



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**ANA CAROLINA MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA  
CAVITAÇÃO DO SISTEMA PIEZOELÉTRICO SOBRE  
*CANDIDA ALBICANS***

2022

**ANA CAROLINA MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA  
CAVITAÇÃO DO SISTEMA PIEZOELÉTRICO SOBRE  
*CANDIDA ALBICANS***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Piezoelétrico.

Orientador: Prof. Tit. Renato Sussumu Nishioka

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Marques, Ana Carolina

Avaliação da atividade antimicrobiana da cavitação do sistema piezoelétrico sobre *Candida albicans* / Ana Carolina Marques. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Renato Sussumu Nishioka.

1. Piezoelétrico. 2. Cavitação. 3. Ação antimicrobiana. 4. Ultrassom. 5. *Candida albicans*. I. Nishioka, Renato Sussumu, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Tit. Renato Sussumu Nishioka** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Prof. Dr. Renata Falchete do Prado**

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

**Prof. Dr. Vladimir Jesus Trava-airoldi**

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 31 de maio de 2022

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais Ailton e Meire, que são as minhas maiores referências. Dedico esta dissertação como agradecimento eterno a todo esforço que fizeram para me dar uma educação digna, com muito incentivo aos estudos, aos princípios da nossa família e batalhando sempre para construir um futuro melhor para os filhos.

Aos meus irmãos Ricardo e Mateus, por toda irmandade e companheirismo que temos, e por serem fundamentais em minha vida e em meu caminho. Estaremos lado a lado sempre.

Aos meus amigos Victoria Carvalho e Júlio Ferraz, que foram fundamentais no meu crescimento pessoal e profissional. A Victoria, por ser minha irmã e incentivadora e ao Júlio por ser meu braço direito em todas as situações. Minha gratidão e admiração por vocês é eterna.

Ao Carlos Sanches por ser meu companheiro de vida e pelo apoio essencial em minha vida e minha amiga Katarine Bortolotti, pela lealdade e incentivo durante esses incontáveis anos de amizade.

Para finalizar, dedico às minhas avós Angelina Marques e Astolfina Oliveira (in memoriam) por sempre me colocarem em orações e buscarem o melhor para toda nossa família. Carrego vocês sempre comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao ICT UNESP, por ser minha faculdade do coração e me conceder tantos anos de ensino e aprendizado. Sou grata a toda a instituição, que carrego comigo para sempre.

Agradeço ao meu orientador Renato Nishioka, por todos os ensinamentos que vão além da Odontologia, por estar do meu lado sempre e me fazer crescer profissionalmente durante todos esses anos de orientação.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, por cederem a permissão para que eu executasse minha pesquisa, em especial à doutoranda Maíra Terra e a professora Juliana Campos Junqueira, por toda ajuda e atenção.

Agradeço ao professor João Maurício por ceder o equipamento desta pesquisa e por estar sempre disponível para ajudar.

"Nós somos aquilo que amamos". Rubens Alves

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Mecanismo de ação.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Cavitação .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Análise da ação antimicrobiana.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1 Ativação dos microrganismos .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.2 Preparo da suspensão padronizada.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Divisão dos grupos.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3 Protocolo de ativação dos grupos .....</b>	<b>24</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Resultados com potência de 6,5W .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2 Resultados com potência de 7,5 W .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 Resultados com potência de 13,6W .....</b>	<b>29</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

Marques AC. Avaliação da atividade antimicrobiana da cavitação do sistema piezoelétrico sobre *Candida albicans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

A busca pela otimização dos resultados clínicos, levou ao desenvolvimento de novas tecnologias. O Sistema Piezoelétrico Odontológico (SPO), tem sido cada vez mais difundido e sua principal característica é o fenômeno da cavitação, que é o processo de vaporização, geração de bolhas e sua implosão subsequente. Tais fenômenos acústicos estão diretamente relacionados a lise das membranas celulares dos MO. O objetivo deste estudo foi investigar o fenômeno da cavitação do sistema piezoelétrico, em diferentes potências de ativação, em relação ao efeito antimicrobiano sobre *Candida albicans*. Para a execução do trabalho, foi utilizado o aparelho DENTSURG. Foi utilizada a cepa padrão de *Candida albicans* (18060), mantidas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT UNESP. Para ativação de *Candida albicans* a cepa foi cultivada em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubada em estufa por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após preparo dos MO,  $100\mu\text{L}$  das células padronizadas foram adicionadas em placas de 24 poços e após essa etapa, um único operador treinado realizou a ativação, com os diferentes protocolos de ativação. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas que foram semeadas em placas contendo meios de cultura específicos e então foi determinado o número de Unidade Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Após análise estatística os resultados mostraram que o grupo 1 (potência de 6,5W) e o grupo 2 (potência de 7,5W) não apresentaram diferença significativa. Não houve diferença do grupo em que houve a ativação do microrganismo, em relação ao grupo controle. Já o grupo 3 (potência de 13,6W) apresentou diferença significante, havendo diferença significativa do grupo em que houve a ativação do microrganismo. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que uma potência mais elevada é mais eficaz na ação antimicrobiana de *C. albicans*.

Palavras-chave: Cavitação. Desinfecção. Ultrassom. *Candida albicans*.

Marques AC. *Evaluation of the antimicrobial activity of the piezoelectric system cavitation on Candida albicans [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.*

## **ABSTRACT**

*The search for the optimization of clinical results led to the development of new technologies. The Dental Piezoelectric System (SPO) has been increasingly widespread and its main feature is the phenomenon of cavitation, which is the process of vaporization, generation of bubbles and their subsequent implosion. Such acoustic phenomena are directly related to the lysis of OM cell membranes. The aim of this study was to investigate the phenomenon of cavitation of the piezoelectric system, at different activation potencies, in relation to the antimicrobial effect on Candida albicans. To carry out the work, the DENTSURG device was used. A standard strain of Candida albicans (18060) was used, kept in a freezer at -80°C in the Laboratory of Microbiology and Immunology of ICT UNESP. For Candida albicans activation, the strain was grown on Sabouraud agar with chloramphenicol and incubated in an oven for 24 h at 37°C. After OM preparation, 100µL of standardized cells were added in 24-well plates and after this step, a single trained operator performed the activation, with the different activation protocols. Subsequently, serial dilutions were performed and seeded in plates containing specific culture media and then the number of Colony Forming Units per milliliter (CFU/mL) was determined. After statistical analysis, the results showed that group 1 (6.5W power) and group 2 (7.5W power) showed no significant difference. There was no difference between the group in which the microorganism was activated and the control group. Group 3 (13.6W power) showed a significant difference, with a significant difference between the group in which the microorganism was activated. Based on the results obtained, it is concluded that a higher power is more effective in the antimicrobial action of C. albicans.*

*Keywords: Cavitation. Disinfection. Ultrasound. Candida albicans.*

## 1 INTRODUÇÃO

A busca pela otimização dos resultados clínicos na Odontologia, levou ao desenvolvimento de novas tecnologias que buscam fornecer melhor previsibilidade para os tratamentos. Com isso, o Sistema Piezoelétrico Odontológico (SPO), tem sido cada vez mais utilizado em diferentes áreas, agindo em uma frequência de 25 a 30 kHz (Eggers et al., 2004; Marques et al., 2020).

Piezoelasticidade é um fenômeno físico que ocorre quando determinados materiais são estimulados e assim determinam um diferencial elétrico. Quando a corrente elétrica alternada é aplicada sobre certas cerâmicas e cristais, resulta em movimentos de contração e extensão alternadamente, que podem ser traduzidos em energia vibratória de alta frequência, causando oscilações (Leclercq et al., 2008).

O SPO foi idealizado inicialmente para superar as limitações das ferramentas tradicionais, mais focado nas áreas de piezocirurgia terapêuticas (Torrella et al., 1998; Chiriac et al., 2005) como alternativa para procedimentos ultrapassados. Atualmente, com o desenvolvimento desse dispositivo, ele possui uma ampla gama de aplicações e a literatura demonstra seu uso em diversas áreas como Implantodontia, Cirurgia, Prótese, Periodontia, Endodontia, entre outras especialidades (Wallace et al., 2007; Gelpi et al., 2015).

