



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

**LEANDRO WAGNER FIGUEIRA**

**APLICAÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB  
PRESSÃO ATMOSFÉRICA NO CONTROLE DE BIOFILMES  
CARIOGÊNICOS**

2022

**LEANDRO WAGNER FIGUEIRA**

**APLICAÇÃO DO PLASMA DE BAIXA TEMPERATURA SOB PRESSÃO  
ATMOSFÉRICA NO CONTROLE DE BIOFILMES CARIOGÊNICOS**

Tese 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 DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico

Orientadora: Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Profa. Dra. Marcia Hiromi Tanaka

Supervisora no exterior: Profa. Dra. Simone Duarte

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).

Figueira, Leandro Wagner

Aplicação do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica no controle de biofilmes cariogênicos / Leandro Wagner Figueira. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

85 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Marcia Hiomi Tanaka

1. Plasma frio. 2. Biofilme. 3. Cárie. I. Koga Ito, Cristiane Yumi, orient. II. Tanaka, Marcia Hiomi, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Tit. Cristiane Yumi Koga Ito** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Câmpus de São José dos Campos

**Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Câmpus de São José dos Campos

**Dra. Noala Vicensoto Moreira Milhan**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Câmpus de São José dos Campos

**Dr. Fellype do Nascimento**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá

Câmpus de Guaratinguetá

**Profa. Dra Laura Soares Souto Lepesqueur**

Universidade de Santo Amaro (UNISA)

Câmpus Santo Amaro

São José dos Campos, 10 de março de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta obra principalmente ao meu Deus, meu Senhor Jesus Cristo e Minha mãe Nossa Senhora Aparecida que em todos os passos que dei em busca deste sonho, estiveram me proporcionando o melhor caminho para a realização.

Senhor, durante todo este tempo, mesmo em tempo de extrema dificuldades pessoais e profissionais, esteve me amparando, me inspirando, me ensinando, guardando meus passos, abençoando minha mente, minhas mãos, minha saúde. Sem Ele e Nossa Senhora Aparecida seria impossível ter chegado até aqui.

Por tudo, obrigado Senhor.

## AGRADECIMENTOS

*A toda minha família, e principalmente ao meu pai Walter Donizette de Souza, Ana Paula Salgado Andrade e minha ORIENTADORA.*

Foram vocês que estiveram ao meu lado durante os momentos mais difíceis de minha vida, quando minha força se exauriu, minha fé se abalou e minha esperança em um futuro melhor adiada.

É em uma conversa com meu pai, que encontro o conselho adequado, as orientações necessárias para minha caminhada. Seus conselhos são como luzes para o caminho que busco trilhar. Sua fé e esperança são princípios que não me deixa desistir jamais.

Por muitas vezes, foi com minha orientadora, hoje minha amiga, que obtive palavras de conforto e atenção em momentos difíceis. Esteve comigo em todos momentos durante meu doutorado, a você, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas, muita gratidão pelo conhecimento trocado e por todas colaborações neste período.

A toda minha família meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2018/17707-3 e 2019/01670-4,- muito obrigado pelo investimento em minha

qualificação e na minha evolução como ser humano. Todo conhecimento obtido durante minha jornada será transmitido da melhor maneira possível!

Agradeço também o laboratório multiusuários do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba pela colaboração na microscopia confocal.

*“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário. A maioria de nós prefere olhar para fora e não para dentro de si mesmo”.*

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Fontes geradoras de PBTPA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1 Fonte geradora de PBTPA-argônio.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Dispositivo gerador de PBTPA-hélio.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Micro-organismos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Curva de crescimentos dos micro-organismos .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Efeito antibiofilme do PBPTA-argônio sobre biofilmes cariogênicos....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1 Formação do Biofilme .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2 Aplicação do PBPTA (Kinpen09®) e processamento do biofilme.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4.3 Microscopia de varredura a laser confocal dos biofilmes multiespécies tratados com PBTPA-argônio .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Efeito antibiofilme do PBPTA-hélio sobre biofilmes cariogênicos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.1 Formação do Biofilme .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.2 Aplicação do PBPTA-hélio e processamento do biofilme .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5.3 Análise dos biofilmes multiespécies tratados com PBTPA-hélio por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>29</b>
<b>3.5.4 Análise dos biofilmes multiespécies tratados com PBTPA-hélio por microscopia de varredura a laser confocal .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6 Análise Estatística .....</b>	<b>31</b>
<b>4 RESULTADO .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Resultados PBTPA-argônio.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.1 Curva de crescimento.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.2 Biofilmes mono-espécies .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.3 Efeito do PBTPA-argônio sobre biofilmes cariogênicos dual e multi-espécies.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Análise dos biofilmes cariogênicos tratados com PBTPA-argônio por microscopia confocal de varredura a laser (CSLM).....</b>	<b>42</b>

<b>4.3 Efeitos do PBTPA-hélio sobre biofilmes cariogênicos .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.1 Biofilmes multi-espécies.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.3 Análise dos biofilmes multi-espécies cariogênicos expostos ao PBTPA-hélio por MEV .....</b>	<b>50</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Efeito do PBTPA-argônio sobre biofilmes cariogênicos.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Efeito do PBTPA-hélio sobre biofilmes cariogênicos .....</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

Figueira LW. Aplicação do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica no controle de biofilmes cariogênicos [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

## RESUMO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a aplicação dos jatos de plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA) produzidos por gás de argônio e hélio como gases de trabalho, no controle de biofilmes cariogênicos. Para tanto, foram estabelecidos os parâmetros físicos dos PBTPA gerados com argônio e hélio que se mostraram efetivos frente a biofilmes mono, dual e polimicrobianos compostos por combinações das espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Candida albicans* e *Actinomyces naeslundii*. Os biofilmes mono, dual e multi-espécies foram submetidos ao tratamento com PBTPA produzidos por dois dispositivos diferentes, um obtido comercialmente (kINPen09<sup>®</sup>) que usou argônio como gás de trabalho, e outro protótipo desenvolvido pela FEG-UNESP (Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá) que usou hélio. Análises quantitativas e microscópicas (confocal, microscopia eletrônica de varredura) foram realizadas. Foi incluído controle negativo (sem tratamento), positivo (clorexidina 0,12%) e controle de gás, utilizando apenas fluxo de gás, sem produzir plasma. Além disso, os efeitos celulares do PBTPA-argônio e hélio sobre biofilme dual e multi-espécies também foram analisados em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de varredura a laser confocal. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. Os resultados foram tabulados e analisados quanto à distribuição. A seguir, os testes estatísticos mais adequados foram selecionados. O nível de significância foi de 5%. Os resultados obtidos para os tratamentos dos biofilmes mono, dual ou multi-espécies com PBTPA-argônio e hélio foram todos significativos em comparação ao controle negativo em todos os tempos analisados. Para PBTPA-argônio, não houve recuperação de *S. gordonii* e *S. sanguinis* em todos tempos analisados. Para PBTPA-hélio, os melhores resultados foram obtidos em 5 e 7 minutos de exposição dos biofilmes ao PBTPA. Finalmente, tanto o dispositivo gerador de PBTPA que trabalhou com gás argônio quanto o dispositivo que trabalhou com gás hélio, demonstraram resultados promissores e poderão contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos de Odontologia de Intervenção Mínima.

Palavras-chave: Cárie. Plasma frio. Biofilme. *Streptococcus mutans*.  
*Streptococcus gordonii*. *Streptococcus sanguinis*. *Lactobacillus acidophilus*.  
*Lactobacillus casei*. *Candida albicans*. *Actinomyces naeslundii*.

*Figueira LW. Application of low temperature plasma under atmospheric pressure in the control cariogenic biofilms [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.*

## **ABSTRACT**

*The general objective of this study was to evaluate the application of low-temperature plasma under atmospheric pressure (PBTPA) of argon and helium flow, in the control of cariogenic biofilms. For this, the effective physical parameters of PBTPA-argon and helium in mono, dual and polymicrobial biofilms composed of combinations of the species Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii, Streptococcus sanguinis, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Candida albicans and Actinomyces naeslundii were established. The multi-species biofilms were treated by different PBTPA generating devices, one obtained commercially (kINPen09®) that used argon as working gas, and another prototype developed by FEG-UNESP (Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá) that used helium as working gas. Quantitative and microscopic analyzes (confocal, scanning electron microscopy) were performed. Negative control (no treatment), positive control (chlorhexidine 2%) and gas control (argon) were included. Besides that, cellular effects of PBTPA-argon and helium on dual and multi-species biofilms were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy. The results obtained for the treatments of mono, dual or multispecies biofilms with both PBTPA-argon and helium were all significant when compared to the negative control at all times analyzed. For PBTPA-argon, there was no recovery of S. gordonii and S. sanguinis at all analyzed times. For PBTPA-helium, the best results were obtained at 5 and 7 min of exposure of biofilms to PBTPA. All the tests were carried out in triplicate in three independent experiments. The results are tabulated and analyzed in terms of distribution. Next, the most suitable statistical tests were selected. The level of significance was 5%. The results obtained for the treatments of mono, dual or multi-species biofilms with PBTPA-argon and helium were all significant compared to the negative control at all analyzed times. Finally, both PBTPA generating could contribute to the development of new protocols for Minimal Intervention Dentistry.*

*Keywords: Streptococcus mutans. Streptococcus gordonii. Streptococcus sanguinis. Lactobacillus acidophilus. Lactobacillus casei. Candida albicans. Actinomyces naeslundii. cold plasma. caries. biofilm.*

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da prevalência de cárie ter diminuído em países desenvolvidos e ter sido delimitada a alguns setores da população (Frencken, 2018), essa doença ainda é prevalente em crianças até 6 anos de idade nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Martignon et al., 2021; So et al., 2017; Sampaio et al., 2021). Uma das grandes dificuldades que países em desenvolvimento encontram no combate da doença de cárie é a falta de investimentos neste setor, o que inviabiliza os serviços odontológicos tornando os tratamentos inacessíveis pela escassez de profissionais (Teshome et al., 2020). Além disso, a falta de conscientização, aspectos de grupo populacional e o nível socioeconômico da população também podem afetar a prevalência da cárie dentária (Sampaio et al., 2021).

A doença de cárie pode ser causada pelo consumo frequente de sacarose combinado com o biofilme dentário composto por micro-organismos produtores de ácido (de Freitas et al., 2017; Nigell et al., 2017). O biofilme dental cariogênico é formado por comunidades microbianas altamente organizadas que estão embebidos em uma matriz rica em polissacarídeos, aderidas à superfície dentária (Colombo et al., 2015).

A comunidade microbiana que compõe o biofilme cariogênico é bem organizada e possui matriz extracelular que podem apresentar mecanismos capazes de interferir na ação dos antibióticos (Boles et al., 2004), além de também estar relacionada a transferência de genes entre os micro-organismos (Sharma et al., 2019). Relatos na literatura indicam que os micro-organismos em biofilme são mais resistentes aos agentes externos quando comparados às células em formas planctônicas (Mah, 2012).

A formação do biofilme cariogênico é um processo contínuo com várias etapas. Primeiramente, forma-se a película adquirida, seguida da colonização

primária, posterior proliferação dos micro-organismos aderidos, co-agregação secundária e, por fim, ocorre o processo de maturação do biofilme (Souza et al., 2016). Para que a progressão da doença ocorra, os micro-organismos precisam de uma fonte de carboidratos da dieta, tempo de exposição e um hospedeiro suscetível. Bactérias orais fermentam esses carboidratos, iniciando assim a doença. A partir daí, a população de bactérias produtoras e tolerantes aos ácidos aumentam, o ambiente ácido proporcionado por essas bactérias leva à redução do pH ambiental, desmineralização da superfície dentária e formação de lesões de cárie (Takahashi et al., 2008; Arthur et al., 2013; Gomar-Vercher et al., 2014).

