal deficiente tem um profundo efeito na saúde geral e na qualidade de vida destes indivíduos (PETERSEN *et al.*, 2005), levando a situações como o edentulismo e a dados como: no Brasil, observa-se a necessidade de prótese em 13,7% dos indivíduos examinados adolescentes, em 68,8% dos adultos e em 92,7% dos idosos (BRASIL, 2010). É uma doença bucal dependente de biofilme e carboidratos dietéticos fermentáveis são os principais fatores ambientais envolvidos em sua iniciação e desenvolvimento. Entretanto, dentre os carboidratos, a sacarose é considerada a mais cariogênica, pois, além de ser fermentada por bactérias orais, é um substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares. Portanto, enquanto o ambiente de baixo pH desencadeia o deslocamento da microflora da placa residente para uma mais cariogênica, o PEC promove mudanças na composição da matriz dos biofilmes (PAES LEME *et al.*, 2006).

Em geral, os biofilmes são comunidades estruturadas de células microbianas aderidas a uma superfície e envolvidas em uma matriz de polissacarídeos extracelulares. A matriz extracelular promove a adesão microbiana às superfícies e a coesão, além de dificultar a difusão de agentes antimicrobianos (FLEMMING; WINGENDER, 2010). As bactérias em biofilmes mostram uma patogenicidade mais elevada em comparação com os seus homólogos planctônicos (DE MELO *et al.*, 2013; HOJO *et al.*, 2009) em virtude de possuírem propriedades e padrão de expressão gênica distintos das células planctônicas, incluindo variações fenotípicas na atividade enzimática, composição da parede celular e estrutura superficial (KARYGIANNI *et al.*, 2014).

O biofilme oral é único entre os vários tipos de biofilmes (HUANG; LI; GREGORY, 2011), uma vez que normalmente requer glicoproteínas salivares para anexar ao substrato. É composto por estruturas tridimensionais complexas, formado por comunidades multi-espécies microbianas sobre o tecido oral (HE *et al.*, 2015). Um número estimado de mais de 700 espécies bacterianas, incorporadas em matriz

rica em polissacarídeo extracelular foram encontradas dentro do biofilme oral (AAS *et al.*, 2005). Apesar dos biofilmes microbianos serem responsáveis por uma variedade de infecções microbianas, tais como gengivite, cárie, periodontite (DE MELO *et al.*, 2013), somente uma pequena fração dessa população bacteriana parece estar envolvida no surgimento de doenças.

Apesar da complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental, existem evidências consideráveis de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada aos estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos. Isso se dá devido a sua presença em altos níveis imediatamente antes do surgimento das lesões, a sua habilidade em rapidamente degradar carboidratos fermentáveis promovendo a formação abundante de ácido, além da sua capacidade de tolerar ambientes com baixo pH (SVENSATER *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2014). Em adição, *S. mutans* tem alta afinidade à superfície dentária mediada pela presença de adesinas e polissacarídeos extracelulares que contribuem para a sua patogenicidade (SENADHEERA *et al.*, 2005). Desta forma, na presença de sacarose, *S. mutans* passa a sintetizar enzimas glicosiltransferases (B, C e D) cuja ação integrada é essencial para adesão celular ao dente (COLBY; RUSSELL, 1997).

A remoção do biofilme das superfícies dos dentes pode ser facilitada por meio de estratégias que interferem com a matriz do biofilme ou interrompendo o próprio desenvolvimento do biofilme maduro ou ainda prevenindo que as bactérias produtoras de matriz habitem o biofilme, limitando estas e outras bactérias de uma forma mais ampla. No entanto, nenhum dos agentes antiplaca disponíveis atualmente no mercado é eficaz contra biofilmes maduros (KARYGIANNI *et al.*, 2016). As técnicas desenvolvidas para erradicar bactérias indesejáveis incluem a utilização de antibióticos, de calor, de pressão, de ultravioleta (UV) e, mais recentemente, de terapia fotodinâmica, de antimicrobianos nano particulados, de superfícies nano estruturadas, de peptídeos antibacterianos e de Plasma de Baixa Temperatura (PBT) (WILSON; PATTERSON, 2008; BROGDEN; BROGDEN, 2011; HASAN; CRAWFORD; IVANOVA, 2013; CARJA *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2009, GHERARDI; TONINI; COLOMBO, 2017).

O plasma é o quarto estado da matéria, sendo constituído por gás ionizado neutro, gerado a partir de uma variedade de gases ou misturas de gases como: o

argônio, o hélio, o ozônio ou gás oxigênio. É constituído por partículas em interação permanente, que incluem fótons, elétrons, íons positivos e negativos, átomos, radicais livres e moléculas excitadas e não excitadas (MOREAU; ORANGE; FEUILLOLEY, 2008), os quais podem contribuir para suas propriedades antibacterianas. Em geral, existem dois tipos de plasmas gasosos, que são classificados de acordo com as condições em que são criados. Os plasmas térmicos são obtidos a alta pressão ( $\geq 10^5$  Pa), precisam de um maior poder substancial (até 50 MW), a temperatura do gás é similar para todos os componentes do plasma e pode ser muito elevada (5 a  $20 \times 10^3$  K). Os plasmas não térmicos ou de baixa temperatura são obtidos a pressões mais baixas e usam menor poder substancial sendo caracterizados por uma temperatura mais elevada dos elétrons do que a do gás (temperatura macroscópica) e conseqüentemente não apresentam um equilíbrio termodinâmico local (MOREAU *et al.*, 2008; SCHOLTZ *et al.*, 2015).

Sladek *et al.* (2007) demonstraram os efeitos inibitórios de um tratamento com plasma atmosférico não térmico contra um biofilme de *S. mutans*. Koban *et al.* (2011) avaliaram o efeito de três diferentes dispositivos plasmáticos na redução de *S. mutans* e biofilmes multi-espécies de saliva humana que foram cultivados em discos de titânio (Ti) *in vitro* em comparação com clorexidina. Idlibi *et al.* (2013) avaliaram a degradação de biofilmes orais cultivados *in situ* em discos de Ti usinados por plasma atmosférico frio. Delben *et al.* (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano do plasma frio de pressão atmosférica em biofilmes orais patogênicos de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Os resultados dos estudos acima confirmam a eficácia antimicrobiana do Plasma de Baixa Temperatura (PBT) contra bactérias associadas ao biofilme oral.

Entre as vantagens do PBT sobre o uso de antibióticos é que ele pode ser usado para um tratamento localizado, fornecendo uma resposta bactericida em segundos, o que torna a probabilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana ao PBT baixa. Além disso, a terapia tem demonstrado efeitos colaterais mínimos; a segurança biológica do plasma frio à pressão atmosférica foi avaliada no epitélio oral reconstituído *in vitro* (Delben *et al.*, 2016). Baixa citotoxicidade e alta viabilidade do epitélio oral foram observadas após a exposição ao plasma. Além disso, nenhum sinal de necrose e manutenção da proliferação celular no epitélio tratado com plasma foi observado. A temperatura do PBT é compatível com os tecidos

mamíferos, o que também incentiva a sua utilização *in vivo* (FLUHR *et al.*, 2011; PARTECKE *et al.*, 2012).

Espécies reativas são geradas transitoriamente pelo PBT através de diversas vias de colisões e dissociações. Estas espécies reativas oxidantes têm fortes efeitos sobre as estruturas externas das células, seja um revestimento de esporos ou de uma membrana celular. As gorduras insaturadas na bicamada lipídica das membranas celulares são susceptíveis ao ataque por radicais de hidroxila, comprometendo a função da membrana e as proteínas em membranas. Uma vez que a membrana celular foi parcialmente degradada, as espécies reativas podem danificar o material genético e as moléculas dentro do microrganismo, levando a sua destruição (HOFFMANN; BERGANZA; ZHANG, 2013; MAI-PROCHNOWA *et al.*, 2014; SCHOLTZ *et al.*, 2015).

O tratamento com PBT pode inibir completamente a formação de um biofilme rico em matriz (DUARTE *et al.*, 2011). Assim, a tecnologia do PBT tem recebido crescente atenção como uma possível terapia para o controle e/ou prevenção da formação de biofilmes. Muitos estudos sugerem a terapia com PBT como um importante agente antibacteriano, mas relatam terapias utilizando uma variedade de diferentes dispositivos geradores de plasma com diferentes tipos de gases e tempo de tratamentos dos biofilmes diferentes, o que torna um desafio mostrar a reprodutibilidade dos resultados. Em contraste com seu efeito antimicrobiano, ainda não está elucidado como o PBT afeta o biofilme, especificamente as propriedades da matriz. Além disso, é necessário determinar que o regime de tratamento com PBT seja seguro para os tecidos dentais antes que este seja recomendado para o uso clínico (KOBAN *et al.*, 2011; DU *et al.*, 2012).

Em adição ao tratamento dentário fornecido aos pacientes em uma prática odontológica geral, o PBT poderia ser usado em várias situações de cuidados orais onde a remoção mecânica do biofilme é indicada. O paciente em risco poderia por exemplo ser submetido ao tratamento de PBT até que a sua saúde oral fosse restabelecida. O tratamento pode ser realizado no consultório ou, se necessário, a portabilidade dos equipamentos de PBT permitirão que no futuro a terapia seja efetuada em diferentes locais.

Este trabalho teve como intuito estabelecer condições para uso do PBT (plasma de baixa temperatura) no controle do biofilme maduro formado sobre esmalte dentário.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Estabelecer condições para uso do PBT (plasma de baixa temperatura) no controle do biofilme maduro de *Streptococcus mutans* formado sobre esmalte dentário *in vitro*.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos do PBT em três diferentes tempos de exposição (1, 5 e 10 minutos) na viabilidade celular e na quantidade de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis presentes na matriz de biofilmes maduros de *Streptococcus mutans*.
- Avaliar o efeito do plasma nas propriedades mecânicas do esmalte dentário humano sob o biofilme irradiado.