Uma característica relevante acerca do SPO é o fenômeno da cavitação, que é o processo de vaporização, geração de bolhas e implosão subsequente em muitas frações minúsculas de seu tamanho original (Tzanakis et al., 2016). Normalmente, ocorre quando um líquido é submetido a uma rápida mudança de pressão devido às ondas ultrassônicas, levando à formação de cavidades dentro do líquido, onde a pressão é relativamente baixa (Yaman et al., 2013).

A cavitação resulta em bolhas de tamanho microscópico e este fenômeno envolve a sua formação, crescimento, pulsação e colapso das bolhas em líquidos sob ondas de ultrassom de alta intensidade (Felver et al., 2008). Esse colapso ocorre de forma instantânea e violenta, causando uma poderosa onda de choque (Verhaagen et al., 2016).

As investigações sobre cavitação dentro da Odontologia mostraram que pode ser poderoso o suficiente para desestruturar biofilme e o colapso das bolhas perto de uma superfície resulta em micro jatos que impactam na superfície e auxiliam a limpeza (Walmsley et al., 2013). A corrente acústica produz uma desagregação do biofilme, e o colapso das bolhas está diretamente relacionado a um enfraquecimento da membrana celular de alguns microrganismos (Mozo et al., 2012; Sarkinas et al., 2018).

Os mecanismos exatos pelos quais a cavitação pode limpar as superfícies não são totalmente compreendidos e ainda não há um consenso sobre quais parâmetros são os mais importantes para uma investigação mais aprofundada. Alguns autores apontam que a cavitação apresenta uma propriedade antimicrobiana, sendo a principal causa de sua ação o colapso de bolhas de gás que através de forças de cisalhamento, que afetam a parede celular do microrganismo (Agarwal et al., 2014).

Entretanto, outros autores afirmam que as ondas acústicas têm efeito de desinfecção, porém secundariamente em relação a alguma solução irrigante, ou seja, seu efeito antimicrobiano é limitado (Gründling et al., 2011). Porém, afirmaram que mais estudos devem ser realizados para avaliar a sua ação sobre os microrganismos e aprofundar os estudos acerca da dinâmica da cavitação.

Por outro lado, a literatura da área da Odontologia apresenta breves informações a respeito da influência do tempo de irrigação ou influência da potência de ativação da ponta. A intensidade de ativação, bem como a interação

do fluxo acústico com os microrganismos, e seu papel na descontaminação bacteriana do ambiente oral precisam ser esclarecidos.

O estudo do fenômeno da cavitação pode ajudar a fornecer informações a respeito da sua verdadeira ação na remoção do biofilme e ação sobre microrganismos. Isso contribuirá para aprimorar e compreender melhor a ação do SPO. Além disso, permitirá que os fabricantes desenvolvam instrumentos que otimizam os efeitos antimicrobianos da cavitação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mecanismo de ação

O efeito piezoelétrico foi descrito pelos físicos Jacques e Pierre Curie, em 1880, na França, no qual afirmaram que certos materiais, como cerâmicas e cristais, sofrem deformações quando uma corrente elétrica passa através deles. Tal fato resulta em movimentos de contração e extensão alternadamente, que podem ser traduzidos em energia vibratória de alta frequência, causando oscilações (Vercellotti et al., 2004; Robbiony et al., 2004).

O termo “piezo” é derivado do latim *piezen*, que significa pressão. O piezoelétrico funciona segundo o princípio da eletrificação por pressão, ou seja, quando a tensão elétrica é aplicada em certos materiais, o material em questão se expande e se contrai, produzindo vibrações ultrassônicas. Os materiais são cristais piezoelétricos que geralmente incluem quartzo, sal de Rochelle e certos tipos de cerâmicas (Yaman et al., 2013; Vercellotti et al., 2004).

No sistema piezoelétrico comercial, com indicações de uso Odontológico, as micro vibrações produzidas pela unidade piezoelétrica estão em uma frequência de 25 a 30 kHz. As amplitudes de vibração das pontas podem variar de 60 micrômetros até cerca de 200 micrômetros (Seshan et al., 2009). O dispositivo também é equipado com um sistema de irrigação de resfriamento com 60 mL/min de fluxo variável (Eggers et al., 2004). Os insertos atuam em um padrão de vibração linear, com uma faixa espacial compreendida entre 60 e 210 m, movidos por uma potência ultrassônica que ultrapassa 5 W e pode chegar a 16 W, dependendo da marca do aparelho (Robbiony et al., 2004).

Os primeiros estudos visando adaptar a fonte ultrassônica piezoelétrica foram realizados na década de 60 na área da cirurgia, onde McFall e colaboradores já experimentaram uma cirurgia de ultrassom em osso (Lynn et al., 1942).

Os avanços na tecnologia de ultrassom levaram à introdução de sistemas cirúrgicos especializados, chamado de “Piezosurgery”, sendo o primeiro dispositivo piezoelétrico desenvolvido por Tomas Vercellotti em 1988 (Mectron, Carasco, Itália), para superar as limitações da instrumentação tradicional na cirurgia óssea oral pela modificação e melhora da tecnologia ultrassônica convencional (Pavlíková et al., 2011).

O dispositivo “Piezosurgery” se tornou uma alternativa valiosa para minimizar as desvantagens associadas aos instrumentos rotativos tradicionais (Sohn et al., 2007), e diversos autores afirmam ser um método superior devido ao corte seletivo (baixo risco associado de dano aos tecidos moles adjacentes), (Junior et al., 2018; Seshan et al., 2009) menor incidência de edema e hematoma pós-operatório, redução da perda sanguínea intraoperatória que são fatores atribuídos a presença do fenômeno da cavitação (Bensaha et al., 2011; Kawashima et al., 2007).

Thomas et al., 2017 relataram que todos esses benefícios que a piezocirurgia proporciona, como a alta previsibilidade e baixa morbidade em cirurgia óssea, são atribuídos ao fenômeno da cavitação, já que mostra uma propriedade antibacteriana por fragmentar a parede celular bacteriana, o que ajuda a obter sítio cirúrgico seguro e claro durante a osteotomia.

Nesse contexto, estudos da cavitação do SPO foram se difundindo pela odontologia, sendo estudado na Endodontia na desinfecção dos canais radiculares (Herrera et al., 2017; Macedo et al., 2014) como uma desinfecção química, limpeza de detritos e remoção da camada de esfregaço, já que a vibração do instrumento ultrassônico pode estimular o efeito da cavitação e a reação de

streaming acústico, que por sua vez têm efeitos de limpeza e desinfecção (Chen et al., 2013)

Estudos aprofundados na Periodontia, para a utilização do ultrassom na terapia periodontal, também demonstraram ação dos fenômenos acústicos sobre os microrganismos (Vyas et al., 2017; Wang et al., 2018; Ioannou et al., 2009). Em 1997, O'Leary et al realizaram um estudo em patógenos periodontais (*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*) relacionando o efeito bactericida do ultrassom. Eles admitiram que a oscilação mecânica da ponta, pode estar ligada com o principal efeito bactericida do dispositivo, porém admitiram que uma investigação mais aprofundada fosse necessária.