A sacarose é considerada um dos carboidratos mais cariogênicos, sendo capaz de estimular modificações bioquímicas e fisiológicas no biofilme dentário. Além disso, os carboidratos podem alterar o fenótipo do micro-organismo durante a formação do biofilme cariogênico (Nascimento et al., 2021). A redução do pH provoca seleção de micro-organismos acidofílicos e acidogênicos na microflora residente, o que resulta em um ambiente ainda mais cariogênico (Tabata et al., 2021). A sacarose pode servir como substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares (Kreth et al., 2008), além disso, é comprovada a hipótese da sacarose ter a capacidade de reduzir as concentrações de cálcio (Ca), fósforo inorgânico e flúor em biofilmes orais. Esses íons de crucial importância estão ligados à remineralização do esmalte e da dentina (Tenuta et al., 2019; Yoshihara et al., 2020).

Os estreptococos constituem mais de 80% dos constituintes iniciais do biofilme e são responsáveis pelo processo de colonização inicial. *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii* estão entre as espécies iniciais a colonizar a superfície dentária (Rosan, Lamont, 2000). Esses micro-organismos são capazes de expressar moléculas de adesina na superfície celular com capacidade de ligação na superfície dentária (Nobbs et al., 2007). Além disso, elas são capazes de aderir através de suas fímbrias na camada de hidroxiapatita revestida com saliva

(Fachon-Kalweit et al., 1985). Por esta razão, eles competem para se ligar aos mesmos receptores no hospedeiro (Nobbs et al., 2007). O desenvolvimento de cáries pode estar associado a *Streptococcus mutans* e lactobacilos, bem como à diminuição da diversidade geral de outras espécies que colonizam a cavidade oral (Caufield et al., 2000; Li et al., 2007; Sounah, Madfa, 2020). As interações entre as espécies de estreptococos orais podem desempenhar um papel significativo nessa mudança. Quando em grande quantidade no biofilme dental, alguns estreptococos podem ter uma característica benéfica ao antagonizar *S. mutans*, conforme pode ser demonstrado em Becker et al. (2002). Um experimento *in vitro* também demonstrou uma possível base molecular desse antagonismo, indicando que *S. sanguinis* e *S. gordonii* estão envolvidos com *S. mutans* para o domínio sobre um determinado nicho (Kreth et al., 2008). *S. mutans* não é considerado um colonizador precoce, porém possui importantes mecanismos capazes de metabolizar carboidratos, o que resulta em ácidos, além de gerar uma matriz polissacarídica extracelular (Lemos et al., 2019).

Além dos estreptococos, já descritos anteriormente como sendo uns dos principais colonizadores envolvidos na formação de cárie dental, *Lactobacillus* spp. também estão envolvidos no processo de formação de lesões de cárie (Jang et al., 2021; Kuramitsu, Wang, 2006; Nishikawara et al., 2007). *Lactobacillus* spp. estão presentes em muitos sistemas do organismo humano (Rajoka et al., 2017), na cavidade bucal estas bactérias estão amplamente implicadas no desenvolvimento de doença de cárie. Estudos demonstram que também estão presentes em elevados números na saliva, dorso da língua, na mucosa oral e palato (Parisotto et al., 2010; Tanzer et al., 2001). Além disso, estão intimamente implicados na metabolização de carboidratos provenientes da dieta e assim como *S. mutans*, podem exibir alto potencial acidogênico, resultando em liberação de grandes quantidades de ácido láctico com diminuição do pH da cavidade bucal até

ao ponto de inibir o crescimento de micro-organismos intolerantes aos ácidos (Yang et al., 2010; Byun et al., 2004).

Além de *Candida albicans* ter alta tolerância aos ácidos formados no biofilme cariogênico durante a fermentação de carboidratos, este micro-organismo também é capaz de produzir ácidos mesmo em condições de baixo pH. Essas características podem favorecer o fungo nas alterações microbianas associadas à cárie dentária (Klinke et al., 2009; Pereira et al., 2017). A frequência de isolamento de *C. albicans* é significativamente maior em biofilmes associados à cárie (Fragkou et al., 2016; Naidu et al., 2016; Carvalho et al., 2006; Yang et al., 2012; Moraga et al., 2016). Evidências indicam que biofilmes formados por *C. albicans* e *S. mutans* podem apresentar maior potencial cariogênico em comparação aos biofilme mono-espécie formado por uma dessas espécie (Falsetta et al., 2014; Hwang et al., 2015; Hwang et al., 2017). Neste sentido, biofilmes dual-espécie formados por *C. albicans* e *S. mutans* em modelos de roedores levaram à maior gravidade da lesão de cárie (Falsetta et al., 2014). Sendo assim, pode haver uma associação positiva entre a presença de *C. albicans* e o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos, especialmente em condições específicas, como cárie na primeira infância (Qiu et al., 2015; Li et al., 2014; Xiao et al., 2018).

*Actinomyces naeslundii* foi correlacionado com o equilíbrio ecológico do biofilme e está frequentemente associado a uma microbiota saudável (Takahashi et al., 2008). Esta espécie pode aumentar o pH local pela produção de amônia, álcali (Liu et al., 2012; Nascimento et al., 2009) e também pode metabolizar o ácido láctico em ácidos mais fracos (Takahashi et al., 1999). No entanto, quando os biofilmes são frequentemente expostos a desafios com ácido, esta espécie pode expressar um fenótipo mais patogênico e contribuir ainda mais para o desenvolvimento da cárie dentária (Takahashi et al., 2008; Brighenti et al., 2014).

Até o momento, o papel desta espécie na iniciação da cárie não é completamente compreendido (de Oliveira et al., 2020).

Outro ponto importante a ser mencionado é como podemos aprimorar os protocolos atuais existentes no tratamento da cárie. Nesse sentido, nos últimos anos, a odontologia minimamente invasiva (MID) tem se apresentado como uma alternativa de tratamento para a cárie que visa controlar ou paralisar a atividade da doença por meio de técnicas não operatórias (não invasivas) que evitam a perda desnecessária de tecido e menos danos ao complexo pulpar de dentina (Mackenzie et al., 2017). Assim, o tratamento restaurador atraumático (ART), técnica utilizada para restaurar dentes acometidos por cárie utilizando apenas instrumentos manuais, é um exemplo de MID que vem sendo utilizado com sucesso na clínica (Maia et al., 2021). Possibilidades de aprimoramento do ART a fim de promover métodos de melhor desempenho, capazes de remover quase completamente o biofilme formado por micro-organismos cariogênicos antes do procedimento restaurador, têm sido demonstradas (Mohan et al., 2016). Recentemente, a terapia com plasma frio foi sugerida como uma ferramenta terapêutica potencial no tratamento da doença de cárie, devido à sua eficácia antimicrobiana contra bactérias cariogênicas (Qi et al., 2022).

O plasma é o quarto estado da matéria, constituído por gás ionizado formado por átomos e/ou moléculas e íons em diferentes densidades e temperaturas. É um meio condutivo e responde a campos elétricos e magnéticos (Laroussi, 2018). O plasma pode ser produzido em laboratório, sob certas condições, ao ser aplicado um estímulo elétrico apropriado, como alta-tensão, micro-ondas e radiofrequência, a gases nobres ou moleculares, como argônio, hélio, oxigênio e nitrogênio (Laroussi, 2018; Kong et al., 2009; Bourke et al., 2017; Neyts, Brault, 2016). Plasmas frios que atingem temperaturas abaixo de 40 °C são biologicamente viáveis (Figueira et al., 2021; Kong et al., 2009; Neyts, Brault, 2016). Além disso, o plasma pode ser gerado sob diferentes pressões.

Plasmas frios aplicados na área biológica geralmente são produzidos à pressão atmosférica e são chamados de plasmas frios de pressão atmosférica (Dezest et al., 2017). Nesse sentido, entre os diferentes tipos de plasmas, o plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA) é o mais promissor para aplicações biomédicas.

A atividade antimicrobiana do PBTPA sobre micro-organismos orais (*S. mutans*, *C. albicans* e *Enterococcus faecalis*) foi investigada, com a finalidade de avaliar seu potencial para aplicação clínica. Um teste de exposição direta em superfície sólida, teste de exposição indireta em fase líquida e quantificação de espécies reativas de oxigênio foram conduzidos. Este estudo demonstrou que o jato PBTPA pode esterilizar superfícies contendo micro-organismos orais presentes tanto em meios sólidos quanto líquidos e que as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) influenciaram esse efeito de esterilização (Yamazaki et al., 2011). As espécies à base de oxigênio geradas pela descarga de plasma incluem hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), radical hidroxila (•OH), oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e ozônio (O<sub>3</sub>). As espécies à base de nitrogênio são óxido nítrico (•NO), dióxido de nitrogênio (•NO<sub>2</sub>), tetróxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), trióxido de nitrogênio (NO<sub>3</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). As espécies reativas podem ser formadas por interação do PBTPA com o ar ou líquido. Enquanto os radicais hidroxila e óxidos nítricos são exclusivamente formados por interações PBTPA-ar. Nitritos, nitratos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com tempos de vida relativamente mais longos são formados por interações PBTPA -líquido (Von Woedtke et al., 2019; Takamatsu et al., 2014). Por exemplo, esta última interação ocorre quando as células do meio de cultivo são expostas ao plasma (Tanaka et al., 2016). Além disso, o PBTPA pode gerar íons carregados positivamente, como N<sup>2+</sup> (Kim et al., 2010) e também elétrons (Kalghatgi et al., 2011). Além dos PBTPA poder formar esses ERO e ERN que causam efeito direto sobre a parede celular dos micro-organismos, a descarga de

plasma também pode reduzir a viabilidade das bactérias pela formação de radiação UV e também pela corrente elétrica (Pai et al., 2018).

Delbe et al. (2016) determinaram os efeitos da PBTPA de argônio sobre biofilmes de mono e dual-espécies compostos por *C. albicans* e *Staphylococcus aureus*. Os biofilmes foram expostos ao PBTPA por 60 segundos e todos os biofilmes tratados com plasma apresentaram uma redução significativa em comparação ao controle negativo (não exposto). Além disso, o PBTPA mostrou baixa citotoxicidade com base em um teste de epitélio oral reconstituído (Delben et al., 2016). Chiodi et al. (2018) relataram que PBTPA que utiliza hélio como gás de trabalho reduziu a viabilidade de biofilmes de *C. albicans* com 5 minutos de exposição PBTPA, com baixa citotoxicidade para células Vero. No mesmo estudo, o PBTPA foi usado para tratar a candidíase oral induzida experimentalmente e as análises histológicas mostraram uma diminuição significativa na invasão fúngica tecidual (Chiodi et al., 2018).

Também foi relatado o efeito do PBTPA sobre biofilmes de *Porphyromonas gingivalis* cultivados em discos de titânio (Carreiro et al., 2019). Após 1 e 3 min de tratamento, uma redução significativa de células viáveis foi observada quando comparado ao controle negativo (não exposto). Além disso, foi observada baixa toxicidade às células do epitélio gengival (Carreiro et al., 2019). Outro estudo demonstrou que *S. mutans* pode ser inativado usando PBTPA-hélio. Assim, a cultura de *S. mutans* foi semeada na superfície do ágar foi posteriormente exposta ao plasma. Após a aplicação do plasma nesta superfície, a placa foi incubada e o padrão espacial das colônias bacterianas das amostras foram fotografadas. As imagens obtidas revelaram que o crescimento de *S. mutans* na superfície do ágar foi reduzido e um halo de inibição de 5 mm de diâmetro foi observado, sugerindo que um tratamento direcionado para regiões específicas seria possível (Goree et al., 2006).

Assim, considerando os resultados obtidos no presente trabalhos sobre o efeito do PBTPA sobre diferentes formações de biofilmes orais, esse trabalho tem muito a contribuir futuramente no desenvolvimento de novos protocolos que poderão ser utilizados na clínica no tratamento restaurador atraumático, substituindo os existentes por métodos mais modernos e inovadores. Além disso, trabalhos que envolvam biofilmes cariogênicos seguida de tratamento com PBTPA são escassos na literatura e este presente trabalho também poderá contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos nos futuros trabalhos a serem desenvolvidos.