### 3 METODOLOGIA

#### Aspectos Éticos

Como a realização desta pesquisa incluiu experiências com seres humanos ou parte deles (dentes humanos, extraídos por razões que não a da pesquisa), este trabalho foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará via Plataforma Brasil, tendo sido aprovado sob CAAE: 80206617.7.0000.5054 (ANEXO A), segundo a Resolução do CNS 466 de 12/12/2012 e a Norma Operacional 001/2013.

#### Preparação dos espécimes

Para obtenção dos blocos de esmalte foram utilizados trezentos terceiros molares hígidos extraídos por razões que não as desta pesquisa e armazenados em solução de timol a 0,1% a temperatura de 4°C durante pelo menos 30 dias (WHITE; FEATHERSTONE, 1987; CURY *et al.*, 2000; ZANIN *et al.*, 2006). Foram excluídos os dentes com fraturas e rachaduras. Os blocos dentais foram fixados em peças acrílicas e cortados com o auxílio de uma cortadeira elétrica e discos de diamante. Para isso, blocos foram cortados a partir da porção central de coroas usando discos de diamante (Extec Corp®, Enfield, CT, EUA) refrigerados em água destilada e uma máquina de corte (Isomet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (MELO *et al.*, 2010). Após o corte das raízes e da face oclusal, foi obtido um fragmento dental da porção central da coroa com 4mm de espessura, o qual foi novamente fixado à peça acrílica e cortado para a obtenção de blocos dentais medindo 4x4x2mm. O ajuste do esmalte a fim de obter blocos planos foi feito com o auxílio da politriz em baixa velocidade (Arotec, Aropol 2V-PU, Cotia, SP, Brasil) e lixa de granulação 320 (Carbimet Paper Discs, Buehler-met®, IL, USA) sob refrigeração, deixando os blocos dentais com altura de 2mm.

Em seguida, os blocos foram fixados em resina acrílica, utilizando-se para isto uma placa de vidro com fio ortodôntico 0,18 adaptado, um disco de acrílico e godiva em bastão (FGM) para a fixação do espécime. Os blocos foram polidos com lixas de granulação decrescentes (GRIT 400 por 15 segundos, GRIT 600 por quarenta segundos e GRIT 1200 por dois minutos, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) na politriz automática (Automet® 250, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Entre a utilização de uma lixa e outra, os blocos foram limpos em cuba ultrassônica (ULTRA SONIC, Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com água destilada por dez minutos. O

polimento final foi feito com disco de feltro e pasta de suspensão de diamante 1 $\mu$ m (Buehler®, Illinois, USA) sem refrigeração por três minutos. A fim de evitar a desidratação, os espécimes foram armazenados em gaze umedecida em água destilada até serem utilizados.

### Seleção dos espécimes

Este polimento serviu para a determinação da microdureza de superfície inicial e subsequente seleção dos espécimes (MELLBERG; PETROU; GROTE, 1992), sendo utilizados somente os blocos com dureza de esmalte entre 276 e 345 Knoop (MEREDITH *et al.*, 1996). As análises foram realizadas através de um microdurômetro (Future-Tech®, Tóquio, Japão) acoplado a um software FM-ARS® Corp e penetrador do tipo Knoop, com carga de 25g e duração de aplicação de 5 segundos, sendo realizadas cinco penetrações no esmalte de cada bloco de dente, com distância de 100 $\mu$ m entre as mesmas. Após este processo, os blocos selecionados foram retirados do disco de acrílico e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e armazenados em umidade a 4°C até a sua utilização (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Os blocos selecionados a partir do Teste de Microdureza Knoop foram aleatorizados utilizando uma planilha no Excel, do pacote Microsoft Office e distribuídos em 9 grupos conforme o quadro abaixo.

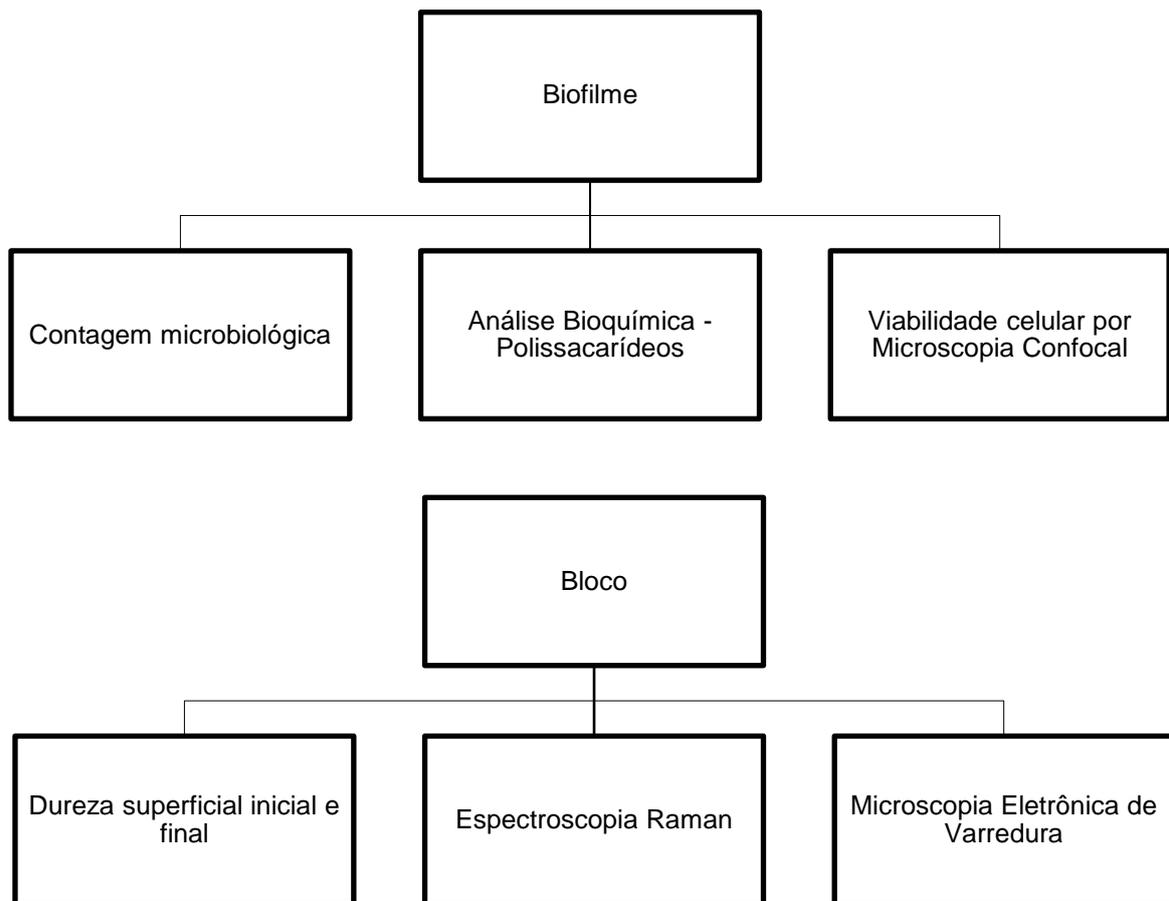
Figura 1 – Descrição dos tratamentos aos quais os biofilmes sobre os blocos de esmalte humano foram submetidos.

<b>Código</b>	<b>Tratamento realizado</b>
<b>ST</b>	Sem tratamento por 10 minutos (Controle negativo)
<b>NaF</b>	Fluoreto de sódio 0,05% por 10 minutos (Controle anti-cárie)
<b>CHX</b>	Clorexidina 0,12% por 10 minutos (Controle anti-placa)
<b>ARG1</b>	Fluxo de argônio por 1 minuto
<b>ARG5</b>	Fluxo de argônio por 5 minutos
<b>ARG10</b>	Fluxo de argônio por 10 minutos
<b>PLA1</b>	Jato de plasma por 1 minuto
<b>PLA5</b>	Jato de plasma por 5 minutos
<b>PLA10</b>	Jato de plasma por 10 minutos

## Delineamento experimental

Após a formação dos biofilmes e realização dos tratamentos, as amostras de biofilme e os blocos de esmalte humano foram analisados conforme descrito abaixo.

Figura 2 – Desenho do experimento.



## Formação da película adquirida

A película adquirida foi formada a partir de saliva humana clarificada diluída em um tampão de adsorção e foi colhida de um doador saudável (em jejum e sem higienização oral prévia) por estimulação com filme flexível (Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging, Akron, Ohio, EUA). O tampão de adsorção (KCl 50mM, KPO<sub>4</sub> 1,0mM, CaCl 1,0mM, MgCl<sub>2</sub> 0,1mM, pH = 6,5) foi adicionado à saliva na proporção de 1:1 e o fluoreto de fenilmetilsulfônico - PMSF foi adicionado na proporção de 1:1000. Após agitação a solução foi clarificada por centrifugação (centrífuga refrigerada NT 815, Novatécnica, Piracicaba, SP, Brasil) a 8.500rpm

durante 10 minutos, a 4°C e filtrada a vácuo com um filtro de 0,22µm de tamanho de poro (Stericup, Millipore, St Louis, MO, EUA) (DUARTE *et al.*, 2006). Para formação da película adquirida os blocos de esmalte humano estéreis foram incubados durante 1 hora a 37°C em um agitador orbital (Te-145, Piracicaba, SP, Brasil) imediatamente antes da inoculação das amostras.