## 2.2 Cavitação

Uma relevante característica do sistema piezoelétrico é o fenômeno da cavitação, que se baseia no processo de vaporização, formação de bolhas e subsequente implosão em muitas frações de seu tamanho original, que ocorre devido à diminuição da pressão como resultado da vibração ultrassônica (Arabaci et al., 2007). Esse fenômeno é caracterizado pela ruptura da coesão molecular de líquidos, quando atingido pelas ondas ultrassônicas (Leclercq et al., 2008). Quando a pressão aumenta, os vazios implodem e geraram uma onda de choque intensa, que podem levar à remoção de partículas e erosão em superfícies sólidas. O efeito da cavitação necessita de baixa pressão de vapor da ponta oscilante. (Wang et al., 2018)

Silva et. al 2012 realizaram um estudo sobre “acousting streamins”, que é definido como as forças físicas das ondas sonoras que fornecem uma força motriz capaz de deslocar pequenas moléculas. A cavitação foi definida por eles como as

forças físicas das ondas sonoras sobre os gases dentro do microambiente do fluido. À medida que as ondas sonoras se propagam através do meio, a compressão e rarefação característica fazem com que as bolhas de gás microscópicas no tecido fluido contraem e expandem. Dessa forma, tais mudanças na pressão, causadas por as arestas principais e de retardamento da onda de som, geram rápidas mudanças na pressão, ambas dentro e à volta da célula, e podem causar danos. (Silva et al., 2012)

Vyas et al., 2016 descreveram os vários efeitos de cavitação física que podem ser observados. São eles: a formação de um microjato reentrante quando perto de um limite, como uma parede ou outras bolhas, que podem impactar uma superfície em alta velocidade; geração de ondas de choque de grande amplitude; micro-streaming no fluido circundante sendo pequenas oscilações de elementos fluidos; micro-streamers como bolhas de cavitação se formando em direções semelhantes; e a migração da bolha em direção aos nós de pressão e antinodos devido às forças de Bjerknes.

Vyas et al., 2017 analisaram a dinâmica da bolha de cavitação em torno dos escaladores ultrassônicos, e mostraram os tamanhos médios das microbolhas e seu tamanho e velocidade durante a variação das duas fases de seu ciclo de vida. A cavitação se formou em um aglomerado de bolhas crescendo e colapsando no final da ponta. Em baixa potência, a cavitação pode ser vista em um ponto da ponta. Em potências médias, ocorre mais cavitação em todo o final da ponta e nas potências superiores, aumenta ainda mais com microbolhas maiores.

A literatura também ilustra uma propriedade antibacteriana da cavitação, que ajuda na obtenção de alta previsibilidade e baixa morbidade em cirurgia óssea. A propriedade antibacteriana é atribuída à fragmentação da parede celular bacteriana (Agarwal et al., 2014), baseado nos princípios mecânicos e as reações sonoquímicas produzidas pela cavitação acústica (Wang et al., 2018).

No caso de células e macromoléculas em suspensão aquosa, os ultrassons podem alterá-las estruturalmente e funcionalmente pela cavitação. Esta pressão mecânica aplicada pela onda produz movimento unidirecional do fluido ao longo e em torno de membranas celulares (Silva et al., 2012). Os primeiros estudos que investigam os efeitos do “acoustic streaming” e cavitação em células mostraram atraso no crescimento de células *in vitro*, aumentos na síntese de proteínas e alterações na membrana. Combinados, estes resultados podem sugerir que o ultrassom “danifica” as células, resultando no atraso do crescimento. (Silva et al., 2012).

Vyas et al., 2020a, investigaram a dinâmica das bolhas da cavitação na remoção de biofilme nas superfícies de implantes dentários, a fim de compreender como a cavitação remove biofilme. Os experimentos foram feitos usando imagens de alta velocidade, microscopia eletrônica de varredura e análise de imagens, em biofilmes de *Streptococcus sanguinis*, que é um dos primeiros colonizadores de superfícies de implantes dentários. O grupo constatou que a potência do instrumento está positivamente correlacionada com o deslocamento da vibração da ponta do escalador ultrassônico. Em alta potência, as bolhas de cavitação estavam ativas em uma área maior ao redor da ponta, tanto paralela quanto perpendicular à ponta, portanto, mais biofilme foi removido quando a ponta foi operada em alta potência em comparação com a potência média.

Vyas et al., 2016 desenvolveram um estudo para avaliar a eficácia da ruptura mecânica do biofilme de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus mutans*) em superfícies de implantes através da aplicação da cavitação. Eles concluíram que a remoção do biofilme foi significativa e ocorreu devido à cavitação e que tal fenômeno tem potencial para ser usado como uma nova maneira de desinfetar implantes dentários.

Walmsley et al., 2018 possuem resultados de estudos que sugerem que o efeito da cavitação fragmenta as paredes celulares das bactérias e, portanto, tem um efeito antibacteriano. Eles também identificaram que a cavitação surge dentro da água ao redor da ponta ultrassônica e pode ser detectada e quantificada, e que ao contrário do que se esperava, a cavitação máxima não ocorreu na extremidade livre da ponta, mas sim em torno das regiões mais acima na ponta em direção à sua curva em um antinodo de vibração. Eles verificaram também que o desenho da ponta afetou tanto a distribuição espacial quanto temporal da cavitação, ou seja, o design do instrumento tem uma grande influência na quantidade produzida. Isso tem implicações clínicas, pois a cavitação pode ser bem aproveitada, embora sejam necessários ensaios clínicos para determinar seu impacto total.

Em diversos estudos, os pesquisadores destacam a dificuldade em obter resultados reproduzíveis desse tema. Esse desafio se dá pelo fato de que não há consenso sobre qual é a razão final pela qual as bolhas podem limpar. Como o efeito pode depender da técnica usada para gerar a bolha em primeiro lugar, não é fácil comparar experimentos realizados com ultrassom e cavitação hidrodinâmica. Além disso, as escalas espaciais e temporais para colapso e limpeza de bolhas podem ser diferentes, o que complica uma comparação direta.

Dessa forma, o estudo do fenômeno da cavitação se torna necessário e pode ajudar a fornecer informações a respeito da sua verdadeira ação na remoção do biofilme e ação sobre microrganismos. Isso contribuirá para aprimorar e compreender melhor a ação do SPO. Além disso, permitirá que os fabricantes desenvolvam instrumentos que otimizam os efeitos de limpeza da cavitação.

### 2.3 *Candida albicans*

*Candida albicans* é uma espécie comum da microbiota humana saudável, podendo colonizar assintomaticamente vários nichos do corpo, sendo a espécie de *candida* mais frequentemente isolada da cavidade oral. A incidência de portadores de candidíase oral na população em geral tem sido tradicionalmente relatada entre 35% -80%, dependendo da população específica estudada, e estima-se que esta espécie seja responsável por mais de 80% dos fungos orais. (Lewis et al., 2017; Camargo et al., 2016).

Na maioria dos indivíduos com um sistema imunológico saudável, *C. albicans* é um comensal inofensivo que existe em harmonia com outros membros da microbiota. No entanto, distúrbios neste delicado equilíbrio, resultantes, por exemplo, de variações no ambiente local (mudanças de pH ou alterações nutricionais), uso de antibióticos ou alterações no sistema imunológico (causadas por uma infecção ou terapia imunossupressora), podem permitir rapidamente a proliferação de *C. albicans* e causar infecção (Gulati et al., 2016; Peters et al., 2017).

A candidíase foi descrita desde os tempos de Hipócrates (cerca de 460-370 AC), sendo referido como “uma doença do doente”, que destaca a natureza oportunista da infecção e o papel principal de uma defesa reduzida do hospedeiro em seu desenvolvimento (Lewis et al., 2017).

Relativamente poucos medicamentos antifúngicos estão disponíveis em comparação com a ampla gama de antibióticos para infecções bacterianas, o que provavelmente reflete a dificuldade envolvida no desenvolvimento de um agente com atividade contra um tipo de célula eucariótica sem problemas inerentes de toxicidade do hospedeiro associada (Urzúa et al., 2008; Lewis et al., 2017; Peters et al., 2017)

Os medicamentos antifúngicos podem ser classificados em quatro tipos de acordo com o modo de ação e o alvo: 1. Ruptura das membranas celulares dos fungos, como nos antifúngicos polienos (nistatina e anfotericina), 2. Inibição da síntese de ergosterol, no grupo azol dos antifúngicos (fluconazol e itraconazol), 3. Inibição das enzimas  $\beta$  1,3 D nos antifúngicos equinocandinas (caspofungina), 4. Interferência com a síntese de RNA e replicação de DNA (flucitosina (Lewis et al., 2017)).