Este trabalho analisa a ação de dois equipamentos diferentes que opera com gases de trabalho distintos, o que possibilitará uma compreensão melhor da ação do PBTPA sobre diferentes biofilmes cariogênicos formados *in vitro*. Os dados gerados neste trabalho poderão contribuir no desenvolvimento de um equipamento gerador de PBTPA com parâmetros específicos para o tratamento de cárie dentária, além de contribuir no desenvolvimento de novas técnica de ART. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar como o tratamento do PBTPA em diferentes tempos de exposição afeta biofilmes cariogênicos mono, dual e multiespécies formados por *A. naeslundii*, *C. albicans*, *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*. Os PBTPA que utilizam argônio e hélio como gás de trabalho, serão chamados de PBTPA-argônio e PBTPA-hélio daqui em diante.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a aplicabilidade do plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica (PBTPA) no controle de biofilmes cariogênicos, visando aplicação em tratamentos restauradores baseados em odontologia de mínima intervenção (MID).

### 2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer os parâmetros físicos efetivos do PBTPA de argônio e de hélio que se mostram efetivos frente a biofilmes polimicrobianos compostos por combinações das espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Candida albicans* e *Actinomyces naeslundii*;
- Analisar diferentes biofilmes cariogênicos multi-espécies tratados com PBTPA utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Fontes geradoras de PBTPA**

##### **3.1.1 Fonte geradora de PBTPA-argônio**

O PBTPA foi gerado usando gás argônio (AR) através do dispositivo Kinpen09<sup>®</sup> desenvolvido pelo Instituto Leibniz de Ciência e Tecnologia do Plasma (INP, Alemanha) (Delben et al., 2014) e disponível na University-Purdue University Indianapolis (IUPUI) /School of Dentistry – Departamento de Cariologia, Dentística Operatória e Saúde Pública Odontológica. O dispositivo consiste em uma unidade portátil (170 mm de comprimento, 20 mm de diâmetro e 170 g) para geração de jato de plasma, uma fonte de alimentação DC (alimentação do sistema: 8W a 220 V, 50/60 Hz) e um unidade de abastecimento de gás. O jato de PBTPA-argônio foi gerado a partir do topo do eletrodo centralizado e expandido para o ar circundante fora do bico (Delben et al., 2014). O fluxo de gás argônio foi ajustado para 5 slm e (MKS Instruments, Alemanha) (Figura 1).

Figura 1- Dispositivo de plasma de baixa temperatura (LTP) kINPen09™ (Leibniz Institute for Plasma Science and Technology, INP, Greifswald, Alemanha)

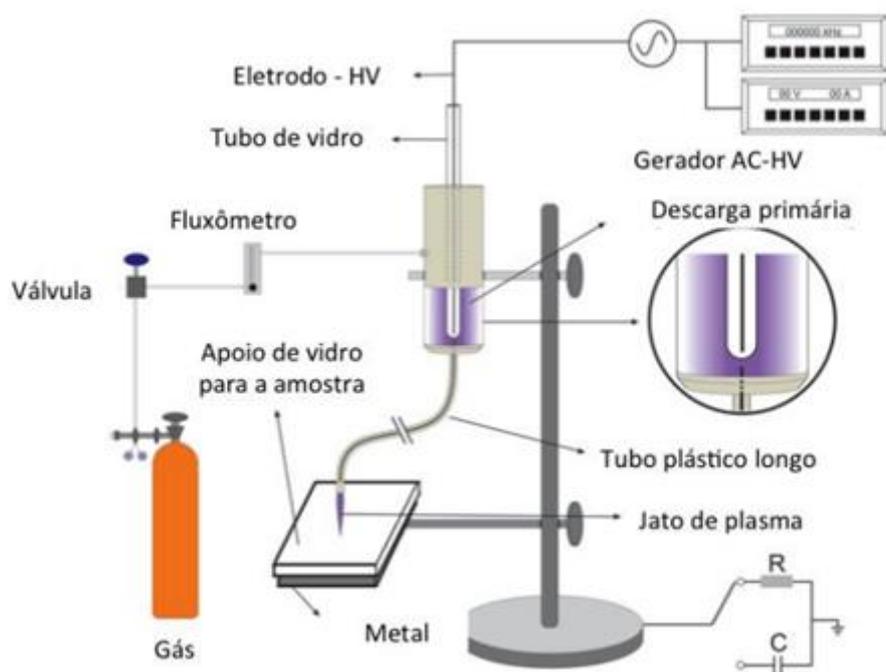


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.1.2 Dispositivo gerador de PBTPA-hélio

Um dispositivo gerador de PBTPA desenvolvido pela FEG-UNESP (Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá) foi utilizado para os experimentos com PBTPA-hélio. O dispositivo utilizou o gás hélio como gás de trabalho. O PBTPA-hélio foi gerado na extremidade de um tubo longo e flexível, contendo um fio fino (0,45 mm) de Ni-Cr que foi conectado a um gerador alternado de alta tensão (Minipulse 4 de GBS, Elektronik, Dresden, Alemanha) capaz de gerar sinais com 12 kV pp de amplitude, frequência de operação de 31,7 kHz, período de modulação de 1,5 ms totalizando 10 ciclos. Hélio (He) 99,5% puro foi usado no estudo. A vazão de 2,0 L / minuto foi controlada por um rotâmetro. A potência medida foi de 1.2 W no modo de tensão pulsada (Mp). Nessas condições, o jato de plasma tem comprimento de aproximadamente 2,5 cm (Kostov et al., 2015). A distância entre a saída do plasma na extremidade do tubo flexível e a amostra foi de 1,5 cm (Figura 2). O jato foi previamente caracterizado por espectroscopia de emissão óptica (EOS) com comprimento de onda entre 300 e 850 nm (Andor Technology Shamrock 303i Belfast, Irlanda) para identificar as espécies reativas geradas (Kostov et al., 2015)

Figura 2- Desenho esquemático do plasma de tubo longo utilizado no estudo



Fonte: Kostov et al., 2015.

### 3.2 Micro-organismos

*A. naeslundii* (ATCC 12104), *C. albicans* (SC 5314), *C. albicans* (SC 5314), *L. casei* (ATCC 10801), *L. acidophilus* (ATCC 393), *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *S. mutans* (ATCC 35688), *S. gordonii* (ATCC 10558), *S. gordonii* (ATCC 10558), *S. sanguinis* (ATCC 10556) foram usados para formar biofilmes de uma, duas ou multi-espécies. As culturas de estoque foram mantidas a -80 ° C, e posteriormente reativadas em um meio específico: ágar sangue de carneiro para *Streptococcus* spp. e *A. naeslundii*; Rogosa ágar (RA) acrescido de ácido acético na concentração de 1,32 mL/L para *L. casei* e *L. acidophilus*, ágar Sabouraud dextrose (SDA) para *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37 ° C por 48 horas.

### 3.3 Curva de crescimentos dos micro-organismos

Para os micro-organismos *A. naeslundii* (ATCC 12104), *C. albicans* (SC 5314), *L. casei* (ATCC 10801), *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *S. gordonii* (ATCC 10558) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) foram obtidas previamente suas curvas de crescimento com a finalidade de padronizar o inóculo para formação do biofilme.

Para obtenção das curvas de crescimento, 10 colônias isoladas foram coletadas com o auxílio de uma alça estéril e posteriormente transferidas para um tubo de centrífuga contendo 50 mL de caldo trípico de soja (TSB) suplementado com 1% glicose. Esse pré-inóculo foi mantido a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> por 18 h. Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para outro tubo de centrífuga

contendo 9 mL de TSB suplementado com 1% sacarose. Os mesmos procedimentos foram adotados para todos os micro-organismos separadamente. Os crescimentos dos micro-organismos foram monitorados assepticamente a cada hora (0–24 h), empregando leituras de absorvância subsequentes (densidade óptica) em um espectrofotômetro usando comprimento de onda de 600 nm para garantir a reprodutibilidade do modelo de biofilme.

Para *A. naeslundii* (ATCC 12104), *L. acidophilus* (ATCC 393), *S. mutans* (ATCC 35688), *C. albicans* (SC 5314), *S. gordonii* (ATCC 10558) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) foram utilizados os comprimentos de onda e as densidades ópticas pré-determinadas anteriormente para padronização do inóculo por espectrofotometria. *A. naeslundii* ( $\lambda = 550, 0,125 \text{ nm}$ ,  $10^7 \text{ UFC/mL}$ ), *C. albicans* ( $\lambda = 530, 0,560 \text{ nm}$ ,  $10^7 \text{ UFC/mL}$ ), *L. acidophilus* ( $\lambda = 600, 0,1 \text{ nm}$ ,  $10^8 \text{ UFC/mL}$ ), *S. gordonii* ( $\lambda = 398, 0,520 \text{ nm}$ ,  $10^7 \text{ UFC/mL}$ ), *S. mutans* ( $\lambda = 398, 0,620 \text{ nm}$ ,  $10^7 \text{ UFC/mL}$ ), e *S. sanguinis* ( $\lambda = 398, 0,720 \text{ nm}$ ,  $10^7 \text{ UFC/mL}$ ).

### **3.4 Efeito antibiofilme do PBPTA-argônio sobre biofilmes cariogênicos**

#### **3.4.1 Formação do Biofilme**

Biofilmes mono, dual e multi-espécies compostos por *A. naeslundii* (ATCC 12104), *C. albicans* (SC 5314), *L. casei* (ATCC 10801), *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *S. gordonii* (ATCC 10558) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) foram formados conforme descrito por Yassin et al. (2016), com modificações. Os micro-organismos foram ativados em ágar específico. Para *Streptococcus* spp. e *A. naeslundii*, foi utilizado ágar sangue de carneiro anaeróbio 5%, e ágar Rogosa para *L. casei*, as placas foram incubadas a 37 °C em CO<sub>2</sub> 5% por 48 h. O ágar

Sabouraud dextrose (SDA) foi usado para *C. albicans* e as placas foram incubadas a 37 ° C por 24 h.

Para preparar o pré-inóculo, os micro-organismos foram transferidos separadamente da placa de ágar para um tubo de centrífuga contendo 10 mL de TSB suplementado com glicose a 1%. Separadamente, tubos contendo *Streptococcus* spp., *A. nelsundii* e *L. casei* foram incubados a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 18 h, e *C. albicans* foi incubada a 37° C por 18 h. Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para outro tubo contendo TSB suplementado com sacarose a 1%. Foram obtidos inóculos com a concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL, utilizando-se os dados que foram obtidos para a curva de crescimento. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro para confirmação do valor de densidade óptica.

Para a formação do biofilme mono e multi-espécies composto por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*, as suspensões contendo 8 × 10<sup>6</sup> UFC/mL foram preparadas de acordo com Arthur et al. (2013). Os mesmos procedimentos foram realizados para cada micro-organismo separadamente. Uma parte igual de cada suspensão padronizada foi depositada em um tubo de centrífuga estéril e a suspensão foi homogeneizada por meio de um agitador de tubos tipo vórtex. Para biofilmes mono espécie, a suspensão padronizada de cada micro-organismo foi adicionada aos poços de uma placa de 24 poços contendo um discos de hidroxiapatita estéril em cada poço. Para formação do biofilme multi-espécies, a suspensão dos micro-organismos, também foi adicionada aos poços de placas de 24 poços da mesma forma descrita anteriormente (Klein et al., 2012). Para cada poço, foram adicionados 200 µL do inóculo mono ou multi-espécie e 800 µL de caldo TSB suplementado com sacarose 0,2%.

Para a padronização da concentração ideal de açúcar em que todas as três cepas (*S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*) seriam recuperadas após 48 h de

crescimento do biofilme, testes preliminares foram conduzidos usando concentrações de 0,2%, 0,5%, 0,75% e 1% de sacarose.

Para a formação do biofilme mono e multi-espécies compostos por *C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans*, após a formação do inóculo, foram preparadas suspensões padronizadas de *C. albicans* com  $1 \times 10^5$  CFU/mL, *S. mutans* com  $1 \times 10^7$  CFU/mL e *L. casei* com  $1 \times 10^9$  CFU/mL.