### **Crescimento do biofilme *in vitro***

Oito colônias de *Streptococcus mutans* UA159 ATCC (Manassas, Virginia, EUA) foram obtidas a partir do crescimento em BHI, infusão cérebro e coração, (DIFCO, Detroit, Michigan, USA) ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro. As colônias foram inoculadas em caldo TSB, caldo soja triptcaseína, (DIFCO, Detroit, Michigan, USA) suplementado com extrato de levedura contendo glicose (9mL de meio e 1mL de glicose a 10%) e incubadas durante 18 horas a 37°C sob condições de microaerofilia a 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação da película adquirida, os biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159 foram formados sobre os blocos de esmalte humano em placas de poliestireno contendo 24 poços, tendo como inóculo a bactéria cultivada (durante 18h) 100uL e TSB suplementado com extrato de levedura contendo sacarose (45mL de meio para 5mL de sacarose a 10%). A cada 24h, o meio de cultivo foi trocado sem a adição de novo inóculo. Os biofilmes foram incubados a 37°C em atmosfera parcial de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 dias na estufa (Forma™ 310 Direct-Heat, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EUA) (CURY *et al.*, 2010).

### **Aplicação do plasma**

O PBT foi gerado através da ionização do gás argônio (Ar) à pressão atmosférica através de um dispositivo operatório portátil - Kinpen 09 (INP, Greifswald, Alemanha), desenvolvido pelo Instituto Leibniz de Ciências e Tecnologia de Plasma (INP). O dispositivo consiste de uma unidade de mão (170mm de comprimento, 20mm de diâmetro e 170g de peso) para a geração de um jato de plasma à pressão atmosférica, uma fonte de alimentação de corrente contínua (energia do sistema: 8W a 220V, 50/60Hz) e uma unidade de fornecimento de gás. O PBT foi gerado a partir do topo central do eletrodo e expandiu-se para o ambiente no exterior do bocal. O tratamento foi conduzido uma única vez, no 5º dia do experimento por um operador calibrado com uma distância da ponta até a amostra

de 03mm durante 01, 05 e 10 minutos. O fluxo de gás argônio (Ar) foi ajustado para 5L/min e a taxa de fluxo controlada por um controlador de fluxo (MKS Instruments, Munique, Alemanha). A seleção dos tempos de exposição foi baseada em estudo prévio (ALVES, 2016). Os blocos dos grupos NaF e CHX ficaram imersos em 2mL da respectiva solução por 10 minutos e os blocos do grupo ST não passaram por nenhum tratamento aguardando em temperatura ambiente por 10 minutos, sendo este o controle negativo. A seguir, os blocos de todos os grupos foram mergulhados 3 vezes em 1mL de solução salina (NaCl 0,89%), a fim de remover o biofilme fracamente aderido e foram coletados para análise. (Duarte *et al.*, 2006).

### **Determinação das alterações no biofilme**

#### **Análise microbiológica do biofilme formado *in vitro***

Os tratamentos foram realizados em triplicata dentro da câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP, Brasil). Após a realização dos tratamentos, amostras dos biofilmes formados foram coletadas com espátulas plásticas estéreis em tubos 50mL estéreis, contendo 5mL de solução de NaCl(cloreto de sódio) a 0,89%. O material foi vortexado (vórtex AP-56, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos LTDA, Araraquara, SP, Brasil) e sonificado (Digital Sonifer 450, 50/60Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA) com 3 pulsos de 15 segundos a 6 watts com intervalo de 15 segundos entre eles (repouso em gelo). A suspensão foi então diluída em série decimal (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000, 1:10000000) e plaqueada em duplicata em placas de Ágar Sangue, mantidos, após o plaqueamento em condições de microaerofilia à temperatura de 37°C, por 48 h. Decorrido o tempo de incubação, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada e o número de UFC/mg de biofilme estabelecido após a determinação do peso seco de cada amostra.

#### **Determinação do peso seco do biofilme**

Para a determinação do peso seco, aproximadamente 15mL de etanol frio (-20°C) foram adicionados a suspensão do biofilme, o qual ficou armazenado na geladeira por 18 horas. Após este período, o precipitado resultante foi centrifugado (3500rpm, durante 10min, a 4°C). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento lavado com 1mL de etanol frio, transferido para tubos de microcentrífuga pré-pesados (um para cada amostra de cada grupo), centrifugado novamente, o excesso de álcool foi

cuidadosamente removido e o pellet dessecado a vácuo por 48 horas, sendo realizada a pesagem final após este período.

### **Análise da composição bioquímica da matriz dos biofilmes (análise dos polissacarídeos)**

Foram realizados mais três experimentos microbiológicos para esta análise. Após a realização dos tratamentos propostos, os biofilmes formados foram coletados, lavados, sonicados para a separação das células bacterianas e centrifugados e o sobrenadante coletado para análise dos polissacarídeos extracelulares-PEC. Sucintamente, uma alíquota (5mL) da suspensão dos biofilmes foi sonicada (Digital Sonifer 450, 50/60Hz, 4A, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA), usando um pulso de 30s com uma potência de 6W e centrifugada (centrífuga refrigerada NT 815, Novatécnica, Piracicaba, SP, Brasil) durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi novamente suspenso e lavado em 4mL de água Milli - Q; este procedimento foi repetido três vezes. Todo o sobrenadante recolhido foi utilizado para o ensaio de PEC solúvel em água e o precipitado foi utilizado para os ensaios de PEC insolúvel em água. Após a coleta, os polissacarídeos presentes no sobrenadante foram precipitados no álcool absoluto gelado por 18 horas (três vezes o volume de álcool/ o volume da amostra). Para análise dos polissacarídeos solúveis em água, foi utilizado 200µL da amostra, 200µL do fenol a 5% e 1mL de ácido sulfúrico, a solução foi cuidadosamente homogeneizada e após o repouso de 20 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (DU 730, UV – VIS, Beckman, Coulter, Brea, California, EUA) com comprimento de onda de 490nm. O pellet resultante foi utilizado para a extração dos polissacarídeos insolúveis em água. A extração dos polissacarídeos insolúveis em água foi realizada com NaOH 1N (1 mg de peso seco de biofilme/ 0.3 mL de 1N NaOH), após o cálculo foi feita a adição da substância, aguardou-se duas horas em repouso e depois a amostra ficou sob agitação durante 1 h e 10 min, a 37°C. O sobrenadante foi rejeitado e o processo realizado mais três vezes. Após a preparação com NaOH, acrescentou-se álcool absoluto (na proporção de 3 vezes o valor de NaOH calculado) e os tubos para centrífuga foram armazenados na geladeira a -20°C por 18h. Para a leitura, os tubos foram centrifugados por vinte minutos, o sobrenadante rejeitado e ao pellet acrescentado NaOH. Utilizados 200µL da amostra, 200µL do fenol a 5% e 1mL de ácido sulfúrico para a leitura no

equipamento citado acima. Os PEC solúveis em água e em álcali foram submetidos à análise colorimétrica descrita por DUBOIS *et al.* (1956) tendo uma curva de glicose como padrão. O conteúdo de polissacarídeo foi expresso por mg de peso seco do biofilme. O peso seco foi feito como descrito anteriormente. As leituras foram realizadas em triplicata.

### **Análise estrutural do biofilme irradiado**

A presença de bactérias mortas e vivas foi observada por microscópio confocal de varredura a laser (CONFOCAL ZEISS LM 710, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) e analisada pelo software ZEN 2.3 SP1 (black) (versão 14.0.0.0 Carl Zeiss Microscopy GmbH). Para tanto, as amostras de biofilme de cada grupo foram coradas com kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability (Molecular Probes – Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram preparados 10mL de solução no total, contendo 3µl do corante (1,5mL do SYTO9® e 1,5mL do iodeto de propídio) e 1mL desta solução foi adicionada cuidadosamente no poço de cada amostra evitando perturbação de modo que as amostras coradas foram incubadas em ambiente no escuro durante 30 minutos antes de serem examinadas no equipamento. Cada amostra foi processada e analisada individualmente e cinco imagens de cada biofilme foram retiradas de áreas escolhidas aleatoriamente. Todas as amostras foram analisadas com uma objectiva com abertura numérica 20X, NA 1.3,  $\lambda = 488\text{nm}$ ,  $Z = 4,56$ . Cinco leituras aleatórias de cada biofilme foram realizadas e as imagens em 2D foram confeccionadas para produzir projeções XY (a soma total de brilho de pixel no eixo z) e projeções sagitais parciais (ZANIN *et al.*, 2005), utilizando o mesmo software usado para as análises (ZEN 2.3 SP1 (black) versão 14.0.0.0).

### **Determinação das alterações da superfície do esmalte**

#### **Porcentagem da perda da dureza**

Para a determinação de alterações na superfície do esmalte após a exposição aos diferentes tratamentos, os vinte e sete blocos (um bloco de cada grupo de cada uma das triplicatas para o ensaio microbiológico) foram novamente submetidos aos teste de dureza superficial final. As análises foram realizadas através de um microdurômetro Future-Tech®, acoplado a um software FM-ARS® e penetrador do tipo Knoop, através da aplicação da carga de 25g e duração de aplicação de 5

segundos, sendo realizadas cinco novas penetrações. Após os dados tabulados, foi calculada a perda mineral superficial (%PMS) em cada bloco. A porcentagem de perda de dureza da superfície (% PMS) foi obtida por subtração dos valores de dureza inicial da superfície (Mdi) e dureza final (Mdf) da seguinte forma: [% PMS = (Mdf – Mdi) × 100 / Mdi] (GONÇALVES *et al.*,2014).