O gênero *Candida*, foi previamente implicado na doença periodontal, no qual estudos verificaram que o fungo era mais abundante em pacientes com doença periodontal do que em pacientes com saúde bucal. Um estudo baseado em cultura de 28 indivíduos periodontalmente saudáveis, 20 indivíduos com periodontite agressiva e 26 indivíduos com periodontite crônica, observou que os indivíduos com periodontite crônica eram mais propensos a serem portadores de leveduras e tinham maior grau de colonização de levedura, particularmente para *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, e *Candida glabrata*, do que indivíduos periodontalmente saudáveis. Houve associação estatística entre a colonização subgingival de espécies de leveduras, principalmente *C. albicans* (Canabarro et al., 2012; Peters et al., 2017).

Existe também uma base de dados significativa no qual indica que *Candida albicans* é associada também a prevalência de cárie e com base nessas informações coletadas, os níveis orais de *Candida* têm sido frequentemente usados como indicadores de atividade de cárie por diversos pesquisadores (Lewis et al., 2017; Peters et al., 2017).

Há evidências que indicam uma preponderância de *C. albicans* na dentina em lesões de cárie de crianças com frequências variando de 66 a 97%. Além disso, essa correlação também foi relatada entre os adultos, no qual 56,1% de adultos com cárie foram colonizados por *Candida* (Fragkou et al., 2016).

Espécies de *Candida* podem aderir de forma eficaz e duradoura às superfícies orais, incluindo a parte radicular dos dentes, esmalte e biomateriais, como superfícies cobertas de hidroxiapatita, bem como dispositivos protéticos, incluindo próteses acrílicas (Canabarro et al., 2012).

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar o fenômeno da cavitação do sistema piezoelétrico, em diferentes potências de ativação, em relação ao efeito antimicrobiano sobre *Candida albicans*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste estudo, foi utilizado o piezoelétrico odontológico modelo DENTSURG (CVDentus – Clorovale Diamantes S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 1). Foi utilizado o inserto TOT de titânio, sendo ele delgado de parte ativa longa, vibrando em uma frequência de aproximadamente 32 kHz (Figura 2).

Figura 1 – Ultrassom Piezoelétrico DENTSURG utilizado no estudo



Fonte: CVDentus – Clorovale Diamantes S.A., São José dos Campos, SP, Brasil.

Figura 2 – Ponta TOT utilizada no estudo



Fonte: CVDentus – Clorovale Diamantes S.A., São José dos Campos, SP, Brasil.

## **4.1 Análise da ação antimicrobiana**

### **4.1.1 Ativação dos microrganismos**

Foi utilizada cepa padrão de *Candida albicans* (18804), no qual foi mantida em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação de *Candida albicans* a cepa foi cultivada em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubada em estufa por 24 h a 37°C.

### **4.1.2 Preparo da suspensão padronizada**

Após este período, as células microbianas foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada para obter uma concentração de  $10^6$  micro-organismos/mL de *C. albicans*.

## **4.2 Divisão dos grupos**

Os grupos deste estudo foram estabelecidos de acordo com as próprias funções do dispositivo, no qual cada função determina uma potência diferente. As potências foram divididas em diferentes grupos, com suas respectivas funções do dispositivo, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Divisão dos grupos

GRUPO	FUNÇÃO	POTÊNCIA
1	(Irrigação ultrassônica passiva) PUI	6,5 W
2	Diamond supra power	7,5W
3	Apicectomia	13,6W

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Protocolo de ativação dos grupos

Para a execução da ativação dos grupos, 100µL das células padronizadas foram adicionadas em placas de 24 poços, sendo n=5, contendo em cinco poços o grupo controle (em que não foi realizada nenhum tipo de ativação) e mais cinco poços com o grupo cavitação, no qual foi realizada a ativação com o SPO. Um único operador treinado realizou a ativação das células padronizadas com seu respectivo tipo de função do aparelho, com a ponta TOT, por 60 segundos.

Posteriormente a realização de toda essa etapa, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em placas contendo meios de cultura específicos (Sabouraud para *C. albicans*.) e então foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h.

Em seguida, foi determinado o número de Unidade Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL). Os resultados de UFC/mL foram submetidos à análise estatística com Teste T, com nível de significância de 0,05%, no programa Minitab® 19 (Statistical Software Pensilvânia /PRNewswir).

Figura 3 – Placa de 24 poços demonstrando a disposição dos grupos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 – Placa de 24 poços demonstrando a padronização da ativação, sendo CO o grupo controle, em que não houve ativação, e CA se referindo ao grupo que foi realizada a ativação



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 RESULTADOS

Foi obtido o número de Unidade Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) de cada grupo. Os dados registrados de UFC/ ml da contagem dos grupos estão apresentados nas tabelas 3, 5, 7. As tabelas 4, 6 e 8 apresentam as estatísticas descritivas de cada grupo.

### 5.1 Resultados com potência de 6,5W

Tabela 3 – Resultados em UFC/ml

PLACA	CAVITAÇÃO	CONTROLE
1	7,49136	7,63347
2	7,32222	7,11394
3	7,34242	7,71600
4	7,38021	7,60206
5	7,32222	7,49136

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Estatísticas Descritivas

Amostra	N	Média	DesvPad	EP Média	Valor-T	Valor-p
CA1-1	5	7,3717	0,0710	0,032	-1,27	0,274
CO1-1	5	7,511	0,236	0,11		

Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo 1 (potência de 6,5W) apresentou valor-P de 0,274, não

apresentando diferença significativa. Não houve diferença do grupo em que houve a ativação do microrganismo, em relação ao grupo controle.

## 5.2 Resultados com potência de 7,5 W

Tabela 5 – Resultados em UFC/ml

PLACA	CAVITAÇÃO	CONTROLE
1	9,63347	9,72428
2	9,38021	9,59106
3	9,56820	9,69897
4	9,39794	9,27875
5	9,39794	9,69897

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Estatísticas Descritivas

Amostra	N	Média	DesvPad	EP Média	Valor-T	Valor-p
CA2-1	5	9,476	0,117	0,052	-1,25	0,258
CO2-1	5	9,598	0,186	0,083		

Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo 2 (potência de 7,5W) apresentou valor-P de 0,258, não apresentando diferença significante. Não houve diferença do grupo em que houve a ativação do microrganismo, em relação ao grupo controle.

### 5.3 Resultados com potência de 13,6W

Tabela 7 – Resultados em UFC/ml

PLACA	CAVITAÇÃO	CONTROLE
1	7,57978	7,75587
2	7,07918	7,74036
3	7,39794	7,53148
4	7,34242	7,84510
5	7,20412	7,74819

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Estatísticas Descritivas

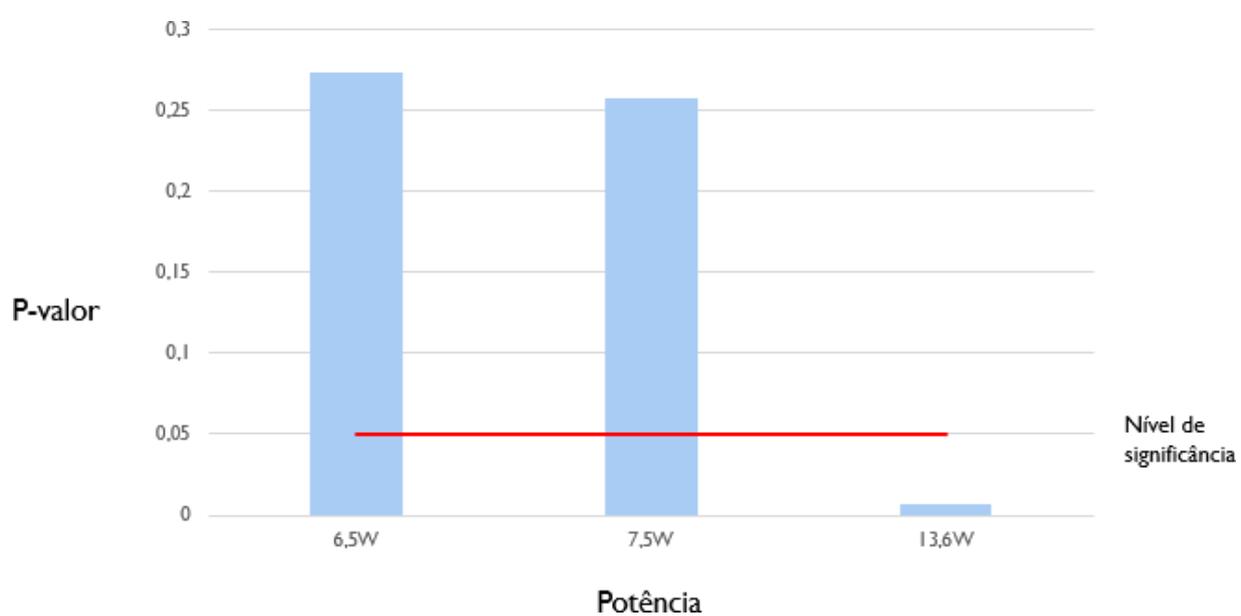
Amostra	N	Média	DesvPad	EP Média	Valor-T	Valor-p
CA3-1	5	7,321	0,191	0,085	-4,04	0,007
CO3-1	5	7,724	0,116	0,052		

Fonte: Elaborado pelo autor.