Para a determinação da concentração ideal de cada micro-organismo em que todas as três cepas (*C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans*) fossem recuperadas após 48h de crescimento do biofilme, foram realizados testes de padronização. Partes iguais das suspensões padronizadas foram depositadas em um tubo de centrífuga estéril e a suspensão foi homogeneizada por meio de um agitador de tubos (Arthur et al., 2013). Para os biofilmes mono ou multi-espécies, as suspensões de micro-organismos foram adicionadas aos poços de placas de 24 poços contendo discos de hidroxiapatita estéreis (Klein et al., 2012). Para cada poço, foram adicionados 200  $\mu$ L do inóculo de mono ou multi-espécies e 800  $\mu$ L de caldo TSB suplementado com sacarose a 0,2%. Biofilmes foram formados por 48 h, sendo que o meio de cultura foi substituído após 24 h (37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>) (Yassin et al., 2016).

Para a formação do biofilme cariogênico dual-espécies composto por *A. naeslundii* e *S. mutans*, as suspensões padronizadas foram obtidas (*A. naeslundii*  $1 \times 10^7$  CFU / mL e *S. mutans* para  $1 \times 10^5$  CFU / mL). Com o objetivo de determinar a concentração ideal de cada micro-organismo em que as duas cepas (*A. naeslundii* e *S. mutans*) fossem recuperadas após 48 h de crescimento do biofilme, preliminares testes foram realizados. Uma parte igual de cada suspensão padronizada foi depositada em um tubo de centrífuga estéril e a suspensão foi homogeneizada por meio de um agitador de tubos (Arthur et al., 2013). Para a formação do biofilme composto de duas espécies, as suspensões dos micro-organismos foram adicionadas aos poços de placas de 24 poços contendo discos

de hidroxiapatita estéreis (Klein et al., 2012). Para cada poço, foram adicionados 200 µL do inóculo de duas espécies e 800 µL de caldo TSB suplementado com sacarose 0,2%. Biofilmes foram formados por 48 h, sendo que o meio de cultura foi substituído após 24 h (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) (Yassin et al., 2016).

### **3.4.2 Aplicação do PBPTA (Kinpen09®) e processamento do biofilme**

Após 48 h da formação dos biofilmes mono e multi-espécies, estes foram tratados com PBTPA por 30 s, 60 s e 120 s. Toda a superfície da amostra foi tratada realizando movimentos que assegurasse a varredura da superfície total. Clorexidina 0,12% (C9394, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como controle positivo (CP) por ser um anti-séptico padrão ouro comumente utilizado como enxaguatório bucal. Amostras de biofilme sobre os discos de hidroxiapatita foram mergulhadas em um poço contendo 1 mL de clorexidina 0,12% (PC) por 1 min. Para o controle negativo (CN), os biofilmes foram imersos em solução de NaCl a 0,89% pelo mesmo período de tempo. O experimento foi realizado em duplicata (n=3) em três ocasiões diferentes, pra cada grupo experimental. Ao final foi somado os valores e tirado a média.

Os biofilmes formados na superfície de discos de hidroxiapatita foram tratados com PBTPA-argônio a uma distância de 10 mm da superfície do biofilme até a ponta do dispositivo de plasma por 120, 60 e 30 segundos, em modo de trabalho contínuo (Delben et al., 2014). Um operador calibrado treinado para conduzir o experimento de forma padronizada utilizou um suporte específico para garantir a padronização da distância entre a ponta do plasma até amostra. As amostras foram movidas horizontalmente usando pinças estéreis durante a aplicação do plasma para escanear toda a superfície.

Após os tratamentos, os biofilmes foram desprendidos da superfície dos discos de hidroxiapatita com uma espátula estéril e posteriormente diluídos em 5 mL de solução estéril de NaCl 0,89%. Para dispersar as células, a suspensão foi sonicada por pulsos de 10 s a uma saída de 9 W (Sonic Dismembrator modelo 100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os mesmos procedimentos foram realizados para cada grupo experimental e controle. As suspensões obtidas foram diluídas em série e plaqueadas em ágar específico. *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* foram semeados em ágar sangue (ágar sangue de carneiro anaeróbio BD BBL™ CDC 5%). Foi utilizado ágar Rogosa 1,32 mL/L de ácido glacial para *L. casei*, ágar Mitis Salivarius contendo 0,1 unidade mL<sup>-1</sup> de bacitracina para *S. mutans*, no caso de biofilmes mono-espécie.

### **3.4.3 Microscopia de varredura a laser confocal dos biofilmes multi-espécies tratados com PBTPA-argônio**

Biofilmes multi-espécies formados por *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *S. gordonii* (ATCC 10558) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) foram corados com o kit de viabilidade bacteriana Live/Dead BacLight® (L13152; Molecular Probes, Inc., Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e incubados no escuro em temperatura ambiente por 15 min para permitir a penetração dos fluoróforos dentro das células bacterianas. As amostras foram então lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,89% e examinadas em um microscópio confocal / multifotônico de varredura ressonante Leica SP8 usando a objetiva Leica Fluotar VISIR 25x / 0,95 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) imersa em água, com uma distância de trabalho livre de 2,3 mm. Secções seriadas no plano XYZ foram observadas.

### 3.5 Efeito antibiofilme do PBPTA-hélio sobre biofilmes cariogênicos

#### 3.5.1 Formação do Biofilme

*A. naeslundii* (ATCC 12104), *C. albicans* (SC 5314), *L. acidophilus* (ATCC 393), *S. mutans* (ATCC 35688), *S. gordonii* (ATCC 10558), *S. sanguinis* (ATCC 10556), foram usados para formar biofilmes dual ou multi-espécies e a metodologia seguiu a proposta por Arthur et al. (2013), com modificações. Três associações de micro-organismos diferentes foram usadas para formar os biofilmes em propostas diferentes.

Primeiramente, foram formados biofilmes multi-espécies por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*. Todos os micro-organismos foram ativados em ágar sangue e incubados a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Uma solução de sacarose (20%) foi preparada previamente e armazenada em refrigerador. Caldo Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado com sacarose 1% foi preparado no momento do uso. Em seguida, para a formação do inóculo, 10 colônias isoladas foram coletadas com o auxílio de uma alça estéril e posteriormente transferidas para um tubo de centrífuga contendo 10 mL de caldo TSB suplementado com sacarose 1%. O mesmo procedimento foi feito para ativação de cada micro-organismo separadamente. Posteriormente, o tubo foi incubado a 37 ° C por 18 horas. Após o período de incubação, os inóculos foram centrifugados a 2.000 rpm por 5 minutos e lavados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) por duas vezes. As suspensões foram padronizadas em 10<sup>7</sup> células/mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Cada suspensão de micro-organismos foi diluída para 8 x 10<sup>6</sup> células/mL, segundo Arthur et al. (2013).

Os tubos foram homogeneizados e partes iguais de cada suspensão foram depositadas em um tubo estéril para formar uma suspensão multi-espécies. Para formação deste biofilme, 40  $\mu\text{L}$  da suspensão de espécies múltiplas e 160  $\mu\text{L}$  de caldo TSB suplementado com sacarose 1% foram dispensados em cada poço de cada grupo experimental de uma placa de 96 poços. A placa foi incubada a 37 ° C, CO<sub>2</sub> a 5% durante 48 horas, sendo o meio de cultura substituído após 24 horas, n = 9 para cada grupo experimental (Arthur et al., 2013).

Outra associação de micro-organismos (*C. albicans*, *L. acidophilus*, *S. mutans*) foi utilizada para formar biofilme multi-espécie (Arthur et al., 2013). Inicialmente, os micro-organismos foram cultivados em meios de cultura específicos (*S. mutans* foi ativado em ágar sangue 5%, ágar BHI para *L. acidophilus* e ágar Sabouraud dextrose para leveduras). *L. acidophilus* e *S. mutans* foram incubados a 37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. *C. albicans* foi incubada por 24 horas a 37 °C.

O inóculo foi obtido como descrito anteriormente (para biofilme formado por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*). O inóculo foi centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos e lavado com solução salina estéril (NaCl 0,9%) duas vezes. As suspensões de *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* foram padronizadas em 10<sup>7</sup> células / mL em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil). Para formação do biofilme foram utilizadas as diluições de *C. albicans* 10<sup>5</sup> células / mL, *L. acidophilus* 10<sup>7</sup> células / mL e *S. mutans* 10<sup>7</sup> células / mL. Partes iguais de cada suspensão foram depositadas em um tubo estéril para formar suspensão multi-espécies, 40  $\mu\text{L}$  da suspensão multi-espécies e 160  $\mu\text{L}$  de caldo TSB suplementado com sacarose 1% foram adicionados aos poços do grupo experimental em análise, n = 9 para cada grupo experimental.

Para a formação do biofilme dual-espécies composto por *A. naeslundii* e *S. mutans*, as suspensões padronizadas foram obtidas (*A. naeslundii* 1x10<sup>4</sup> CFU / mL e *S. mutans* para 1x10<sup>7</sup> CFU / mL). Com o objetivo de determinar a

concentração ideal de cada micro-organismo em que todas as duas cepas (*A. naeslundii* e *S. mutans*) fossem recuperadas após 48 h de crescimento do biofilme, testes preliminares foram realizados. Uma parte igual de cada suspensão padronizada foi depositada em um tubo de centrífuga estéril, e a suspensão foi homogeneizada por meio de um agitador de tubos (Arthur et al., 2013). Para a formação do biofilme composto de duas espécies, as suspensões dos micro-organismos foram adicionadas aos poços de placas de 96 poços, 40 µL da suspensão multi-espécies e 160 µL de caldo TSB suplementado com sacarose 1% foram adicionados em cada poço de cada grupo experimental em análise, n = 9 para cada grupo experimental (Arthur et al., 2013). Biofilmes foram formados por 48 h, sendo que o meio de cultura foi substituído após 24 h (37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub>) (Yassin et al., 2016).

### **3.5.2 Aplicação do PBPTA-hélio e processamento do biofilme**

Após 48 horas de formação do biofilme dual e multi-espécies, os mesmos foram expostos ao PBTPA por 1, 3, 5 e 7 min conforme descrito no item 3.1.2. Foram adotados como controle positivo (CP) o digluconato de clorexidina 0,12% (Clorexoral<sup>®</sup>/Biodinâmica) e NaCl 0,9% como controle negativo (CN). Os mesmos tempos de exposição usados nos tratamentos com PBTPA (1, 3, 5 e 7 minutos) foram adotados para o tratamento do CP e CN. Os biofilmes foram desprendidos da superfície de cada poço com 200 µL de solução de NaCl 0,9% estéril utilizando pontas de micropipeta. O conteúdo foi aspirado e transferido para um tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> com 800 µL de solução de NaCl 0,9% estéril. As suspensões foram desagregadas por sonicação por 30s em amplitude de 40 W (Vibra Cell <sup>™</sup>, Sonics and Materials Inc., Newtown, EUA) e posteriormente por

agitação em vórtex (Oliveira et al., 2017). Os mesmos procedimentos foram realizados para cada grupo experimental e controles. Foi realizada diluição seriada das suspensões obtidas na desagregação dos micro-organismos. A suspensão de micro-organismos obtida das diluições seriadas do biofilme multi-espécies formado por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* foram semeados em ágar BHI.

Para as suspensões obtidas a partir das diluições seriadas do biofilme multi-espécies formado por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans*, foram utilizados meios de cultura seletivos. Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (0,1 mg / mL) foi utilizado para *C. albicans* e ágar Mitis Salivarius bacitracina (0,1 unidade mL<sup>-1</sup>) sacarose (1%) para *S. mutans*. Para *L. acidophilus* foi utilizado ágar Rogosa acrescido de 1,32 mL/L de ácido acético glacial. O plaqueamento foi realizado pela técnica da gota. Por essa técnica, 10 µL da solução obtida foi plaqueado na parte superior da placa e deixada escorrer até que se formasse um traço na superfície do ágar. O número total de micro-organismos recuperados foi calculado e convertido em log<sub>10</sub> UFC/mL. Para tanto, diluições seriadas das suspensões foram obtidas. A suspensão dual-espécies obtida da diluição após o tratamento das amostras, foi semeada em ágar sangue de carneiro.