### **Espectroscopia de Raman**

Os espectros foram recolhidos num espectrômetro (Xplora, Horiba Scientific, Paris, France) utilizando um laser infravermelho com comprimento de onda de 638nm, a 1% e grade 600 no programa LabSpec6 (Horiba). A amostra (bloco de esmalte humano) foi colocada sobre uma lâmina e então examinada por um microscópio Olympus acoplado ao sistema Raman e três pontos foram escolhidos para medição Raman com uma exposição de 10 segundos. O primeiro ponto foi localizado na região central do bloco de esmalte e os outros foram localizados à direita e à esquerda deste primeiro ponto. A distância entre os pontos foi de 1mm. O feixe de luz foi focado na superfície da amostra com uma objetiva x 100. O raio do feixe foi de 1µm e a irradiação de potência do laser sobre as amostras foi de 17mW. O sistema Raman foi calibrado com um semicondutor de silício, utilizando o pico Raman a 600cm<sup>-1</sup>. Todos os espectros foram coletados na região de 800 a 2000cm<sup>-1</sup> e permitiram a caracterização dos componentes minerais (hidroxiapatita). A fim de normalizar as medições e permitir a sua comparação foi utilizado o parâmetro de superfície de banda, que corresponde a área sob a curva para o “n” analisado. A curva foi identificada para cada banda usando um sistema de software OriginPro 9.0 de 32 bits (Sistema Operacional: 7, Copyright 2012 by OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Nove blocos, um de cada grupo de cada uma das três triplicatas do experimento microbiológico, foram submetidos a este teste em um total de 27 blocos.

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A fim de se observar possíveis alterações na superfície do esmalte, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada nos blocos selecionados, não submetidos a dureza superficial final.

As amostras foram sonicadas em água destilada, secadas a vácuo por vinte e quatro horas, fixadas em stubs de MEV (discos de alumínio), com fita adesiva de

carbono dupla face, codificadas e montadas em stubs de alumínio com Acheson Silver DAG (Agar Scientific, U.K.). e depois revestidas com uma camada de ouro de aproximadamente 20nm de espessura, utilizando uma unidade de revestimento Polaron. Os espécimes foram examinados sob vácuo com uma MEV (Inspeccionar<sup>TM</sup> S50, Jeol, Tóquio, Japão). As imagens foram capturadas visualmente utilizando um software específico (EDS Software para SEM, instrumentos de Oxford) e em quatro ampliações diferentes tiradas (500X, 1000X, 5000X e 10000X).

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado após a realização de um estudo piloto, tendo nível de significância de 5% e poder estatístico de 95%. Ao final, foram utilizados cento e sessenta e dois blocos. O software de programa BioEstat 5.3 para o Windows (versão 5.3 de 2007, Belém, Pará, Brasil) foi utilizado. A normalidade dos dados foi verificada usando o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov.

A média e o desvio padrão dos números de microrganismos sobreviventes para cada tratamento foram calculados. Unidades formadoras de colônias foram transformadas em log de base 10 a fim de reduzir a variância heterogeneidade. Foi realizado o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste Tukey.

Quanto a análise dos polissacarídeos extracelulares solúveis, não foi possível realizar teste paramétrico, as diferenças entre os períodos experimentais foram então avaliadas por teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por método de Dunn,  $p < 0,0001$ . Já na avaliação dos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água/solúveis em álcali entre os grupos experimentais foi realizado teste paramétrico, dados submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA).

O teste de variância (ANOVA) foi também utilizado para comparar a dureza superficial final. Já a perda de dureza superficial (% PMS) foi analisada por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

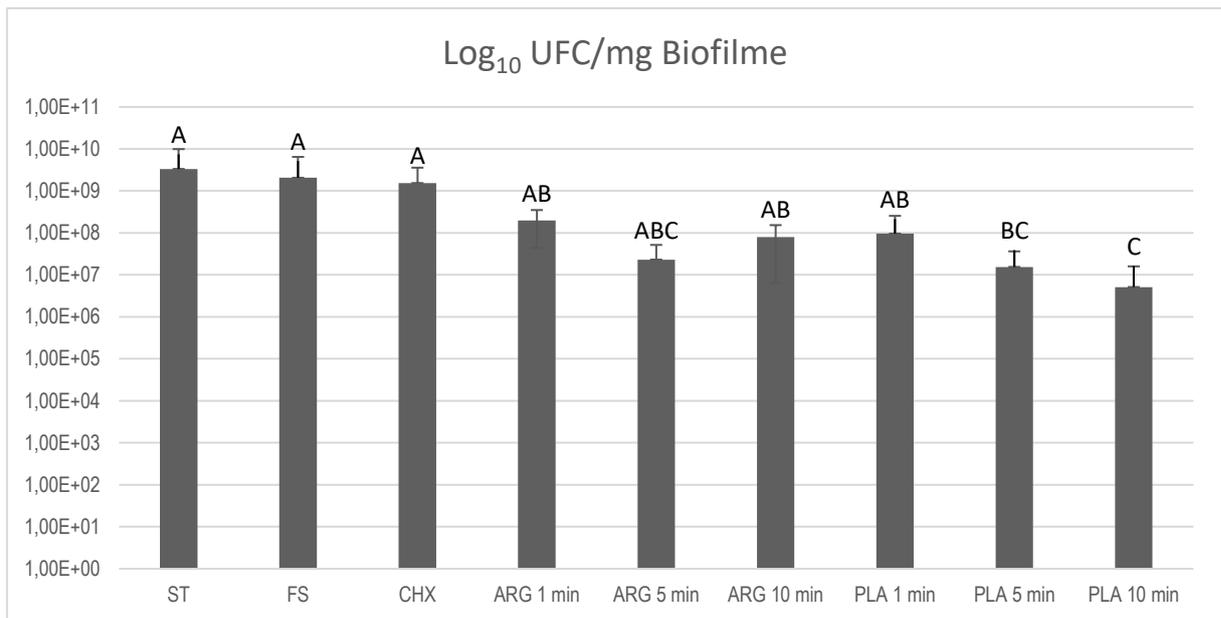
Com o objetivo de padronizar as medições e permitir a comparação, ao analisarmos as leituras obtidas pelo Raman, foi escolhida a área sob o pico mais alto e utilizado o teste de variância, após transformação linear(ANOVA).

## 5 RESULTADOS

### Viabilidade Microbiológica

O Plasma de Baixa Temperatura aplicado durante 05 e 10 minutos produziu uma redução significativa de biofilmes de *S. mutans* ( $p < 0,0001$ ), cerca de 3logs de magnitude, como pode ser observado na Figura 3. Já o tratamento único com clorexidina a 0,12%, como esperado, durante 10 minutos não afetou a viabilidade de biofilmes maduros, não tendo sido observada diferença relevante entre este grupo e os demais grupos controle. O gás argônio por 1, 5 e 10 minutos assim como o plasma por 1 e 5 minutos também foram responsáveis por diminuir a contagem destas bactérias apesar de não ter produzido numericamente uma resposta tão efetiva quanto o plasma utilizado por 10 minutos.

Figura 3 - Efeito dos diferentes tratamentos na viabilidade de *Streptococcus mutans*. Os dados foram convertidos em log de base 10 para diminuir a variável heterogeneidade. Os dados representam valores médios e barras de erro representam desvio padrão. Os dados seguidos por diferentes letras diferem estatisticamente. ( $p < 0,05$ ).



### Análise de Polissacarídeos

Podemos ver o comparativo entre os grupos tratados quanto aos polissacarídeos extracelulares solúveis na figura 4. Ao analisarmos os dados referente aos polissacarídeos solúveis, pelo método de Dunn, observou-se diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) entre o grupo clorexidina a 0,12% e os grupos plasma por 01 minuto, plasma por 05 minutos e plasma por 10 minutos, sendo observada menor quantidade de PEC solúvel nos grupos tratados com PBT. Adicionalmente, não

foram observadas diferenças entre os grupos ( $p=0,9844$ ) quando a quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água foi analisada (figura 5).

Figura 4 – Efeito dos diferentes tratamentos nos polissacarídeos extracelulares solúveis em água. Os dados representam valores médios e barras de erro representam desvio padrão. Os dados seguidos por diferentes letras diferem estatisticamente. ( $p < 0,05$ ).