O grupo 3 (potência de 13,6W) apresentou valor-P de 0,007, apresentando diferença significativa. Houve diferença significativa do grupo em que houve a ativação do microrganismo, em relação ao grupo controle.

O nível de significância de cada grupo foi avaliado através de um gráfico comparativo, ilustrado na figura 5.

Figura 5 – Gráfico comparativo entre as potências e p-valor correspondente a estatística descritiva.



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que houve maior ação antimicrobiana com o aumento da potência ultrassônica. A potência mais alta pode causar maiores níveis de cavitação, resultando em maior ação antimicrobiana. Tal informação condiz com o estudo de Joyce et al., 2003 no qual também investigaram o efeito do ultrassom com potências diferentes, e esclareceram que o ultrassom de alta potência, em baixos volumes de suspensão microbiana resulta em uma redução contínua no número de células, ou seja, a taxa de morte predomina.

Esse resultado também está de acordo com um estudo de Lea et al., 2005, no qual confirmaram que o aumento da atividade cavitacional ocorreu em configurações de maior potência e com o aumento do tempo de operação. Os autores avaliaram diferentes formatos de pontas ultrassônicas, diferentes potências e tempo de ativação do dispositivo, e concluíram que o formato da ponta e o ajuste da potência do gerador mostraram ter um efeito na produção de radicais livres, e a geometria das pontas afeta a magnitude de sua amplitude de deslocamento de vibração, já que todas as pontas produziram cavitação na configuração de alta potência. As diferenças na quantidade de cavitação gerada entre pontas de estilos diferentes podem ser devidas às diferenças nas áreas das superfícies das pontas que transmitem o ultrassom para o meio, o que justifica a ponta escolhida para o presente estudo ser de configuração longa.

Nossos resultados mostraram que apenas em potência alta (13,6W), houve ação da cavitação sobre os MO. Em potência baixa e média, não obtivemos resultados conclusivos. Tal fato se contrapõe ao estudo de Vyas et al., 2017, que avaliaram a velocidade de colapso e a dinâmica das bolhas de cavitação em uma

ponta ultrassônica, e concluíram que foram semelhantes nas configurações de média e alta potência. Entretanto, afirmaram que o aumento da potência causa um aumento na quantidade de microbolhas de cavitação e bolhas maiores podem ser vistas em configurações de alta potência. Isso pode justificar que nossos resultados foram conclusivos apenas em potência alta. Eles também concluíram que em baixa potência a cavitação pode ser vista apenas em um ponto da ponta ultrassônica, o que pode justificar a baixa ação das bolhas de cavitação sobre os MO.

Outra possível explicação para uma maior ação da cavitação em potências altas, é baseada em um estudo de Vyas et al., 2020b, no qual estudaram o crescimento e colapso de microbolhas quando expostas a um campo ultrassônico, e concluíram que as bolhas de cavitação estavam mais ativas e em uma área maior ao redor da ponta, tanto paralelamente quanto perpendicularmente à ponta. Além disso, a área de baixa pressão acústica ao redor da ponta seria maior, o que permitiria que a cavitação fosse poderosa o suficiente em distâncias adicionais, o que não é possível na potência média por exemplo.

É importante ressaltar que os valores de referência das potências utilizadas por nós, não foram as mesmas publicadas anteriormente, portanto, é difícil comparar esses resultados com estudos anteriores, já que cada equipamento e cada ponta ultrassônica tem sua configuração indicada. Outro fator é que a dinâmica da cavitação e sua ação antimicrobiana é complexa e envolve diversos fatores, tornando difícil uma padronização.

Estudos anteriores também confirmam que a cavitação ocorre nos antinodos, (pontos de maior deslocamento das pontas ultrassônicas). A área de cavitação próxima à extremidade livre das pontas aumenta com a potência e também com as amplitudes de deslocamento nas pontas. Esses resultados sugerem que é provável que a cavitação de raspadores ultrassônicos possa interromper o

biofilme em um modo sem contato (Vyas et al., 2016). Além disso, Vyas et al., 2016, avaliaram também o tempo de operação do dispositivo, e relataram diferença estatisticamente significativas na quantidade de biofilme removido quando o escalonador foi operado por 30 se 60 s. Tal fato justifica o tempo de ativação utilizado no presente estudo.

Para entender a dinâmica da cavitação e sua ação antimicrobiana, é preciso compreender a dinâmica das bolhas, os diferentes parâmetros que as influenciam e como elas se manifestam nas pontas ultrassônicas.

Em 2003, Joyce et al., descreveram a atividade antimicrobiana da cavitação em seu colapso, dividindo esse efeito em quatro fases: Ressonância superficial das células bacterianas e gradientes de pressão resultantes do colapso de bolhas de gás, que entram na solução bacteriana na parede celular ou em suas proximidades; Forças de cisalhamento induzidas por micro fluxo ocorrem dentro das células bacterianas; Efeitos de radicais livres derivados de gases no meio aquoso; Formação de um bactericida forte, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) derivados da degradação sonoquímica da água.

Vyas et al., 2020b, afirmaram que o raio das bolhas também pode afetar a taxa de desinfecção, já que bolhas maiores podem romper uma área maior de biofilme, portanto, se as bolhas forem maiores no contato, isso pode resultar em uma limpeza ainda mais rápida com a cavitação. Isso pode ser feito alterando os parâmetros que afetam a cavitação, por exemplo, aumentando o conteúdo de gás do fluido. Além disso, afirmou também que a tensão de cisalhamento gerada na superfície é a responsável pela limpeza e que a quantidade de cavitação está relacionada à amplitude de vibração da ponta do destartarizador.

Van Wijngaarden et al., 2016 concluíram que a limpeza por nuvens de bolhas de cavitação ocorre principalmente pela geração de ondas de choque a partir do colapso das bolhas. Contudo, Lauterborn et al., 2015 salientam que a

elucidação da dinâmica da bolha em nuvens e aglomerados de cavitação requer mais pesquisas.

Outra análise nesse sentido é referente a quantidade de cavitação relacionada ao deslocamento da ponta. Um estudo de vibrometria a laser e mapeamento da atividade de cavitação ao redor das pontas ultrassônicas, correlacionou os movimentos vibratórios das pontas, com a produção de radicais livres decorrentes de bolhas de cavitação. Houve correlação positiva entre a amplitude de deslocamento da ponta ultrassônica e produção de cavitação (Walmsley et al., 2012; Manmi et al., 2020).

Embora o aumento da amplitude do deslocamento da vibração das pontas ultrassônicas aumente a ocorrência de cavitação, fatores como o comprimento e o design da ponta também influenciam na quantidade de atividade de cavitação gerada. A geração da cavitação é complexa e as amplitudes de deslocamento podem não ser o único fator na geração da cavitação inercial (Felver et al., 2009).

Pacheva et al., 2016 realizaram um estudo para avaliar o movimento de vibração de uma ponta ultrassônica piezoelétrica com diferentes formatos de pontas, e concluíram que o padrão de oscilação de cada ponta piezoelétrica depende da forma e do design da ponta, bem como da potência do gerador. O design da ponta é influente na determinação das vibrações da ponta e em seu deslocamento, causando diferença na quantidade de cavitação produzida. Em seu estudo, o deslocamento aumentou claramente com o aumento da potência, já que gerou um aumento linear na amplitude de deslocamento da ponta piezoelétrica e o seu padrão de oscilação.