### **3.5.3 Análise dos biofilmes multiespécies tratados com PBTPA-hélio por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Espécimes de poliestireno 5 mm<sup>2</sup> do mesmo material de placa de 96 poços, pré-esterilizados com solução de glutaraldeído 2% durante a noite e armazenadas em compartimentos de placa de 24 poços foram utilizados. Para retirada da solução glutaraldeído 2% dos corpos de prova, foi utilizado lavagem dos corpos de prova com água deionizada estéril, por 10 vezes. Os biofilmes dual ou multi-

espécies foram formados sobre os espécimes. A placa foi incubada a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. O meio de cultura foi substituído após 24 horas de incubação. Após o período de incubação, cada poço foi lavado com PBS duas vezes e, em seguida, o biofilme formado nos espécimes foram fixados.

Solução de glutaraldeído (0,25%), paraformaldeído (4%) e PBS (proporção por mL: 125: 400: 475 µL) foram usados na fixação. Após 20 minutos de fixação, as amostras contidas em cada poço foram lavadas com PBS e expostas a diferentes soluções desidratantes, como álcool 70% (10 min), álcool 90% (10 min), álcool 100% (10 min) e 100 % álcool novamente (20 min). As amostras foram secas à temperatura ambiente durante a noite. Finalmente, as amostras foram fixadas no stub e posteriormente metalizada com pó de ouro a vácuo. A análise dos espécimes foi realizada em MEV (LEO 1460Vp, Carl Zeiss, EUA).

#### **3.5.4 Análise dos biofilmes multiespécies tratados com PBTPA-hélio por microscopia de varredura a laser confocal**

Os biofilmes foram corados usando o kit Live / Dead BacLight™ Bacterial Viability kit (Invitrogen-Molecular Probes, EUA) para revelar a proporção de células viáveis (verde fluorescente) e mortas (vermelho fluorescente). A marcação de células viva e morta foi realizada com a mistura dos corantes A e B. Para tanto, primeiramente os biofilmes foram formados na superfície de lamínulas de 13 mm de diâmetro estéreis, distribuídas em placas de 24 poços estéril. Para cada poço, o corante marcador de células vivas e mortas foi preparado misturando 7,5 µL do componente de coloração A (SYTO 9) e 7,5 µL de componente de coloração B (iodeto de propídio). Após a lavagem dos poços por 3 vezes com PBS estéril a 1% de tampão fosfato (PBS-pH 7,4), as amostras foram cobertas com 15 µL da

mistura reagente e incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Uma série de imagens foi obtida na seção z usando um microscópio confocal (LSM 700 (Zeiss)).

### **3.6 Análise Estatística**

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a distribuição normal dos dados e a homogeneidade da variância foi confirmada pelo teste de Levene ( $\alpha = 0,05$ ). Após, foram aplicadas análises de variância (ANOVA) e teste post hoc de Tukey, considerando  $\alpha = 0,05$  para GraphPad Prism 5.0 Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) foi usado para analisar os dados coletados da contagem de células viáveis após tratamento tanto com PBTPA de argônio como o de hélio e comparados com os controles positivos e negativos. As análises foram realizadas usando o pacote de software estatístico IBM SPSS (versão 25) para Windows (IBM Corp., New York, NY, USA) para confirmação da normalidade e homocedasticidade ou GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA,) para teste de ANOVA. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes.

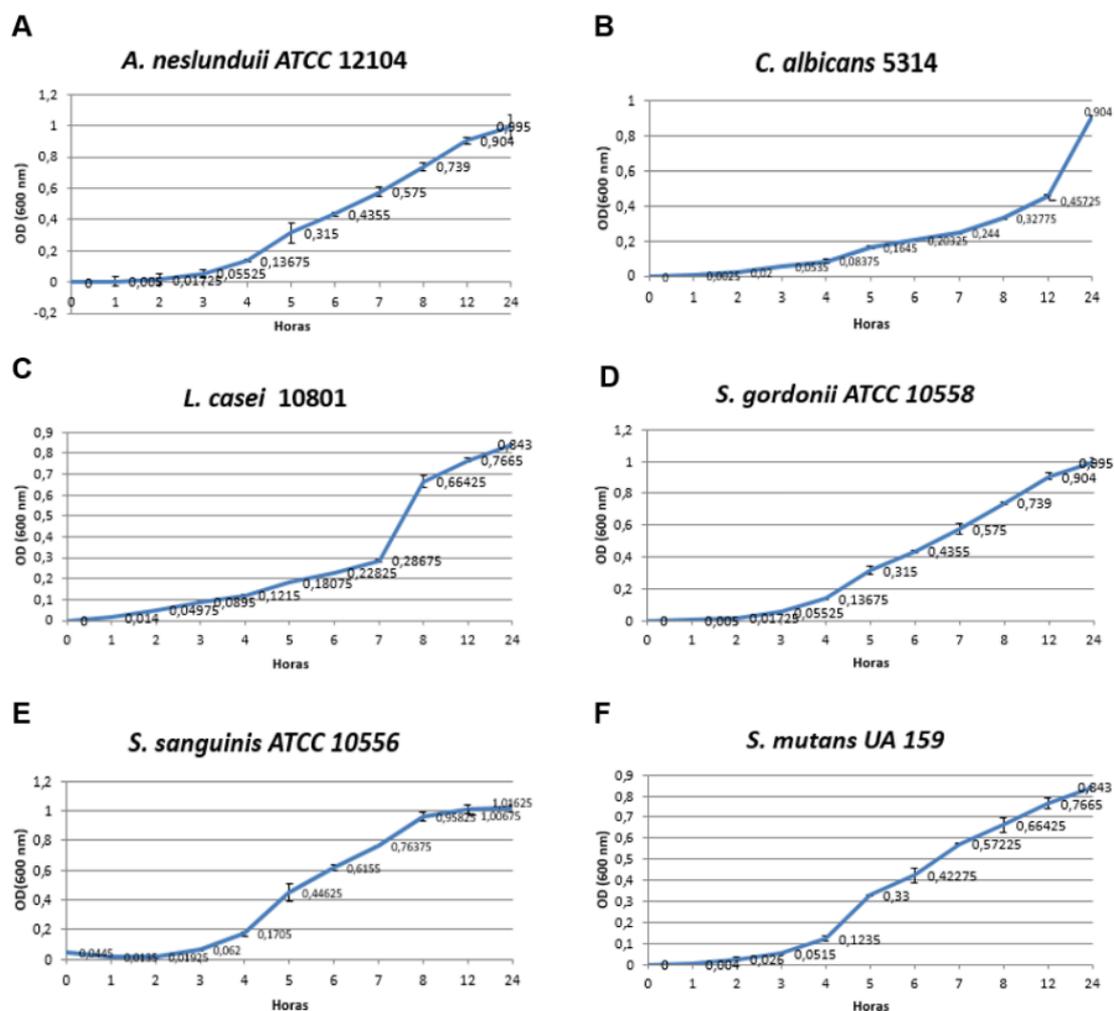
## 4 RESULTADO

### 4.1 Resultados PBTPA-argônio

#### 4.1.1 Curva de crescimento dos micro-organismos

Conforme descrito no item 3.3, o crescimento de *A. naeslundii* (ATCC 12104), *C. albicans* (SC 5314), *L. casei* (ATCC 10801), *S. mutans* UA159 (ATCC 700610), *S. gordonii* (ATCC 10558) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) foi monitorado empregando leituras de absorbância subsequentes de hora em hora. Foi utilizado como base a fase exponencial, fase em que as células crescem e se dividem em sua taxa máxima nas condições dadas (composição do meio, temperatura etc.). O número de células aumenta com o tempo. A partir da fase exponencial, o tempo de duplicação das células pode ser calculado. Para *A. naeslundii*, a fase exponencial foi de 8 horas, *C. albicans* 12 horas, *L. casei* 8 horas e para os *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* as fases exponenciais foram de 8 horas também. Os resultados podem ser observados na figura 3.

Figura 3- Curvas de crescimento de (A), *A. naeslundii* ATCC 12104 (B) *C. albicans* SC 5314 (C) *L. casei* ATCC 10801, (D) *S. gordonii* ATCC 10558, (E) *S. mutans* UA 159 e (F) *S. sanguinis* ATCC 10556



Legenda: Na fase mid-log, a média  $\pm$  desvio padrão de OD 600 nm para *A. naeslundii*  $0,739 \pm 0,024$  e o Log10 CFU / mL é  $7,27 \pm 0,011$ . Para *C. albicans*  $0,457 \pm 0,005$  e o Log10 CFU / mL é  $9,521 \pm 0,072$ . Para *L. acidophilus*  $0,286 \pm 0,007$  e o Log10 CFU / mL é  $8,053 \pm 0,004$ . Para *S. mutans*  $0,42 \pm 0,035$  e o Log10 CFU / mL é  $8,27 \pm 0,09$ . Para *S. gordonii*  $0,435 \pm 0,006$  e o Log10 CFU / mL é  $8,19 \pm 0,027$ . Para *S. sanguinis*  $0,61 \pm 0,021$  e o Log10 CFU / mL é  $8,46 \pm 0,001$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.2 Biofilmes mono-espécies

Na Figura 4 são mostrados os resultados obtidos para os biofilmes mono-espécie formados por *C. albicans*, *L. casei*, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* e tratados com PBTPA-argônio ou apenas expostos ao fluxo de gás argônio sem que o dispositivo produzisse plasma, por 30 s, 60 s e 120 s.

A Figura (4-A) apresenta os resultados obtidos para o biofilme mono-espécie formado por *C. albicans*. Houve redução significativa em todos os tempos de exposição (30, 60 e 120 s) após tratamento com PBTPA-argônio, quando comparados ao controle negativo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens de células recuperadas após exposição ao PBTPA-argônio por 60 s e 120 s ( $p > 0,05$ ). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa após exposição do PBTPA-argônio por 30 s em comparação aos tratamentos com apenas fluxo de argônio (sem que o dispositivo produzisse plasma) em todos os tempos de exposição (F30, F60 e F120) ( $p > 0,05$ ).