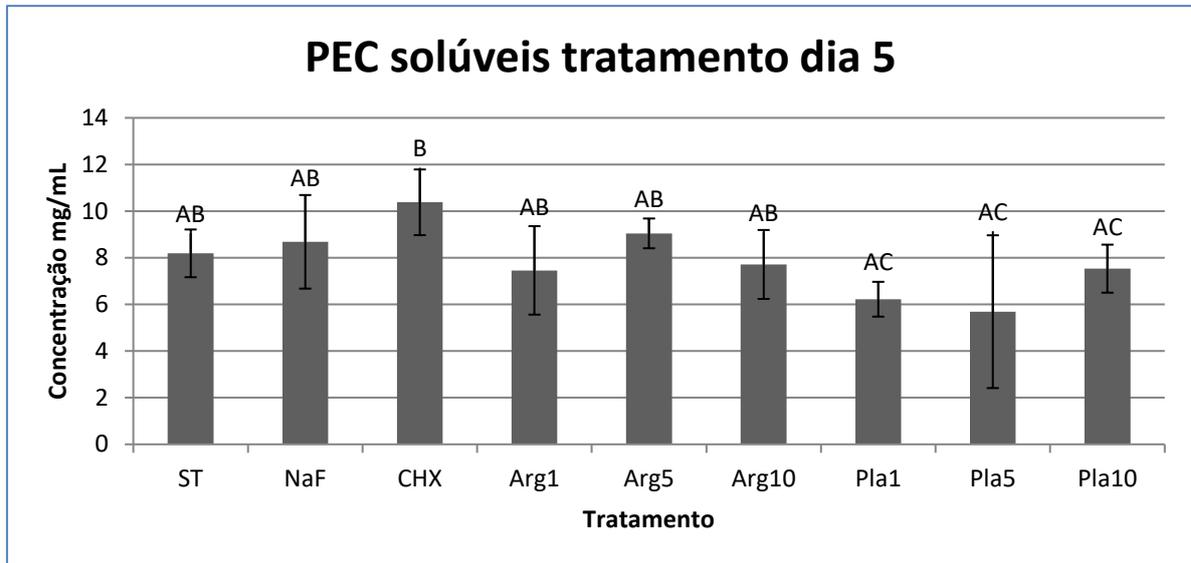
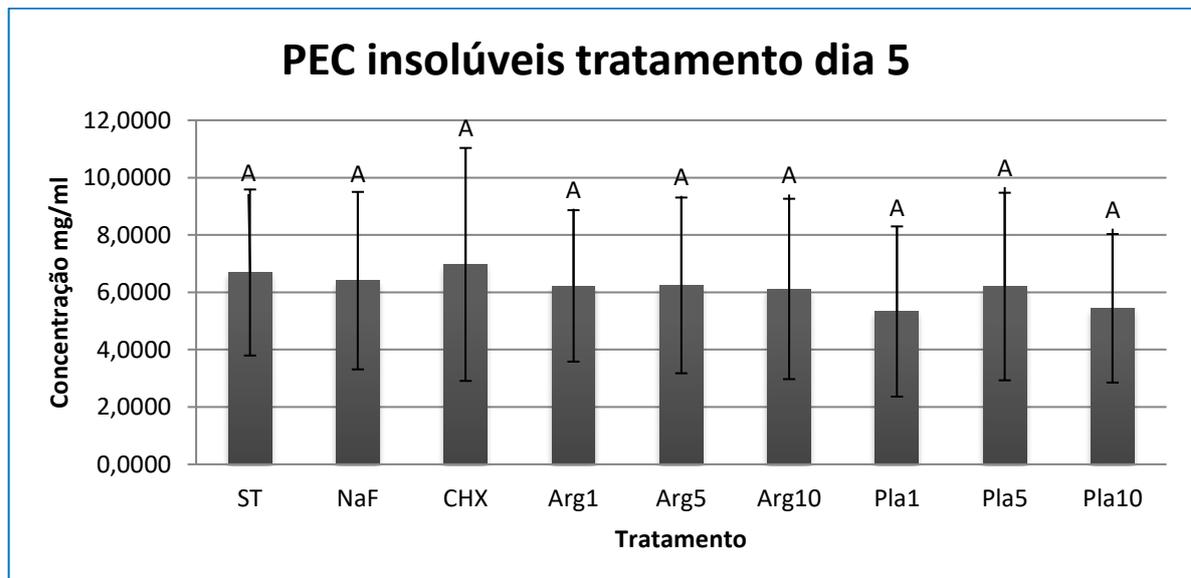


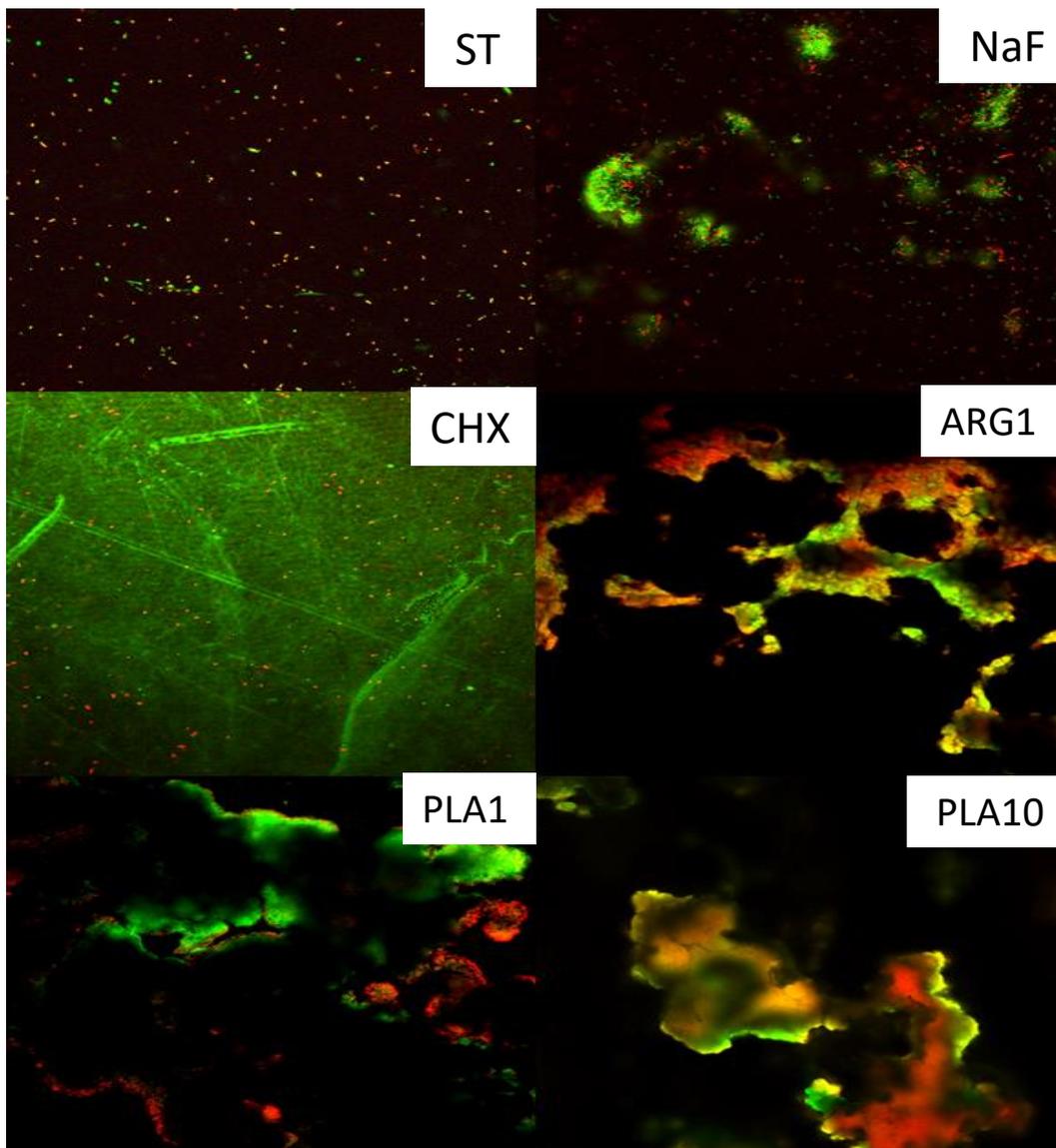
Figura 5 – Efeito dos diferentes tratamentos nos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água. Os dados representam valores médios e barras de erro representam desvio padrão. Os dados seguidos por diferentes letras diferem estatisticamente. ( $p < 0,05$ ).



## Microscopia Confocal a Laser

As alterações na biomassa do biofilme após a realização dos tratamentos propostos e a utilização do corante LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability (Molecular Probes – Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) podem ser visualizadas na Figura 6. A área total das imagens foi de 415 x 415µm, utilizando a lente Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Um único tratamento de clorexidina por 10min sobre os biofilmes maduros não produziu efeito significativo na quantidade de células vivas, enquanto a aplicação do fluxo de argônio e do PBT produziu imagens características de morte celular pela análise qualitativa utilizada.

Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos ST, NaF, CHX, ARG1 PLA1 e PLA10 através da proporção bactérias vivas (verde)/mortas (vermelho) por meio da análise microscopia confocal a laser.



### Microdureza superficial final

Após terem sido submetidos ao experimento microbiológico, um bloco de cada grupo, de cada uma das triplicatas foi novamente submetido ao teste de microdureza superficial, sendo aplicada uma carga de 25g por 5 segundos, a 100µm do local anteriormente submetido aos testes para seleção dos espécimes. Todos os blocos sofreram perda mineral pelo modelo de biofilme, confirmando que ele é cariogênico nas condições testadas. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na comparação das leituras finais ( $p=0,3024$ ), como também na comparação na perda da dureza ( $p=0,2207$ ). [% PMS =  $(Mdf - Mdi) \times 100 / Mdi$ ].

Tabela 1 - Dados da dureza superficial final (Mdf) e perda de dureza dos blocos submetidos a diversos tratamentos(%PMS).

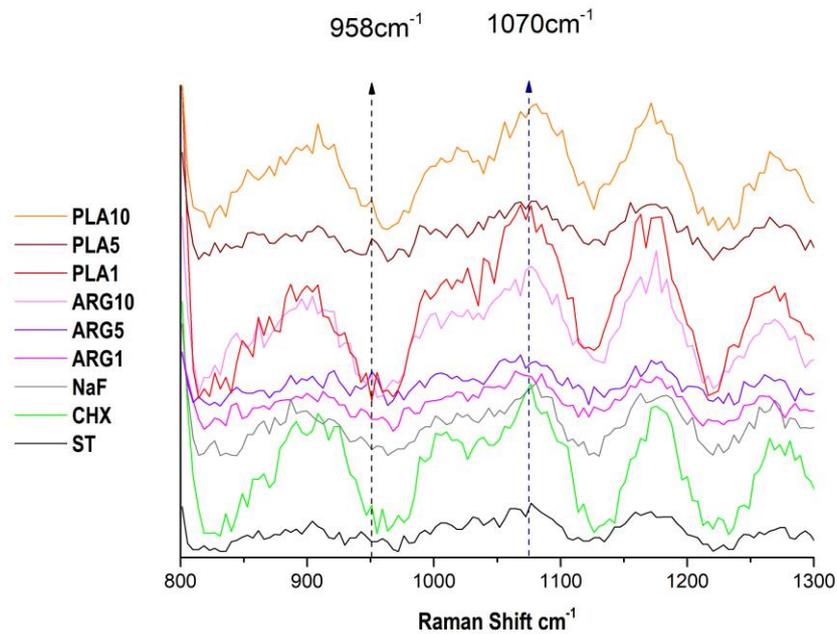
Tratamento	Microdureza Supercial (Mdf)		Perda de dureza (%PMS)
	Antes	Depois	
Sem tratamento	316,4 ±6,59a	14,9±0,46b	-92,1±0,24A
NaF a 0,05%	306,3±29,80a	21,4±11,78b	-93,1±3,62A
Clorexidina a 0,12%	298,3 ±22,57a	71,9±34,51b	-75,6±12,4A
Argônio por 01 min	300,4 ±22,59a	46,8±21,34b	-84,0±7,98A
Argônio por 05 min	286,7±10,29a	28,9±16,98b	-89,8±6,01A
Argônio por 10 min	305,3±16,70a	19,6±3,14bb	-90,6±5,26A
Plasma por 01 min	308,3±14,8a	31,6±8,33b	-89,6±6,01A
Plasma por 05 min	317,8±26,88a	83,6±96,73b	-71,8±34,38A
Plasma por 10 min	314,07±16,51a	33,4±35,61b	-89,5±11,12A

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). As letras maiúsculas comparam as colunas; letras minúsculas comparam as linhas. PMS = perda mineral de superfície.