Felver et al., 2009, mostraram que a cavitação ocorre próximo à ponta da sonda e que o design do instrumento tem uma grande influência na quantidade produzida. Isso tem implicações clínicas, pois a cavitação pode ser bem aproveitada, embora sejam necessários ensaios clínicos para determinar seu

impacto total. Os resultados informam como as pontas podem ser potencialmente modificadas levando a mais cavitação e o potencial para maior eficácia clínica.

Em uma revisão Lea et al., 2009, coletaram informações da a cavitação ao redor de instrumentos ultrassônicos e avaliaram como essa ocorrência está relacionada às características de vibração das pontas e ao formato da própria ponta. Uma das conclusões foi que em determinadas configurações de energia, pontas mais largas produzem mais cavitação do que designs mais finos (no ambiente sem carga). Isso sugere que a tendência atual em direção a pontas mais finas pode permitir uma limpeza mais profunda da bolsa periodontal, mas que isso pode custar a produção de um efeito biofísico benéfico. A análise de vibração das pontas nos permite determinar as condições necessárias para a ocorrência da cavitação e onde, ao longo do comprimento da ponta, a cavitação é produzida. As pontas estão atualmente sendo modificadas para aumentar a produção de cavitação. Isso pode gerar novas pontas aprimoradas que otimizam os resultados do tratamento clínico.

Em relação aos microrganismos, a literatura apresenta maior quantidade de estudos com bactérias. O efeito bactericida foi descrito pela primeira vez por Scherba et al., que em 1991, no qual descreveram em seu trabalho o efeito bactericida do ultrassom sobre *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, também na forma planctônica. Os resultados deste trabalho mostram como todas as espécies de bactérias analisadas foram mortas pela aplicação do ultrassom, com uma taxa de morte diretamente proporcional ao tempo de exposição e nível de intensidade. O principal efeito ultrassônico, responsável pelo poder bactericida, parecia ser o efeito cavitacional sem diferenças entre bactérias Gram negativas ou Gram positivas. Os autores também avaliaram o fungo *Trichophyton mentagrophytes*, e vírus herpesvírus felino tipo 1 e calicivírus felino. A conclusão dos autores foi que o efeito da cavitação é o mecanismo físico responsável por

danificar os microrganismos, e a frequência de ultrassom testada foi eficaz na inativação de alguns agentes de doença com alguma incerteza sobre a resposta do vírus.

Encontramos poucos artigos relacionando a ação de desinfecção do ultrassom e a ação da cavitação sobre *C. albicans*, isso justifica a escolha desse microrganismo e também pelas diversas formas que esse fungo coloniza e afeta a cavidade oral. Outra razão se diz ao fato de que é difícil erradicar eficazmente *C. albicans* usando agentes antifúngicos tradicionais, principalmente porque a baixa permeabilidade do *C. albicans* parede celular cria forte resistência aos medicamentos (Yang et al., 2018).

Muito se discute sobre *Streptococcus mutans* e seu papel no desenvolvimento da cárie precoce na infância. No entanto *Candida albicans* tem sido frequentemente associada à sua relação sinérgica com *S. mutans* na placa dentária recuperada de crianças. Além disso, estudos anteriores mostraram forte sinergismo quando *C. albicans* e *S. mutans* coexistiram em biofilme, sugerindo que essa coexistência aumentou sua virulência. Durante a saliva, esse fungo pode atuar como uma ponte para as bactérias orais aderirem à superfície da mucosa, um mecanismo que pode proteger essa bactéria de ser removida pelo fluxo salivar e pela deglutição. Tal fato é um mecanismo pelo qual o fungo, na forma de levedura, sobrevive na cavidade oral (Bachtiar et al., 2008; Hemadi et al., 2017).

Outro estudo de Du Q et al., também confirmaram que a interação entre *S. mutans* e *C. albicans* está relacionada com a regulação positiva da maioria genes ligados ao transporte de carboidratos e processos metabólicos (Du Q et al., 2021). Estudos moleculares mostraram que a coexistência de *S. mutans* com *C. albicans* afeta o uso de carboidratos por *S. mutans*, já que os estreptococos orais produzem proteínas ancoradas na parede celular para facilitar a ligação com *C. albicans*. Esses dados fornecem evidências extensas de interações bacterias-fúngicas que podem progredir para lesões dentárias, já que devido à maior penetração em locais

de difícil acesso, tais como raízes do dente, *C. albicans* leva a cáries agressivas e contribui para a rápida progressão da doença (Krzyściak et al., 2017).

Na prática clínica, fica evidente a patogênese de *C. albicans* e essas afirmações demonstraram seu papel crítico e sugerem a necessidade de estudar mais mecanismos de remoção e descontaminação do meio oral. Isso justifica a escolha do microrganismo para o presente estudo, a fim de explorar a ação antimicrobiana desta espécie fúngica.

Um único estudo foi encontrado a respeito da ação da cavitação sobre *C. albicans*, porém para uso tópico em pele. Os resultados demonstram que a aplicação do ultrassom potencializou a ação antibacteriana e a combinação de ultrassom com nanopartículas carregadas de drogas pode ser considerada uma estratégia promissora para infecção fúngica terapêutica, encurtando o período terapêutico e reduzindo a resistência aos medicamentos (Yang et al., 2018).

O componente complexo da parede celular do *C. albicans* é formado por quitina, polissacarídeos e proteínas. Esta estrutura única da parede celular forma uma barreira aos antibióticos e torna difícil entrar na célula de forma eficaz. Uma possível explicação para a ação eficaz do ultrassom é que ele promove a ruptura das nanopartículas, aumentando a cavitação ultrassônica, o que poderia aumentar ainda mais a permeabilidade da parede celular e melhorar a sensibilidade dos antifúngicos (Krzyściak et al., 2017).

Embora obtivemos resultados relevantes, este trabalho pode ser aprimorado e desenvolvido de várias maneiras. Essa linha de pesquisa deve continuar se desenvolvendo, para uma investigação mais profunda se difundir em todos os processos que influenciam como intensidade e atividade do colapso da bolha no fluido, a potência e a pressão acústica. Para muitos desses parâmetros, são

necessárias mais pesquisas para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos.

Trabalhos futuros podem abordar a influência desses resultados na prática clínica, a fim de avaliar seu papel na descontaminação do ambiente oral. Devido à topografia complexa da cavidade oral, esta abordagem tem o potencial de contribuir muito para a melhoria da higiene oral.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a ativação das células planctônicas de *C. albicans* com o dispositivo piezoelétrico não apresentou diferença estatística nas potências de 6,5 W e 7,5W. A potência de 13,6W foi a única que apresentou diferença estatística, e apresentou redução dos microrganismos. Portanto, uma potência mais elevada é mais eficaz na ação antimicrobiana de *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS\*

Agarwal E, Masamatti SS, Kumar A. Escalating role of piezosurgery in dental therapeutics. *J Clin Diagn Res.* 2014 Oct;8(10):ZE08-11. doi: 10.7860/JCDR/2014/9161.4988. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25478473; PMCID: PMC4253291.

Arabaci T, Çiçek Y, Canakçı CF. Sonic and ultrasonic scalers in periodontal treatment: a review. *Int J Dent Hyg.* 2007 Feb;5(1):2-12. doi: 10.1111/j.1601-5037.2007.00217.x. PMID: 17250573.

Bachtiar EW, Bachtiar BM. Relationship between *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in early childhood caries, evaluated by quantitative PCR. *F1000Res.* 2018 Oct 16;7:1645. doi: 10.12688/f1000research.16275.2. PMID: 30450201; PMCID: PMC6221075.

Baker JA, Vora S, Bairam L, Kim HI, Davis EL, Andreana S. Piezoelectric vs. conventional implant site preparation: ex vivo implant primary stability. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Apr;23(4):433-7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02286.x. Epub 2011 Sep 15. PMID: 22092442.