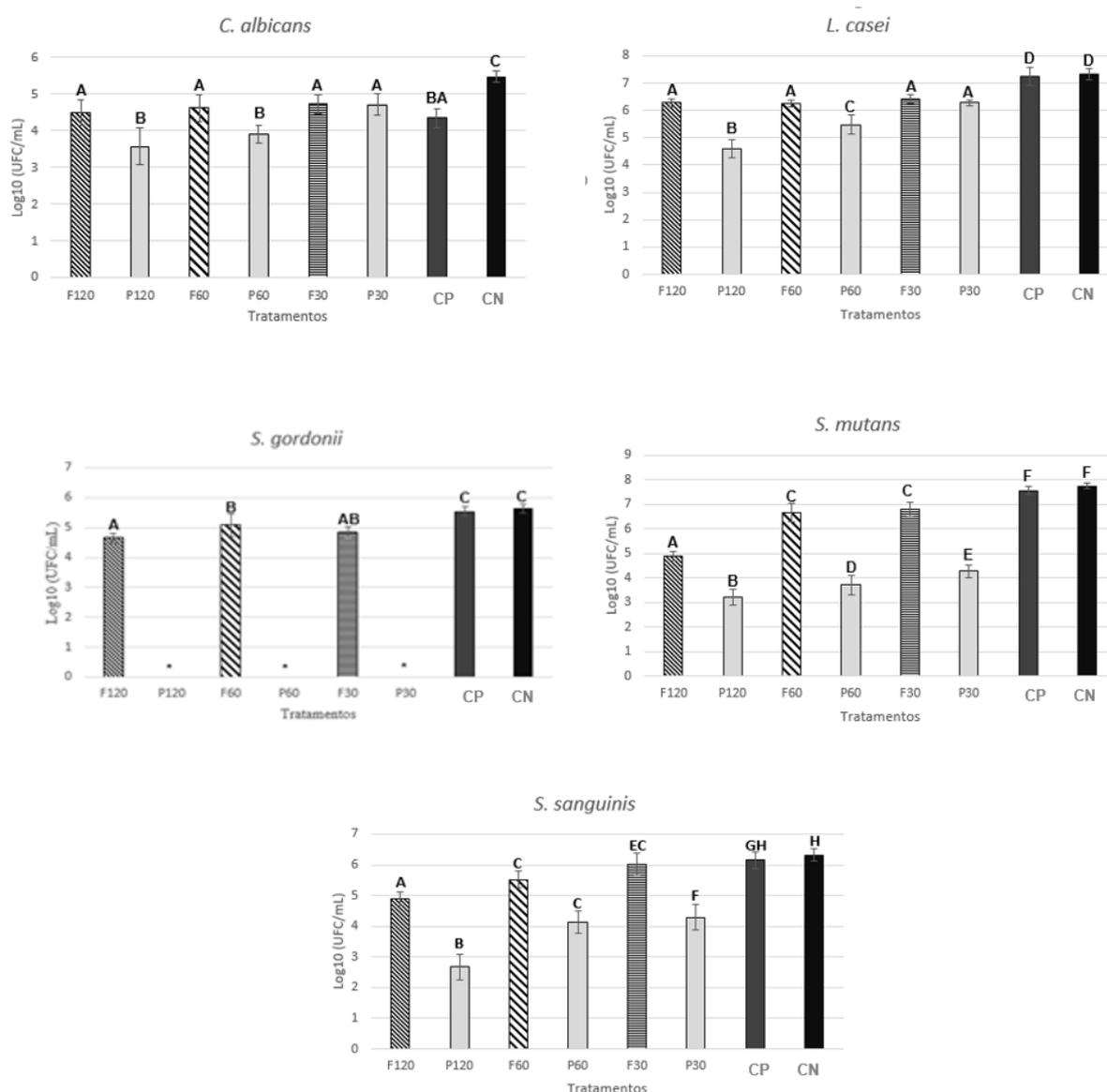
Em (4-B) estão representados os resultados obtidos para biofilmes mono-espécies formado por *L. casei* e tratados com PBTPA-argônio por 30, 60 e 120s. Resultado similar foi observado em comparação ao descrito anteriormente para *C. albicans*. Observa-se redução significativa em todos os tempos de exposição ( $p < 0,0001$ ) quando comparados aos controles. Redução semelhante foi observada em todos grupos tratados apenas com fluxo de gás argônio (sem que o dispositivo produzisse plasma) em todos os tempos de exposição (F30, F60 e F120) em comparação aos controles. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a aplicação do PBTPA-argônio por 30 s quando comparado ao tratamento com fluxo de argônio em todos os tempos de exposição ( $p > 0,05$ ).

Em (4-C) observa-se os resultados obtidos para biofilmes mono-espécie de *S. mutans* e tratados com PBTPA-argônio por 30, 60 e 120 s. Em todos grupos tratados com PBTPA-argônio, foi observado redução significativa em todos os tempos de exposição (30, 60 e 120s) quando comparados aos controles. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a exposição com PBTPA-argônio por 60 e 120 s ( $p > 0,05$ ).

Em (4-D), observa-se os resultados obtidos para biofilme mono-espécie formados por *S. gordonii* e tratados com PBTPA-argônio por 30, 60 e 120s. Nenhuma UFC / mL de *S. gordonii* foi recuperada nos biofilmes após o tratamento com PBTPA-argônio em todos os tempos de exposição testados.

Em (4-E) observa-se os resultados obtidos para biofilmes mono-espécie formados por *S. sanguinis* e tratados com PBTPA-argônio por 30, 60 e 120s. Os tratamentos com PBTPA-argônio por 30, 60 e 120s reduziram significativamente a viabilidade do biofilme quando comparado aos controles negativo e positivo ( $p < 0,0001$ ), o efeito foi proporcional ao aumento do tempo de exposição. Os controles negativo e positivo (clorexidina 0,12%) foram estatisticamente similar entre si ( $p \geq 0,05$ ).

Figura 4 – Valores médios e desvios-padrão do número de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC/mL) de biofilmes mono-espécies compostos por *C. albicans* (A), *L. casei* (B), *S. mutans* (C), *S. gordonii* (D) e *S. sanguinis* (E) tratado com PBTPA, clorexidina 0,12% (controle positivo) ou solução salina NaCl 0,89% (controle negativo)



Legenda: \* valores iguais a zero. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $p \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). F120, F60 e F30 (gás argônio - tratamento de controle de fluxo de gás por 120,60 e 30 s); P120, P60 e P30 (tratamento com PBTPA-argônio por 120, 60 e 30 s), CP (controle positivo) e CN (controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.1.3 Efeito do PBTPA-argônio sobre biofilmes cariogênicos dual e multi-espécies

A Figura 5 mostra os resultados em log<sub>10</sub> CFU/mL para os biofilmes dual-espécies formados por *S. mutans* e *A. naeslundii* e tratados com PBTPA-argônio ou apenas fluxo de argônio por 120 s, 60 s e 30 s.

Para *S. mutans* presente no biofilme dual-espécies, foi observada redução semelhante entre a exposição ao fluxo de argônio no tratamento por 60 s comparado com a exposição PBTPA-argônio por 60 s. Todos eles foram significativamente diferentes comparados aos controles (positivo e negativo). Além disso, também foi observada redução semelhante entre o fluxo do gás de tratamento por 30 s e a exposição ao PBTPA-argônio por 30 s ( $p > 0,005$ ).

Para *A. naeslundii* recuperado nesse biofilme composto por duas espécies, foi observada redução significativa para todos os tempos (30 s, 60 s e 120 s) de exposição ao PBTPA-argônio ( $p > 0,005$ ) comparado aos controles (positivo e negativo). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre todos os grupos tratados com fluxo de gás (argônio). Além disso, a exposição com PBTPA por 30 s não apresentou diferença quando comparada com o fluxo de gás em todos os grupos.

A Figura 6 mostra os resultados em log<sub>10</sub> UFC/mL para os biofilmes multi-espécies formados por *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* tratados com PBTPA-argônio ou apenas fluxo de argônio por 120 s, 60 s e 30 s. Redução significativa em log<sub>10</sub> UFC/mL foi observada em todas as amostras tratadas com PBTPA-argônio em comparação com os controles negativo e positivo para a recuperação dos três micro-organismos analisados.

Para *S. mutans* recuperados do biofilme multi-espécies, diferença estatisticamente significativa não foi detectada entre o grupo tratado com fluxo de

argônio por 30 s e os controles (positivo e negativo) ( $p = 0,0054, 0,0031$ , respectivamente). Os biofilmes tratados com PBTPA-argônio apresentaram redução significativa de  $\log_{10}$  UFC/mL em todos os tempos de exposição em comparação aos controles (negativo e positivo) ( $p < 0,0001$ ).

Não houve recuperação de *S. gordonii* e *S. sanguinis* após tratamento com PBTPA-argônio em todos os tempos de exposição testados (30, 60 e 120 s), o que significa que o tratamento PBTPA-argônio foi capaz de inibir completamente estes micro-organismos.

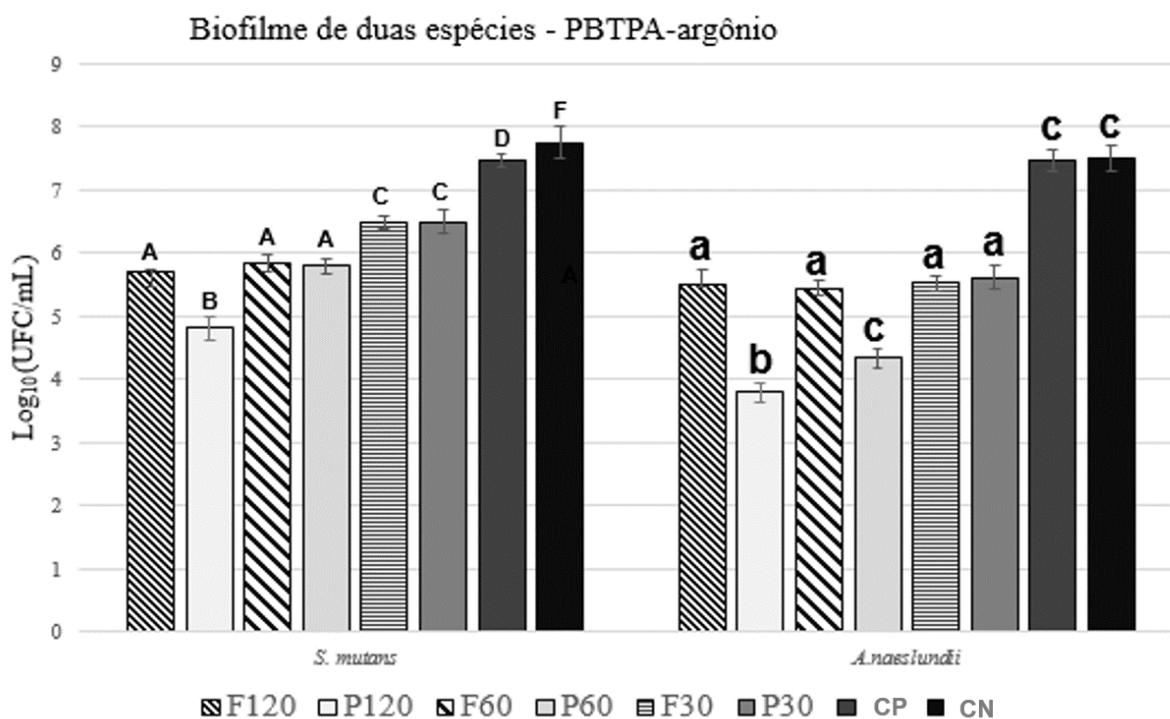
A Figura 7 apresenta os resultados  $\log_{10}$  CFU/mL para os biofilmes multi-espécies formados por *S. mutans*, *L. casei*, *C. albicans* tratados com PBTPA-argônio ou apenas fluxo de argônio (sem que o dispositivo produzisse plasma) por 120 s, 60 s e 30 s. Semelhante aos resultados descritos antes (Figura 5), redução significativa de  $\log_{10}$  UFC/mL foi observada para todos micro-organismos presentes no biofilme comparando todas as amostras tratadas com PBTPA-argônio, por 120 s, 60 s e 30 s, em comparação com os controles (negativo e positivo) ( $p < 0,0001$ ).

Para *S. mutans* recuperado deste biofilme multi-espécies, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos tratados com fluxo de argônio (sem que o dispositivo produzisse plasma). Além disso, a exposição PBTPA-argônio por 30 s não apresentou diferença significativa quando comparada com todo o grupo tratado apenas com fluxo de argônio (sem que o dispositivo produzisse plasma).

Para *L. casei*, não foi observada diferença significativa no  $\log_{10}$  UFC/mL entre 30 e 60 s de exposição com PBTPA-argônio ( $p > 0,005$ ), entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados nesses dois tempos de exposição em relação aos controles (negativo e positivo).

Para *C. albicans*, foi observada redução significativa em todos os tempos de exposição com PBTPA-argônio (30, 60 e 120 s) quando comparado aos controles (positivo e negativo) ( $p < 0,0001$ ).