### Espectroscopia de Raman

Os espectros Raman médios para os nove grupos de tratamento na região de 800 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  são mostrados na figura 7. Foi realizada a leitura da área sob os picos do fosfato ( $958\text{cm}^{-1}$ ) e do carbonato ( $1070\text{cm}^{-1}$ ), feita a média das áreas dos três pontos estudados e analisado estatisticamente os grupos, constatada a inexistência de diferença significativa entre os grupos Fosfato ( $p=0,3982$ ) e Carbonato ( $p=0,5307$ ).

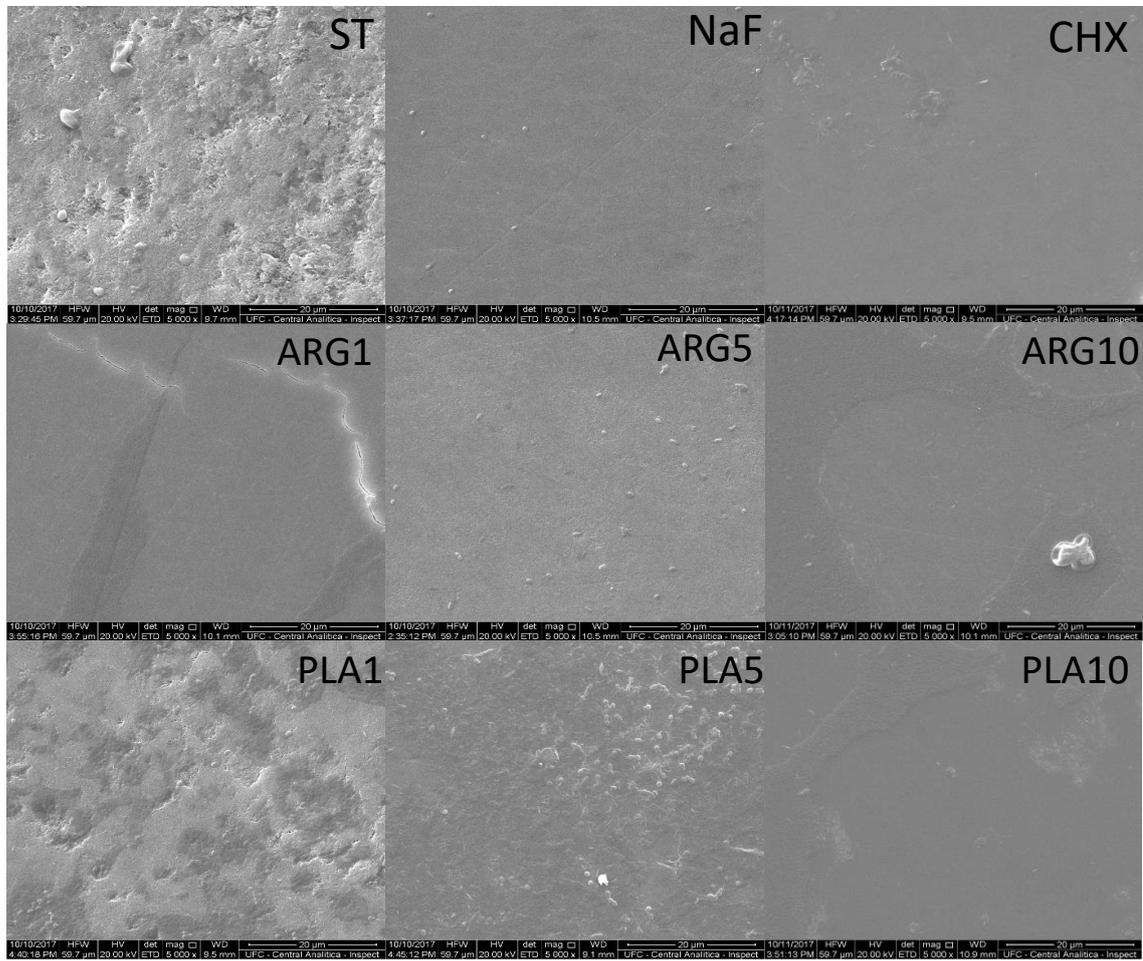
Figura 7 – Espectro de Raman plotados juntos.



### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura do esmalte indicaram que a análise revelou topografia superficial lisa e homogênea do esmalte em todos os grupos, o que pode ser observado no aumento x5000 (Figura 8). Não houve diferença visual significativa entre as superfícies de diferentes grupos.

Figura 8 – Análise MEV, respectivamente, aos tratamentos ST, NaF, CHX, ARG1, ARG5, ARG10, PLA1, PLA5 e PLA10 em 5000x na região desmineralizada do esmalte.



## 6 DISCUSSÃO

Como principal achado do presente estudo, temos que o Plasma de Baixa Temperatura (PBT) foi efetivo contra o biofilme oral maduro de *S. mutans* formado *in vitro*, o que é um achado importantíssimo visto que não possuímos nenhum produto no mercado efetivo contra este biofilme maduro. O biofilme cultivado sem perturbação foi tratado no quinto dia, nesse estado, a agregação de células microbianas está unida por uma matriz extracelular de polissacarídeos e proteínas e os microrganismos tornam-se capazes de tolerar desafios antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001), tendo apresentado redução de cerca de 3 ordens de magnitude em comparação aos grupos controle.

Este estudo comparou o efeito de diversos tratamentos sobre o biofilme oral de *S. mutans*. A presença de bactérias gram-positivas ocorre em fendas muito estreitas de um dente que limita a sua acessibilidade para vários tratamentos (PARK *et al.*, 2014). Neste estudo, observou-se ineficiência da clorexidina a 0,12% por dez minutos em inativar as bactérias do grupo mutans. Vitkov *et al.* (2005) relatou que uma solução de CHX de 0,1% parece ser ineficaz contra biofilmes orais maduros. O PBT apresentou um melhor resultado em reduzir a viabilidade bacteriana do que a clorexidina, uma substância considerada padrão ouro para inativar ou prevenir a formação de placas dentárias (MATTHEWS, 2011). Em nosso estudo, o tratamento com plasma de argônio por 5 e 10 minutos apresentou melhores resultados do que a CHX na redução de *S. mutans* presentes em biofilmes orais maduros formados *in vitro*, a semelhança dos resultados encontrados por Koban *et al.* (2011) usando o tratamento PBT contra biofilmes orais formados sobre discos de titânio.

Segundo Park *et al.* (2014), é possível que vários componentes trabalhem juntos para produzir um efeito sinérgico que contribua para a esterilização. PBT parece produzir uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (SRO) quando passa pelo ar e, em particular, níveis elevados de OH são gerados quando o plasma reage com água ou fluido do tecido. Além disso, a meia-vida de SRO gerado por plasma é muito curta e, portanto, a retenção na cavidade oral é baixa e menos propensos a induzir efeitos nocivos nos tecidos (GOREE *et al.*, 2006).

Blumhagen *et al.* (2014) usou o plasma de argônio contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* e observou que o mesmo foi eficaz na redução

do número de *S. mutans* após 11 a 15 segundos num estudo *in vitro*, sobre disco de hidroxiapatita com uma concentração baixa de células planctônicas e utilizando outro dispositivo de plasma. No nosso estudo, o plasma foi utilizado contra biofilmes maduros de *S. mutans*, utilizando substratos de dentes humanos, o que dificulta a destruição das bactérias em grande parte devido a presença dos polissacarídeos na matriz (DUARTE *et al.*, 2011).

Neste estudo, foi possível observar redução dos polissacarídeos solúveis dos grupos tratados com PBT em comparação com os grupos controle. Esta capacidade de redução dos polissacarídeos é importante, visto que os polissacarídeos formados em superfícies microbianas melhoram as interações adesivas entre *S. mutans* e outros organismos, enquanto aumenta a coesão celular global (CROSS *et al.*, 2007; GREGOIRE *et al.*, 2011), sendo essencial para a manutenção de biofilmes cariogênicos (MARSH *et al.*, 2004). Usando sacarose principalmente como substrato, o PEC é sintetizado principalmente por glicosiltransferases (GTFs) bacterianas (BOWEN, 2002). As GTFs de *S. mutans* sintetizam uma mistura de glicanos insolúveis (ligação  $\alpha$  1-3) e glicanos solúveis (ligação  $\alpha$  1-6) (LEME, 2006), devido a solubilidade estes últimos são, portanto, mais facilmente removidos. Quanto a comparação dos polissacarídeos insolúveis em água, não observamos diferenças significativas estatisticamente. O PEC é em grande parte insolúvel (ligação  $\alpha$  1-3) e tem uma estrutura complexa (KOPEC *et al.*, 1997; BOWEN; KOO, 2011), explicando possivelmente, a dificuldade em reduzir este tipo de polissacarídeo neste estudo. Lima (2014) também não observou redução na quantidade de polissacarídeos insolúveis quando a terapia fotodinâmica foi aplicada num único momento sobre o biofilme maduro de *S. mutans*.