Bensaha T. Evaluation of the capability of a new water lift system to reduce the risk of Schneiderian membrane perforation during sinus elevation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011 Aug;40(8):815-20. doi: 10.1016/j.ijom.2011.04.005. Epub 2011 May 18. PMID: 21592728.

Camargo GA, Abreu MG, Cordeiro Rdos S, Wenderosky Lde F, Duque C. Prevalence of periodontopathogens and *Candida* spp. in smokers after nonsurgical periodontal therapy - a pilot study. *Braz Oral Res.* 2016 Aug 22;30(1):e92. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0092. PMID: 27556680.

Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013 Aug;48(4):428-32. doi: 10.1111/jre.12022. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23137301.

Carvalho GG, Felipe MP, Costa MS. The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Candida albicans* is dependent on medium conditions. *J Microbiol.* 2009 Oct;47(5):619-23. doi: 10.1007/s12275-009-0059-0. Epub 2009 Oct 24. PMID: 19851735.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Chen YL, Chang HH, Chiang YC, Lin CP. Application and development of ultrasonics in dentistry. *J Formos Med Assoc.* 2013 Nov;112(11):659-65. doi: 10.1016/j.jfma.2013.05.007. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23810702.

Cheon K Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci.* 2013 Jun;121(3 Pt 1):148-55. doi: 10.1111/eos.12044. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23659236; PMCID: PMC3652634.

Chiriac G, Herten M, Schwarz F, Rothamel D, Becker J. Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery) on chip morphology, cell viability and differentiation. *J Clin Periodontol.* 2005 Sep;32(9):994-9. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00809.x. PMID: 16104964.

Claire S, Lea SC, Walmsley AD. Characterisation of bone following ultrasonic cutting. *Clin Oral Investig.* 2013 Apr;17(3):905-12. doi: 10.1007/s00784-012-0754-9. Epub 2012 May 26. PMID: 22638772.

Du Q, Ren B, He J, Peng X, Guo Q, Zheng L, et al. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. *ISME J.* 2021 Mar;15(3):894-908. doi: 10.1038/s41396-020-00823-8. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33149208; PMCID: PMC8026629.

Eggers G, Klein J, Blank J, Hassfeld S. Piezosurgery: an ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Oct;42(5):451-3. doi: 10.1016/j.bjoms.2004.04.006. PMID: 15336773.

Felver B, King DC, Lea SC, Price GJ, Walmsley AD. Scanning laser vibrometry and luminol photomicrography to map cavitation activity around ultrasonic scalars. *Prod of SPIE* 2008, 7098: Q980

Felver B, King DC, Lea SC, Price GJ, Damien Walmsley A. Cavitation occurrence around ultrasonic dental scalars. *Ultrason Sonochem.* 2009 Jun;16(5):692-7. doi: 10.1016/j.ultsonch.2008.11.002. Epub 2008 Nov 13. PMID: 19119051.

Fragkou S, Balasouli C, Tsuzukibashi O, Argyropoulou A, Menexes G, Kotsanos N, et al. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children. *Eur*

Arch Paediatr Dent. 2016 Oct;17(5):367-375. doi: 10.1007/s40368-016-0239-7. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27357362.

Fugito Junior K, Cortes AR, de Carvalho Destro R, Yoshimoto M. Comparative Study on the Cutting Effectiveness and Heat Generation of Rotary Instruments Versus Piezoelectric Surgery Tips Using Scanning Electron Microscopy and Thermal Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018 Mar/Apr;33(2):345-350. doi: 10.11607/jomi.5806. PMID: 2953412.

Garcia MT. Clorina com fotossensibilizador para Terapia Fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* [dissertação]. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

Gelpi F, De Santis D, Marconcini S, Briguglio F, Finotti M. A piezo surgery with corticotomies and implant placement as part of a multidisciplinary approach to treat malocclusion disorder in an adult patient: clinical report. *Int J Implant Dent*. 2015 Dec;1(1):23. doi: 10.1186/s40729-015-0021-3. Epub 2015 Aug 13. PMID: 27747645; PMCID: PMC5005651.

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1128-33. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.006. Epub 2011 Jun 23. PubMed PMID: 21763907.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26806384; PMCID: PMC4860025.

Hartmann RC, Neuvald L, Barth V Jr, de Figueiredo JAP, de Oliveira SD, Scarparo RK, et al. Antimicrobial efficacy of 0.5% peracetic acid and EDTA with passive ultrasonic or manual agitation in an *Enterococcus faecalis* biofilm model. *Aust Endod J*. 2019 Apr;45(1):57-63. doi:10.1111/aej.12279. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30105835.

Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci*. 2017 Nov 10;9(11):e1. doi: 10.1038/ijos.2017.35. PMID: 29125139; PMCID: PMC5775330.

Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPPA. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J*. 2017

Oct;50(10):933-940. doi:10.1111/iej.12713. Epub 2016 Dec 3. PubMed PMID: 27775835.

Howlin RP, Fabbri S, Offin DG, Symonds N, Kiang KS, Knee RJ, et al. Removal of Dental Biofilms with an Ultrasonically Activated Water Stream. *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9):1303-9. doi: 10.1177/0022034515589284. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26056055.

Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):132-41. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01347.x. PubMed PMID: 19207889.

Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem*. 2003 Oct;10(6):315-8. doi: 10.1016/S1350-4177(03)00101-9. PMID: 12927605.

Kawashima H, Sato S, Kishida M, Ito K. A comparison of root surface instrumentation using two piezoelectric ultrasonic scalers and a hand scaler in vivo. *J Periodontal Res*. 2007 Feb;42(1):90-5. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00924.x. PMID: 17214645.

Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Kołodziej I, et al. Effect of a *Lactobacillus Salivarius* Probiotic on a Double Species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* Caries Biofilm. *Nutrients*. 2017 Nov 14;9(11):1242. doi: 10.3390/nu9111242. PMID: 29135948; PMCID: PMC5707714.

Lauterborn W, Mettin R. 3 - Acoustic cavitation: bubble dynamics in high-power ultrasonic fields. In: Gallego-Juárez JA, Graff KF (editors). *Power Ultrasonics*. Woodhead Publishing; 2015. p 37-78. ISBN 9781782420286

Lea SC, Price GJ, Walmsley AD. A study to determine whether cavitation occurs around dental ultrasonic scaling instruments. *Ultrason Sonochem*. 2005 Feb;12(3):233-6. doi: 10.1016/j.ultsonch.2003.10.006. PMID: 15491887.

Lea SC, Walmsley AD. Mechano-physical and biophysical properties of power-driven scalers: driving the future of powered instrument design and evaluation.

Periodontol 2000. 2009;51:63-78. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00300.x. PMID: 19878470.

Leclercq P, Zenati C, Dohan DM. Ultrasonic bone cut part 2: State-of-the-art specific clinical applications. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jan;66(1):183-8. doi: 10.1016/j.joms.2005.12.050. PMID: 18083438.

Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J.* 2017 Nov 10;223(9):675-681. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.886. PMID: 29123282.

Li J, Wu T, Peng W, Zhu Y. Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol.* 2020 Apr 17;20(1):99. doi: 10.1186/s12866-020-01761-3. PMID: 32303183; PMCID: PMC7165372.

Macedo RG, Verhaagen B, Fernandez Rivas D, Gardeniers JG, van der Sluis LW, Wesselink PR, et al. Sonochemical and high-speed optical characterization of cavitation generated by an ultrasonically oscillating dental file in root canal models. *Ultrason Sonochem.* 2014 Jan;21(1):324-35. doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.03.001. Epub 2013 Apr 2. PubMed PMID: 23735893.

Manmi KMA, Wu WB, Vyas N, Smith WR, Wang QX, Walmsley AD. Numerical investigation of cavitation generated by an ultrasonic dental scaler tip vibrating in a compressible liquid. *Ultrason Sonochem.* 2020 May;63:104963. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.104963. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31986331.

Manoil D, Filieri A, Gameiro C, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Sep;11(3):372-9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.06.003. Epub 2014 Jun 25. PMID: 24973577.