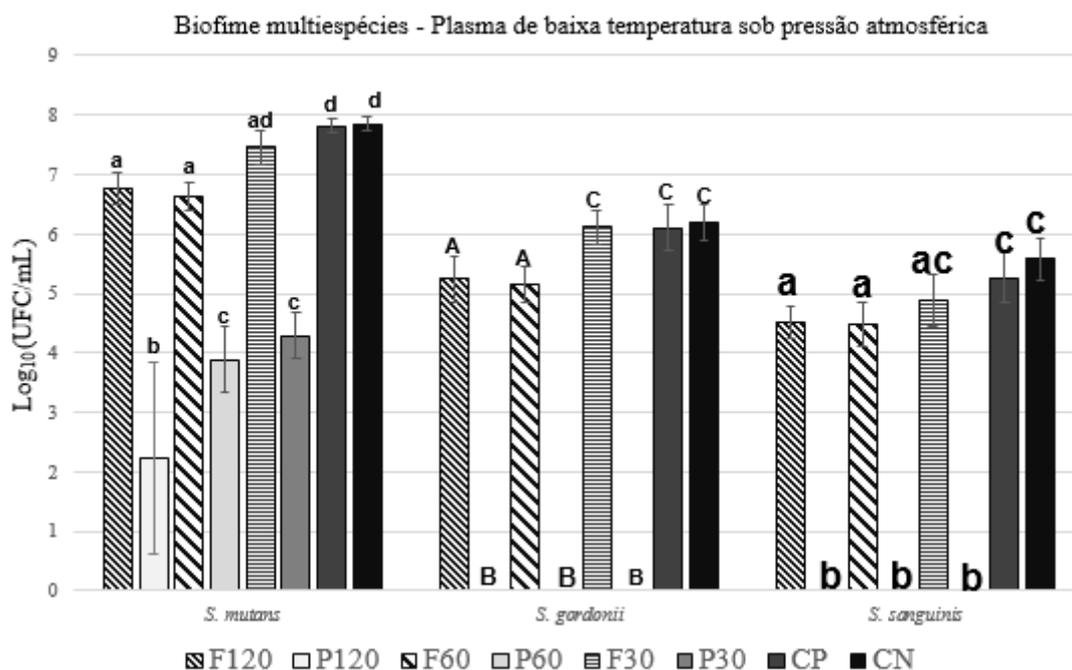
Figura 5 – Valores médios e desvios padrão do número de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC/mL) de biofilmes dual-espécies compostos por *S. mutans* e *A. naeslundii* tratados com PBTPA, clorexidina 0,12% (controle positivo) ou solução salina 0,89% (controle negativo)



Legenda: Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). F120, F60 e F30 (gás argônio - tratamento de controle de fluxo de gás por 120, 60 e 30 s); P120, P60 e P30 (tratamento PBTPA por 120, 60 e 30 s), PC (controle positivo) e NC (controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

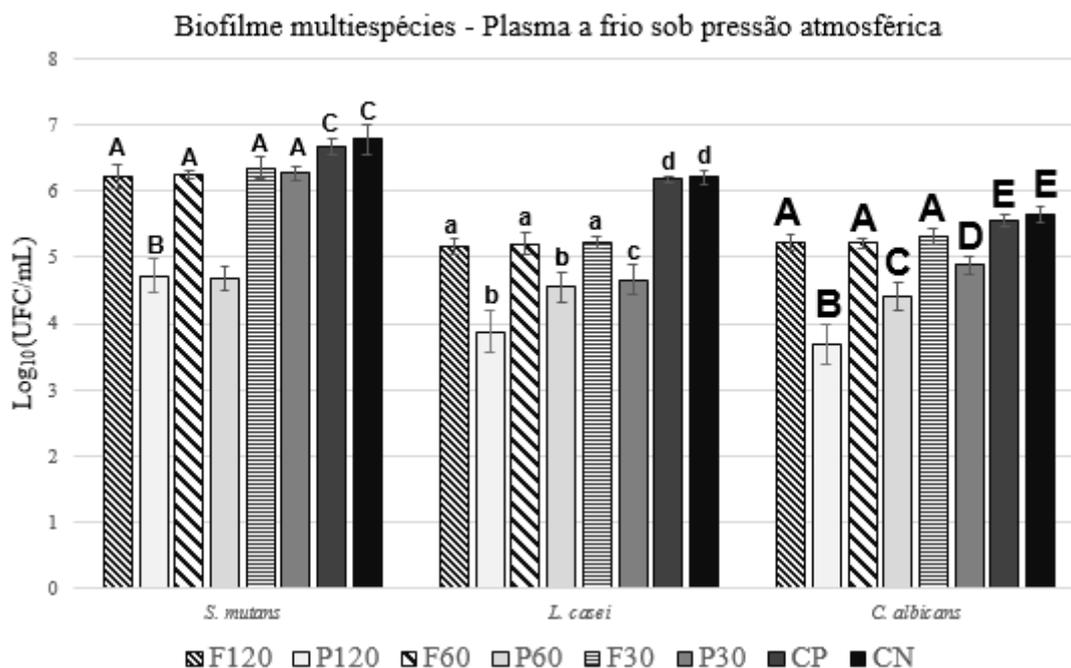
Figura 6 – Valores médios e desvios padrão do número de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC/mL) obtidos para biofilmes multi-espécies compostos por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* (A) tratados com PBTPA, clorexidina 0,12% (controle positivo) ou solução salina 0,89% (controle negativo)



Legenda: Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). F120, F60 e F30 (gás argônio - tratamento de controle de fluxo de gás por 120, 60 e 30 s); P120, P60 e P30 (tratamento PBTPA por 120, 60 e 30 s), PC (controle positivo) e NC (controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 – Valores médios e desvios padrão do número de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC/mL) obtidos para biofilmes multi-espécies compostos por *S. mutans*, *S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*) tratados com PBTPA, clorexidina 0,12% (controle positivo) ou solução salina 0,89% (controle negativo)



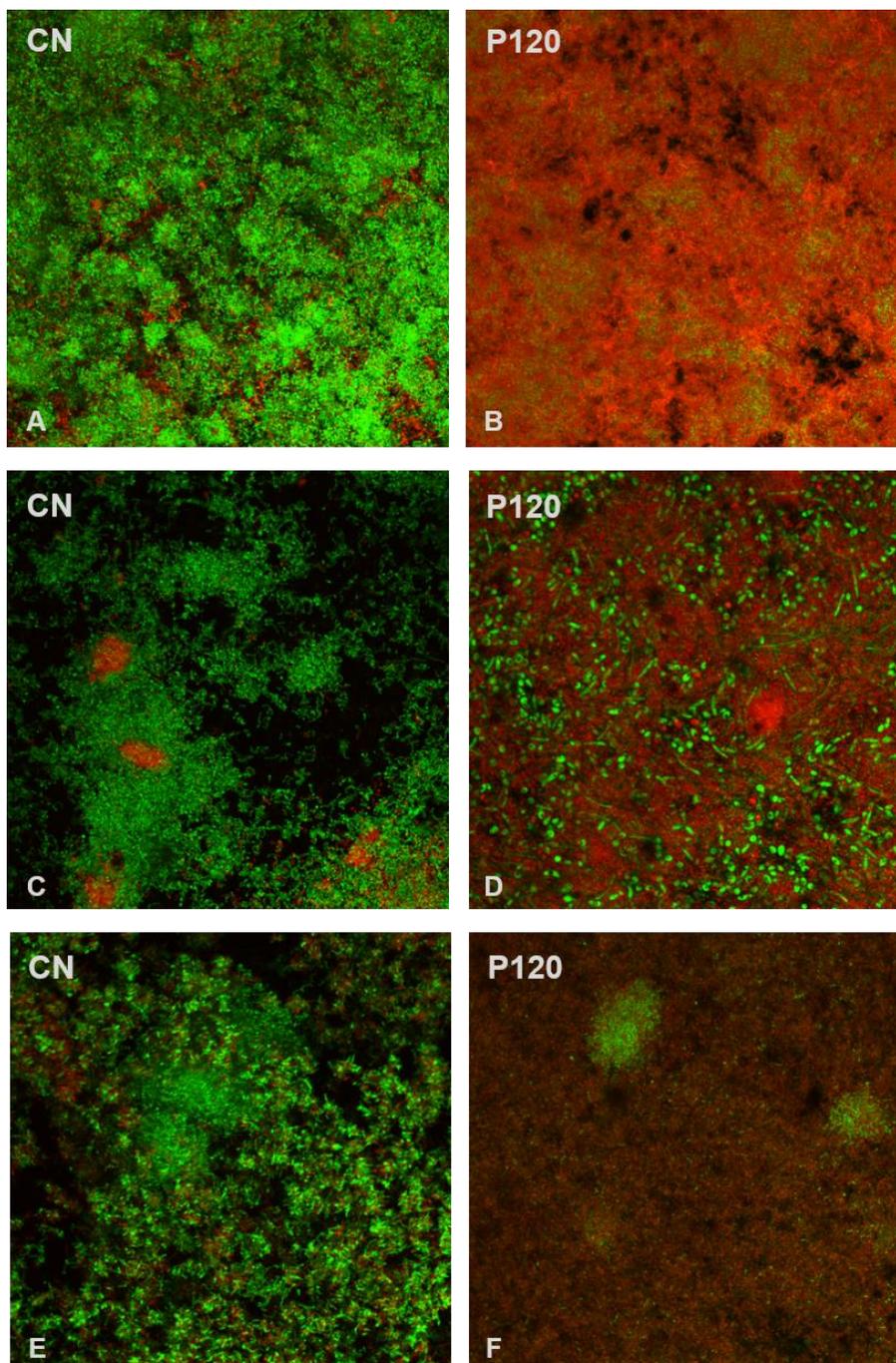
Legenda: Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). F120, F60 e F30 (gás argônio - tratamento de controle de fluxo de gás por 120, 60 e 30 s); P120, P60 e P30 (tratamento PBTPA por 120, 60 e 30 s), PC (controle positivo) e NC (controle negativo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 Análise dos biofilmes cariogênicos tratados com PBTPA-argônio por Microscopia Confocal de Varredura a laser (CSLM)

As imagens representativas da CSLM mostram a morfologia e a organização estrutural do biofilme dual e multi-espécies formados por *A. naeslundii* e *S. mutans*; *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*; *C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans*. Para esses biofilmes compostos por associações de micro-organismos diferentes, foi aplicado controle negativo e tratamento com PBTPA-argônio. A figura 8 mostra as imagens de células vivas que estão coradas de verde, enquanto as células mortas estão coradas de vermelho. As imagens mostram biofilmes formados sobre disco de hidroxiapatita. As amostras tratadas com PBTPA por 120 s apresentaram maior número de células mortas (coradas em vermelho) quando comparadas visualmente ao controle negativo (maior número de células coradas em verde).

Figura 8- Microscopia confocal de varredura a laser de biofilme multiespécie formado por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* (A e B); *C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans* (C e D), *A. naeslundii* e *S. mutans* (E e F) no grupo controle negativo (CN) e grupo tratado com PBTPA-argônio (P120) por 120 segundos



Legenda: Zoom de 25x 0.95. Biofilme corado com o kit Live / Dead BacLight Viability. Células vivas em verde fluorescente e células mortas em vermelho fluorescente. Células vivas e mortas (vivas / mortas) misturadas em verde fluorescente e vermelho.