Quanto à microscopia Confocal, tratamento com plasma e o fluxo de argônio reduziram visivelmente o número de bactérias viáveis nos biofilmes, o que não foi observado no grupo da clorexidina a 0,12%. Estudo realizado por DU *et al.*, (2012) apresentou redução na viabilidade bacteriana tanto para grupos plasma como clorexidina a 2%, o que pode ser explicado por tratar-se de um biofilme de 48 horas e uma concentração maior do agente antimicrobiano, enquanto no nosso estudo um biofilme maduro de cinco dias e uma concentração de clorexidina a 0,12% foi testada.

Neste estudo, após cinco dias de acúmulo de biofilme em alta frequência de exposição a sacarose, a desmineralização do esmalte foi observada (Tabela 1). Observou-se uma redução da microdureza superficial do esmalte (PMS) devido ao desafio cariogênico a que foram submetidos os blocos de esmalte. A PMS é considerado um método muito sensível de avaliação da lesão precoce da cárie (ZERO, 1995). Tenuta *et al.* (2003) sugerem que leva cerca de 3 a 4 dias para que a placa dental demonstre sua cariogenicidade no substrato dental. Assim, a perda mineral encontrada em nosso estudo é semelhante aos achados para o esmalte humano por outros autores (Park *et al.*, 2004). Além disso, o tratamento com plasma de argônio, fluxo de argônio, clorexidina a 0,12% e solução de NaCl 0,89% não teve efeito sobre PMS%, sugerindo que o tratamento com plasma não interfere na dureza do esmalte em condições testadas. Estes resultados indicaram que o tratamento com plasma não induziu danos na superfície do esmalte, apesar de os esmaltes terem sofrido desafio cariogênico. Chen *et al.* (2013) também não observaram a modificação superficial de vários substratos dentários submetidos ao tratamento com PBT.

A espectroscopia Micro-Raman é uma técnica não-invasiva que depende da frequência característica de vibração da molécula para identificar a composição química de materiais tanto sintéticos como biológicos. O pico do espectro micro-Raman pode fornecer a composição molecular específica de uma substância. Devido a estas vantagens, a espectroscopia Micro-Raman já foi aplicada no campo da pesquisa odontológica para investigar o tecido duro dental (SA *et al.*, 2017). A leitura em três pontos diferentes nos permite comparar estatisticamente todos os tratamentos, no entanto, não foi observada nenhuma diferença significativa na área média sob os picos analisados para fosfato e carbonato ( $\nu = 958\text{cm}^{-1}$  e  $1070\text{cm}^{-1}$ , respectivamente), o que corrobora com o trabalho de Alves (2016), o primeiro a analisar através do Raman blocos de esmalte submetidos ao tratamento de plasma.

No nosso estudo, não foram observadas alterações visíveis na estrutura superficial do esmalte entre os blocos submetidos aos diferentes tratamentos ao serem comparados por meio das imagens obtidas do microscópio eletrônico de varredura. Kovalová *et al.* 2014, também não observou nenhuma alteração significativa na estrutura superficial do dente mesmo após 10 minutos de exposição dos blocos sob biofilmes ao plasma de baixa temperatura diante da análise

comparativa do MEV, o que é positivo a utilização do dispositivo, visto que confirma que o PBT não altera a estrutura do esmalte, não provocando nenhum dano físico ao tecido mineral (KIM *et al.*, 2014).

Dessa forma, nossos resultados demonstraram que o tratamento com PBT de argônio foi eficaz em reduzir a viabilidade de *S. mutans* inseridos em biofilmes maduros sem danificar a superfície do esmalte, sob o biofilme irradiado nas condições testadas, sendo uma técnica promissora no controle de biofilmes orais.

## 7 CONCLUSÃO

O Plasma de Baixa Temperatura – PBT sob as condições utilizadas em biofilme maduro de *S. mutans* sobre esmalte dentário humano *in vitro* mostrou-se eficaz, caracterizando-se por:

- redução de bactérias, o que ocorreu, principalmente, quando o dispositivo foi aplicado por 5 e 10 minutos, assim como, redução de polissacarídeos extracelulares solúveis em água;
- equivalência entre a perda mineral de superfície nos grupos controle e nos grupos teste, portanto não houve redução da dureza superficial do esmalte em virtude da aplicação do PBT, garantindo-se assim a manutenção das propriedades mecânicas do esmalte sob o biofilme irradiado.

## REFERÊNCIAS

- AAS, A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol**, v.43, p. 5721- 5732, 2005.
- ALVES, Karla Shangela Silva. **EFEITO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA E PRESSÃO NO BIOFILME ORAL FORMADO SOBRE ESMALTE EM UM MODELO IN SITU**. 2016. 58 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- Bowen, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, p.126-139, 2002.
- BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of Streptococcus mutans - Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. **Caries Res**, v.45, p.69-86, 2011.
- BLUMHAGEN, A.; SINGH, P.; MUSTAPHA, A.; CHEN, M.; WANG, Y.; YU, Q. Plasma Deactivation of Oral Bacteria Seeded on Hydroxyapatite Disks as Tooth Enamel Analogue. **Am J Dent**, v.27, n.2, p.84–90, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**,116p, 2012.
- BROGDEN, N.K.; BROGDEN, K.A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **Int J Antimicrob Agents**,v.38, n.3, p. 217–225, 2011.
- CARJA, G.; KAMESHIMA, Y.; NAKAJIMA A., DRANCA, C.; OKADA, K. Nanosized silver–anionic clay matrix as nanostructured ensembles with antimicrobial activity. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, p. 534–539, 2009.
- CHEN, M.; ZHANG, Y.; DRIVER, M.S.; CARUSO, A.N.; YU, Q.; WANG, Y. Surface modification of several dental substrates by non-thermal atmospheric plasma brush. **Dent Mater**, v.29, p.871-880, 2013.
- COLBY, S.M.; RUSSELL, R.R.B. Sugar metabolism by mutans streptococci. **J. Appl. Bacteriol. Syposium Supplement**, v.83 p.80-88,1997.
- CROSS, S.E.; KRETH, J.; ZHU, L.; SULLIVAN, R.; SHI, W.; QI, F. *et al.* Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of Streptococcus mutans probed by atomic force microscopy under in situ conditions. **Microbiology**, v.153, p. 3124-3132, 2007.
- CURY, J. A., REBELO, M. A., DEL BEL CURY, A. A., DERBYSHIRE, M. T. & TABCHOURY,C.P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, v.34, p. 491-497, 2000.
- DE MELO, W.; AVEI, P.; OLIVEIRA, M. N.; GUPTA, A.; VECHIO, D.; SADASIVAM, M.; RAKKIYAPPAN, C.; HUANG, Y.Y.; YIN, R.; PERUSSI, L.R.; TEGAS, G.P.;

- PERUSSI, J.R.; DAI, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.11, p. 669-693, 2013.
- DELBEN, J.A.; ZAGO, C. E.; TYHOVYCH, N.; DUARTE, S.; VERGANI, C.E. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and *in vitro* reconstituted oral epithelium. **PLoS ONE**, 18p., 2016.
- DU, TF., JINGZHI, M., YANG, P., XIONG, Z., XINPEI, L. & CAO, Y. Evaluation of antimicrobial efficacy by atmospheric pressure nonequilibrium plasma against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. **J Endod**, v.38, n.4, p.545 -549, 2012.
- DUARTE, S., GREGOIRE, S., SINGH, A. P., VORSA, N., SCHAICH, K., BOWEN, W. H. & KOO, H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiol Lett**, v.257, p.50-56, 2006.
- DUARTE, S.; KUO, S. P.; MURATA, R. M.; CHEN, C. Y.; SAXENA, D.; HUANG, K. J.; POPOVIC, S. Air plasma effect on dental disinfection. **Physics of Plasmas**, v.18, 2011.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p.350-356, mar. 1956.
- FLEMMING, H.C.; WINGERNDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Micro**, v. 8, p. 623–633, 2010.
- FLUHR, J. W.; SASSNING, S.; LADEMANN, O.; DARVIN, M. E.; SCHANZER, S.; KRAMER, A.; RICHTER, H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. **Experimental Dermatology**, v. 21, p.130-134, 2011.
- GHERARDI, M.; TONINI, R.; COLOMBO, V. Plasma in Dentistry: Brief history and Current Status. **Trends in Biotechnology**, 2017.
- GONÇALVES, M.N.; PALMA-DIBB, R.G.; PAULA-SILVA, F.W.G.; OLIVEIRA, F.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B.; QUEIROZ, A.M. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **Journal of Dentistry**, v. 42, p. 986-992, 2014.
- GOREE, J.; LIU, B.; DRAKE, D.; STOFFELS, E. Killing of *S-mutans* bacteria using a plasma at atmospheric pressure. **IEEE Trans Plasma Sci**, v.34, p. 1317–1324, 2006.
- GREGOIRE, S.; XIAO, J.; SILVA, B.B.; GONZALEZ, I.; AGIDI, P.S.; KLEIN, M.I. *et al.* Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. **Appl Environ Microbiol**, v.77, p.6357-6367, 2011.
- HASAN, J.; CRAWFORD, R.; IVANOVA, E.P.; Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 5, p. 295–304, 2013.

HE, J.; LI, Y.; CAO, Y.; XUE, J.; ZHOU, X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. **Folia Microbiol (Praha)**, v.60, p.69-80, 2015.

HOFFMANN, C.; BERGANZA, C.; ZHANG, J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. **Med Gas Res**, v. 3, 15p., 2013.

HOJO, K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. **J Dent Res**, v. 88, p.982–990, 2009.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R.L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Lands Bioscience**, p.435 – 444, 2011.