Marques AC, Lopes GR, Samico RP, Matos JD, Corat EJ, Nishioka RS. Evaluation of temperature and osteotomy speed with piezoelectric system. *Minerva Dent Oral Sci.* 2021 Apr;70(2):65-70. doi: 10.23736/S2724-6329.20.04328-9. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32698562.

Mcfall TA, Yamane GM, Burnett GW. Comparison of the cutting effect on bone of an ultrasonic cutting device and rotary burs. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv.* 1961 May;19:200-9. PMID: 13773910.

Mozo S, Llana C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012

May 1;17(3):e512-6. Review. PubMed PMID: 22143738; PubMed Central PMCID:PMC3476090

O'Leary R, Sved AM, Davies EH, Leighton TG, Wilson M, Kieser JB. The bactericidal effects of dental ultrasound on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. An in vitro investigation. *J Clin Periodontol*. 1997 Jun;24(6):432-9. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00208.x. PMID: 9205923

Pavlíková G, Foltán R, Horká M, Hanzelka T, Borunská H, Sedý J. Piezosurgery in oral and maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 May;40(5):451-7. doi: 10.1016/j.ijom.2010.11.013. Epub 2010 Dec 19. PMID: 21176870.

Pecheva E, Sammons RL, Walmsley AD. The performance characteristics of a piezoelectric ultrasonic dental scaler. *Med Eng Phys*. 2016 Feb;38(2):199-203. doi: 10.1016/j.medengphy.2015.10.008. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26654578.

Peters BA, Wu J, Hayes RB, Ahn J. The oral fungal mycobiome: characteristics and relation to periodontitis in a pilot study. *BMC Microbiol*. 2017 Jul 12;17(1):157. doi: 10.1186/s12866-017-1064-9. PMID: 28701186; PMCID: PMC5508751.

Preti G, Martinasso G, Peirone B, Navone R, Manzella C, Muzio G, et al. Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):716-22. doi: 10.1902/jop.2007.060285. PMID: 17397320.

Robiony M, Polini F, Costa F, Vercellotti T, Politi M. Piezoelectric bone cutting in multipiece maxillary osteotomies. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jun;62(6):759-61. doi: 10.1016/j.joms.2004.01.010. PMID: 15170295.

Sarkinias A, Sakalauskiene K, Raisutis R, Zeime J, Salaseviciene A, Puidaite E, et al. Inactivation of some pathogenic bacteria and phytoviruses by ultrasonic treatment. *Microb Pathog*. 2018 Oct;123:144-148. doi:10.1016/j.micpath.2018.07.004. Epub 2018 Jul 6. PubMed PMID: 29981853.

Scherba G, Weigel RM, O'Brien WD Jr. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol*. 1991 Jul;57(7):2079-84. doi: 10.1128/aem.57.7.2079-2084.1991. PMID: 1892396; PMCID: PMC183525.

Seshan H, Konuganti K, Zope S. Piezosurgery in periodontology and oral implantology. *J Indian Soc Periodontol*. 2009 Sep;13(3):155-6. doi: 10.4103/0972-124X.60229. PMID: 20379414; PMCID: PMC2848787.

Silva LGVR. Desenvolvimento de um sistema de transdutores piezoelétricos para melhorar a mistura de fluidos [dissertação]. Braga: Escola de Engenharia, Universidade de Minho; 2012

Sohn DS, Ahn MR, Lee WH, Yeo DS, Lim SY. Piezoelectric osteotomy for intraoral harvesting of bone blocks. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 Apr;27(2):127-31. PMID: 17514884.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006 Aug;51(8):672-80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005. Epub 2006 Apr 18. PMID: 16620775.

Thomas M, Akula U, Ealla KK, Gajjada N. Piezosurgery: A Boon for Modern Periodontics. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017 Jan-Feb;7(1):1-7. doi: 10.4103/2231-0762.200709. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28316942; PMCID: PMC5343677.

Torrella F, Pitarch J, Cabanes G, Anitua E. Ultrasonic ostectomy for the surgical approach of the maxillary sinus: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998 Sep-Oct;13(5):697-700. PMID: 9796155.

Tzanakis I, Lebon GS, Eskin DG, Pericleous KA. Characterizing the cavitation development and acoustic spectrum in various liquids. *Ultrason Sonochem*. 2017 Jan;34:651-662. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.06.034. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27773292.

Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol*. 2008 Dec;46(8):783-93. doi: 10.1080/13693780802060899. PMID: 18608938.

van Wijngaarden L. Mechanics of collapsing cavitation bubbles. *Ultrason Sonochem*. 2016 Mar;29:524-7. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.04.006. Epub 2015 Apr 8. PMID: 25890856.

Vercellotti T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol.* 2004 May;53(5):207-14. English, Italian. PMID: 15263877.

Verhaagen B, Fernández Rivas D. Measuring cavitation and its cleaning effect. *Ultrason Sonochem.* 2016 Mar;29:619-28. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.03.009. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25819680.

Vyas N, Manmi K, Wang Q, Jadhav AJ, Barigou M, Sammons RL, Kuehne SA, Walmsley AD. Which Parameters Affect Biofilm Removal with Acoustic Cavitation? A Review. *Ultrasound Med Biol.* 2019 May;45(5):1044-1055. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.01.002. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30792088.

Vyas N, Pecheva E, Dehghani H, Sammons RL, Wang QX, Leppinen DM, Walmsley AD. High Speed Imaging of Cavitation around Dental Ultrasonic Scaler Tips. *PLoS One.* 2016 Mar 2;11(3):e0149804. doi: 10.1371/journal.pone.0149804. PMID: 26934340; PMCID: PMC4775067.

Vyas N, Dehghani H, Sammons RL, Wang QX, Leppinen DM, Walmsley AD. Imaging and analysis of individual cavitation microbubbles around dental ultrasonic scalers. *Ultrasonics.* 2017 Nov;81:66-72. doi: 10.1016/j.ultras.2017.05.015. Epub 2017 May 24. PMID: 28595164.

Vyas N, Grewal M, Kuehne SA, Sammons RL, Walmsley AD. High speed imaging of biofilm removal from a dental implant model using ultrasonic cavitation. *Dent Mater.* 2020a Jun;36(6):733-743. doi: 10.1016/j.dental.2020.03.003. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32299665.

Vyas N, Wang QX, Manmi KA, Sammons RL, Kuehne SA, Walmsley AD. How does ultrasonic cavitation remove dental bacterial biofilm? *Ultrason Sonochem.* 2020b Oct;67:105112. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105112. 2020 Mar 28. PMID: 32283494.

Wallace SS, Mazor Z, Froum SJ, Cho SC, Tarnow DP. Schneiderian membrane perforation rate during sinus elevation using piezosurgery: clinical results of 100 consecutive cases. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007 Oct;27(5):413-9. PMID: 17990437.

Walmsley AD, Lea SC, Felver B, King DC, Price GJ. Mapping cavitation activity around dental ultrasonic tips. *Clin Oral Investig.* 2013 May;17(4):1227-34. doi:10.1007/s00784-012-0802-5. Epub 2012 Aug 15. PubMed PMID: 22893034.

Wang Z, Bi X, Xiang R, Chen L, Feng X, Zhou M, Che Z. Inactivation of *Escherichia coli* by Ultrasound Combined with Nisin. *J Food Prot.* 2018 Jun;81(6):993-1000. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-023. PubMed PMID: 29757008.

Yaman Z, Suer BT. Piezoelectric surgery in oral and maxillofacial surgery. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery* 2013 Feb 01;1(1):5

Yang M, Xie S, Adhikari VP, Dong Y, Du Y, Li D. The synergistic fungicidal effect of low-frequency and low-intensity ultrasound with amphotericin B-loaded nanoparticles on *C. albicans* in vitro. *Int J Pharm.* 2018 May 5;542(1-2):232-241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.03.033. Epub 2018 Mar 17. PMID: 29559330.

Yang Y, Hwang EH, Park BI, Choi NY, Kim KJ, You YO. *Artemisia princeps* Inhibits Growth, Biofilm Formation, and Virulence Factor Expression of *Streptococcus mutans*. *J Med Food.* 2019 Jun;22(6):623-630. doi: 10.1089/jmf.2018.4304. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31021282.