IDLIBI, A.N.; AL-MARRAWI, F.; HANNIG, M.; LEHMANN, A.; RUEPPELL, A.; SCHINDLER, A. Destruction of oral biofilms formed *in situ* on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. **Biofouling**, v.29, p.369-379, 2013.

KARYGIANNI, L., RUF, S., FOLLO, M., HELLWIG, E., BUCHER, M., ANDERSON, A. C., *et al.* Novel broad-spectrum antimicrobial photoinactivation of *in situ* oral biofilms using visible light plus water-filtered infrared-A. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 23, p. 7324–7336, 2014.

KARYGIANNI, L.; *et al.* Natural antimicrobial and Oral microorganisms: a systematic review on Herbal interventions of the eradication of multispecies oral biofilms. **Front Microb.**, 1529: 14:1-7, 2016.

KIM, JH.; LEE, MA.; HAN, GJ.; CHO, BH. Plasma in dentistry: a review of basic concepts and applications in dentistry. **Acta Odont Scand**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2014.

KOBAN, I.; HOLTFRETER, B.; HUBNER, N.O.; MATTHES, R.; SIETMANN, R.; KINDEL, E.; WELTMANN, K.D.; WELK, A.; KRAMER, A.; KOCHER, T. Antimicrobial efficacy of non-thermal plasma in comparison to chlorhexidine against dental biofilms on titanium discs *in vitro*: proof of principal experiment. **J Clin Periodontol**, v.28, n. 10, p. 956-965, 2011.

KOPEC, L.K.; VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Structural aspects of glucans formed in solution and on the surface of hydroxyapatite. **Glycobiology**, v.7, p. 929-934, 1997.

KOVALOVÁ, Z.; ZAHORAN, M.; ZAHORANOVÁ, A.; MAKALA, Z. Streptococci biofilm decontamination on teeth by low-temperature air plasma of dc corona discharges. **J Phys. D: Appl.Phys**, v.47, 2014.

LEME, A.F.P.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation. **Dent Res**, v.85, n.10, p.878-887, 2006.

LIMA, R.A. **ESTUDOS DA AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM BIOFILMES DE *Streptococcus mutans* – EFEITO NA CÉLULA E NA MATRIZ DE POLISSACARÍDEOS**. 2014. 63f. Tese (Doutorado) – Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v.9, ed. 1, p.34-39, 2001.

MAI-PROCHNOWA, A.; MURPHYA, A.B.; MCLEANB, K.M.; KONGC, M.G.; OSTRIKOV, K. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. **Int J Antimicrob**, v. 43 p. 508–517, 2014

MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.** v.8, p. 263-271, 1994.

MATTHEWS, D. No difference between 0.12 and 0.2% chlorhexidine mouthrinse on reduction of gingivitis. **Evid Based Dent**, v.12, p.8-9, 2011.

MELLBERG, J. R.; PETROU, I. D.; GROTE, N. E. A Study of the Ability of an In situ Remineralization Model to Differentiate between the Effects of 2 Fluoride Dentifrices That Produced Significantly Different Clinical Caries Results. **J Dent Res**, v. 71, p. 1169-1172, 1992.

MELO, M. A. S; PAULA, D.M.; LIMA, J.P.M.; BORGES, F.M.C.; STEINER-OLIVEIRA, C.; SANTOS, M.N.; ZANIN, I.C.J.; RODRIGUES, L.K.A. In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria. **Laser Phys.**v. 20, p.1504–1513, 2010.

MEREDITH, N.; SHERIFF, M.; SETCHELL, D.J.; SWANSON, S.A. Measurement of the micro hardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. **Arch Oral Biol**, v. 41, n.6, p. 539-545, 1996.

MOREAU, M.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M.G.J. Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. **Biotechnol Adv**, n. 26, p. 610–617, 2008.

PAES LEME, A.F.; BELLATTO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation — New insight. **J Dent Res**, v. 85, n. 10, p. 878-887, 2006.

PARK, B.G.; KIM, K.S.; JUNG, K.H.; JUNG, S.B. Effect of atmospheric-pressure plasma treatment on the adhesion characteristics of screen-printed Ag nanoparticles on polyimide. **J Nanosci Nanotechnol**, v.14, ed.12, p.9448-9453, 2014.

PARTECKE, L. I.; EVERT, K.; HAUGK, J.; DOERING, F.; NORMANN, L.; DIEDRICH, S.; WEISS, F. U.; EVERT, M.; HUEBNER, N. O.; GUENTHER, C.; HEIDECKE, C. D.; KRAMER, A.; BUSSIAHN, R.; WELTMANN, K. D.; PATI, O.; BENDER, C.; VONBERNSTORFF, W. Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. **Bmc Cancer**, v.12, p. 473 - 483, 2012.

PETERSEN, P.E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S.; NDIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ**, v.83, p. 661- 669, 2005.

REN, G.; HU, D.; CHENG, E.W.C.; VARGAS-REUS, M.A; REIP, P.; ALLAKER, R.P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, p. 587–590, 2009.

SA, Y.; FENG, X.; LEI, C.; YU, Y.; JIANG, T.; WANG, Y. Evaluation of the effectiveness of micro-Raman spectroscopy. **Lasers Med Sci**, 2017.

- SCHOLTZ, V; PASLAROVA, J; SOUSKOVA, H; KEUN, J; JULAK, J. Nonthermal plasma – A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnol Adv**, v.33, p. 1108-1119, 2015.
- SENADHEERA, M.D.; GUGGENHEIM, B.; SPATAFORA, G.; HUANG, Y. C.; CHOI, J.; HUNG, D.C.I.; TREGLOWN, J.S.; GOODMAN, S.D.; ELLEN, R.P.; CVITKOVICH, D.G. A VicRK Signal Transduction System in *Streptococcus mutans* Affects gtfBCD, gbpB and fff Expression, Biofilm Formation and Genetic Development. **J. Bacteriol**, v.187, p. 4064-4076, 2005.
- SLADEK, R.E.J.; FILOCHE, S.K.; SISSONS, C.H.; STOFFELS, E. Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. **Lett Appl Microbiol**, v.45, p.318–323, 2007.
- SVENSATER, G.; WELIN, J.; WIKKINS, J.C.; BEIGHTON, D.; HAMILTON, I.R. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol**, v.205, p. 139-146, 2001.
- TEIXEIRA, A. H., PEREIRA, E. S., RODRIGUES, L. K. A., SAXENA, D., DUARTE, S. & ZANIN, I. C. J. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on in vitro and in situ Biofilms. **Caries Res**, v. 46, p. 549-554, 2012.
- TENUTA, L.M.A.; LIMA, J.E.O.; CARDOSO, C.L.; TABCHOURY, C.P.M; CURY, J.A. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. **Pesqui Odontol Bras**. v.17, n.4, p.326-331, 2003.
- VITKOV, L.; HERMANN, A.; KRAUTGARTNER, W.D.; HERRMANN, M.; FUCKS, K.; KLAPACCHER, M.; HANNIG, M. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. **Microsc Res Tech**, v.68, ed.2, p. 85-89, 2005.
- WHITE, D. J.; FEATHERSTONE, J. D. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. **Caries Res**, v. 21, p. 502-512, 1987.
- WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys Med Biol**, v.53, p. 61 – 109, 2008.
- ZANIN, I.C.; GONÇALVES, R.B.; JUNIOR, A.B.; HOPE, C.K.; Pratten, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, p. 324–330, 2005.
- ZANIN, I.C.J; LOBO, M.M.; RODRIGUES, L.K.A.; PIMENTA, L.A.F; HOFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light – emitting diode. **Eur J Oral Sci**, v. 114, p. 64-69, 2006.
- Zero, D.T. In situ caries models. **Adv Dent Res**, v.9, p.214-230,1995.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Atividade do plasma de baixa temperatura nos biofilmes orais de Streptococcus mutans em formação e maduros - estudo in vitro **Pesquisador:** HELLEN SUZANY FREIRE SILVA **Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 80206617.7.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ **Patrocinador**

**Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.435.890

#### Apresentação do Projeto:

Essa pesquisa busca investigar novos métodos para erradicar o biofilme dental uma vez que nenhum dos agentes antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado é eficaz contra biofilmes maduros, necessitando de meios alternativos para o tratamento do biofilme dentário sem prejudicar os tecidos saudáveis. As técnicas desenvolvidas para erradicar bactérias indesejáveis incluem a utilização mais recentemente, de antimicrobianos nano particulados, de superfícies nano estruturadas, de peptídeos antibacterianos e de Plasma de Baixa Temperatura (PBT). O plasma é o quarto estado da matéria, sendo constituído de um gás ionizado neutro, gerado utilizando uma variedade de gases ou misturas de gases como: argônio, hélio, ozônio ou gás oxigênio. É constituído por partículas em interação permanente, essas partículas incluem fótons, elétrons, íons positivos e negativos, átomos, radicais livres e moléculas excitadas e não excitadas, os quais podem contribuir para suas propriedades antibacterianas. Para a realização da pesquisa serão necessários 324 blocos de esmalte humano, obtidos a partir de terceiros molares hígidos, extraídos por razões que não as desta pesquisa. Os dentes serão cortados em cortadeira elétrica com discos de diamante e ao final, obtivemos blocos de esmalte medindo 4 x 4 x 2 mm. Os blocos serão aleatorizados e divididos entre os grupos: G1. Sem Tratamento; G2. Clorexidina 0,12% - Padrão ouro anti-placa; G3. Fluoreto de sódio 0,05% (Padrão ouro anticárie); G4. Plasma de Baixa Temperatura (PBT) 1min; G5. PBT 5 min; G6. PBT 10 min; G7. Argônio (ARG) 1 min; G8. ARG 5 min; G9. ARG 10 min. Em uma placa de 24 poços, biofilmes de S. mutans

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