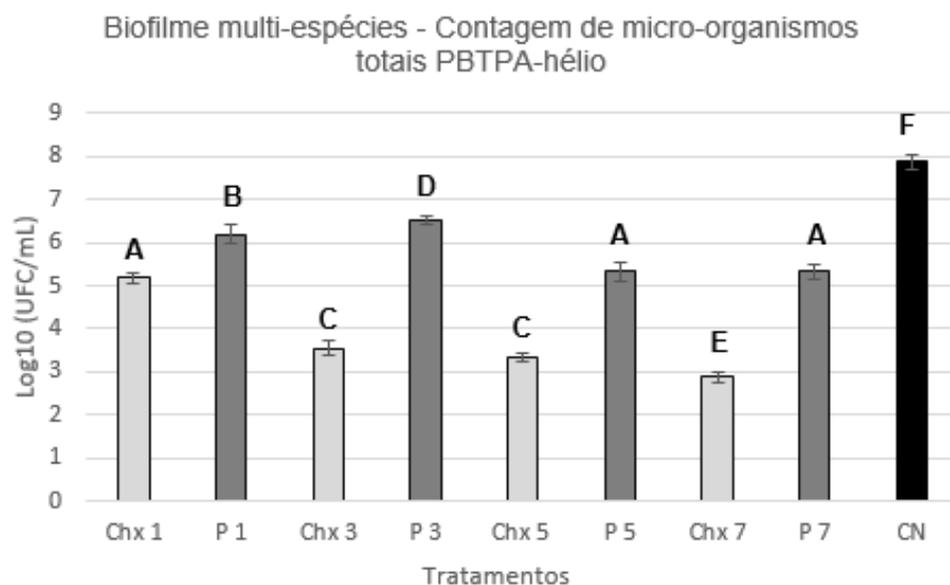
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.3 Efeitos do PBTPA-hélio sobre biofilmes cariogênicos

#### 4.3.1 Biofilmes multi-espécies

A Figura 9 indica a contagem do número de células viáveis totais ( $\log_{10}$  UFC/mL) dos biofilmes multi-espécies. Houve redução significativa de  $\log_{10}$  UFC / mL dos micro-organismos nos biofilmes multi-espécies formado por *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis* após todos os tempos (1, 3, 5 e 7 minutos) de exposição ao PBTPA-hélio quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ). Os tratamentos PBTPA-hélio por 5 e 7 minutos levaram reduções similares, ambos apresentaram redução superior a 2  $\log_{10}$  UFC/mL (2,546 e 2,548  $\log_{10}$  UFC/mL, respectivamente). Além disso, esses dois tempos de exposição ao PBTPA também apresentaram redução similar em relação ao digluconato de clorexidina 0,12% (Chx 1) por 1 minuto ( $p < 0,0001$ ). Para o biofilme de *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis*, todos os tempos de exposição (1, 3, 5 e 7 minutos) à digluconato de clorexidina 0,12% levaram a redução significativa no número de células viáveis ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle negativo.

Figura 9 – Contagem do número de células viáveis totais ( $\log_{10}$  UFC/mL) dos biofilmes multi-espécies formados por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* expostos ao plasma de baixa temperatura sob pressão atmosférica de hélio por 3, 5 e 7 minutos



Legenda: Valores médios e desvios-padrão  $\log_{10}$  (UFC / mL) de biofilmes multi-espécies compostos por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* tratados com PBTPA ou digluconato de clorexidina (0,12%). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). Chx1, Chx3, Chx5 e Chx7 (tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% (0,12%) por 1, 3, 5 e 7 minutos), P1, P3, P5 e P7 (tratamento PBTPA por 1, 3, 5 e 7 minutos) CN (controle negativo).

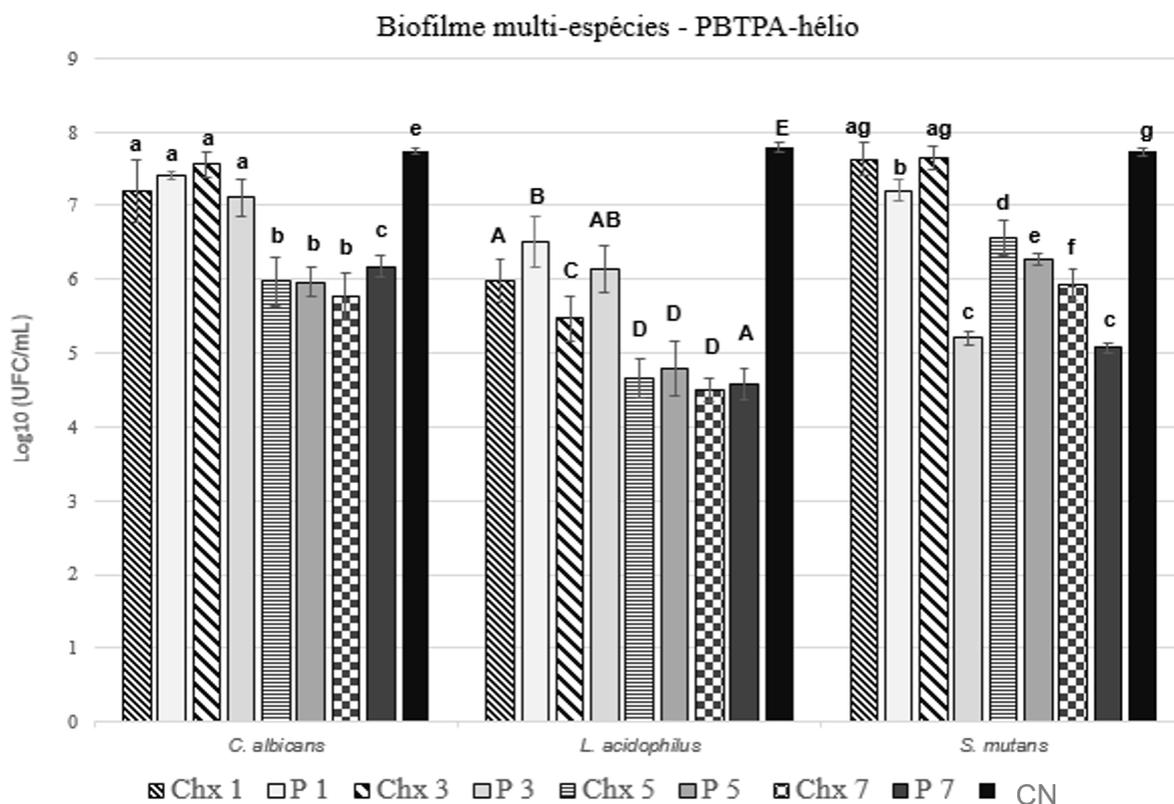
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 10 mostra os resultados de contagem de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC / mL) para os biofilmes multi-espécies formados por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans*. Foi observado redução significativa das contagens de *C. albicans* recuperadas do biofilme multi-espécies nas amostras tratadas com PBPTA-hélio em todos os tempos de exposição (1, 3, 5 e 7 minutos) em comparação ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ). Todos os tempos de tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% (1, 3, 5 e 7 minutos) também levaram à redução estatisticamente significativa de  $\log_{10}$  UFC/mL ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle negativo (NC).

Para *L. acidophilus*, todos os tempos de exposição apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparados ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ). Quando comparamos os tratamentos com digluconato de clorexidina 0,12% com o controle negativo, todos os tempos de tratamento (1, 3, 5 e 7 minutos) também apresentaram reduções estatisticamente significativa de  $\log_{10}$  UFC/mL ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de células viáveis recuperadas após o tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% (Chx5 e Chx7) e exposição ao PBTPA-hélio (P5 e P7) por 5 e 7 minutos.

Nas contagens de *S. mutans* recuperadas do biofilme multi-espécies, é possível observar que em todos os tempos de tratamentos com PBTPA-hélio levaram a redução estatisticamente significativa em  $\log_{10}$  UFC / mL quando comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos com digluconato de clorexidina 0,12% por 1 e 3 minutos (Chx1 e Chx3) apresentaram resultados estatisticamente semelhantes em comparação com o controle negativo ( $p = 0,196$  e  $p = 0,137$ , respectivamente). Os tratamentos por 5 e 7 minutos (Chx5 e Chx7) apresentaram redução estatisticamente semelhante quando comparados ao controle negativo. Por fim, não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos com PBTPA-hélio por 3 e 7 minutos (P3 e P7).

Figura 10 - Valores médios e desvios-padrão do número de células viáveis (log<sub>10</sub> UFC/mL) dos biofilmes multi-espécies compostos por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* tratados com PBTPA-hélio ou digluconato de clorexidina (0,12%) por 1, 3, 5 e 7 minutos



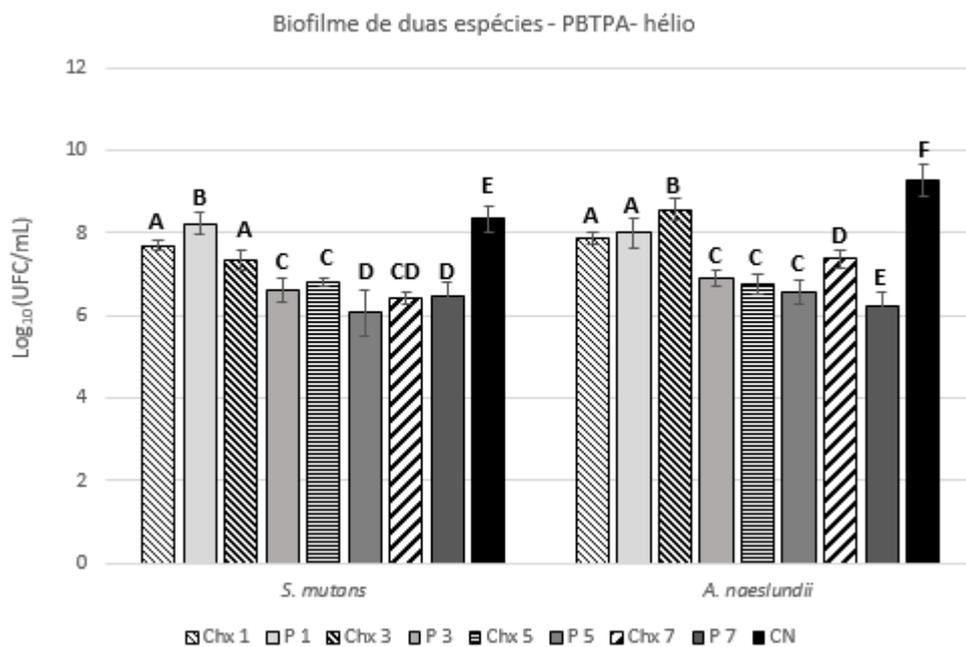
Legenda: Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). Chx1, Chx3, Chx5 e Chx7 (digluconato de clorexidina 0,12%, tratamento por 1, 3, 5 e 7 minutos), P1, P3, P5 e P7 (tratamento com PBTPA-hélio por 1, 3, 5 e 7 minutos) e CN (controle negativo).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 11 mostra os resultados de contagem de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC / mL) para os biofilmes dual-espécies formados por *A. naeslundii* e *S. mutans*. Houve redução significativa de células viáveis após 3, 5, e 7 minutos de exposição ao PBTPA-hélio quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ). Exposição por 1 minuto não apresentou redução significativa para esses micro-organismos.

Para *S. mutans*, não houve diferença significativa entre os tratamentos com PBTPA-hélio por 3, 5 e 7 minutos, todos levaram à redução no número de células viáveis superior a  $1,5 \log_{10}$  UFC/mL (1,73, 2,27 e 1,88  $\log_{10}$  UFC/mL).

Para *A. naeslundii*, houve redução significativa de células viáveis após todos os tempos de exposição do PBTPA-hélio (1, 3, 5 e 7 minutos) quando comparado ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ). Os tratamentos com PBTPA-hélio por 3, 5 e 7 minutos apresentaram redução superior a  $2 \log_{10}$  UFC/mL (2,38, 2,71 e 3,03  $\log_{10}$  UFC/mL). Além disso, para todos os micro-organismos presentes no biofilme dual-espécies, todos os tempos de exposição ao digluconato de clorexidina 0,12% (Chx 1, Chx 3, Chx 5 e Chx 7) levaram à redução estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao controle negativo.

Figura 11 - Valores médios e desvios-padrão do número de células viáveis ( $\log_{10}$  UFC/mL) dos biofilmes dual-espécies compostos por *A. naeslundii* e *S. mutans* tratados com PBTPA-hélio ou digluconato de clorexidina (0,12%)



Legenda – Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa ( $n = 9$ ;  $P \leq 0,05$ ; ANOVA, Teste de Tukey). Chx1, Chx3, Chx5 e Chx7 (tratamento com digluconato de clorexidina 0,12% por 1, 3, 5 e 7 minutos), P1, P3, P5 e P7 (tratamento PBTPA-hélio por 1, 3, 5 e 7 minutos) CN (controle negativo, NaCl 0,9%).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.3.3 Análise de microscopia dos biofilmes multi-espécies cariogênicos expostos ao PBTPA-hélio

#### Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

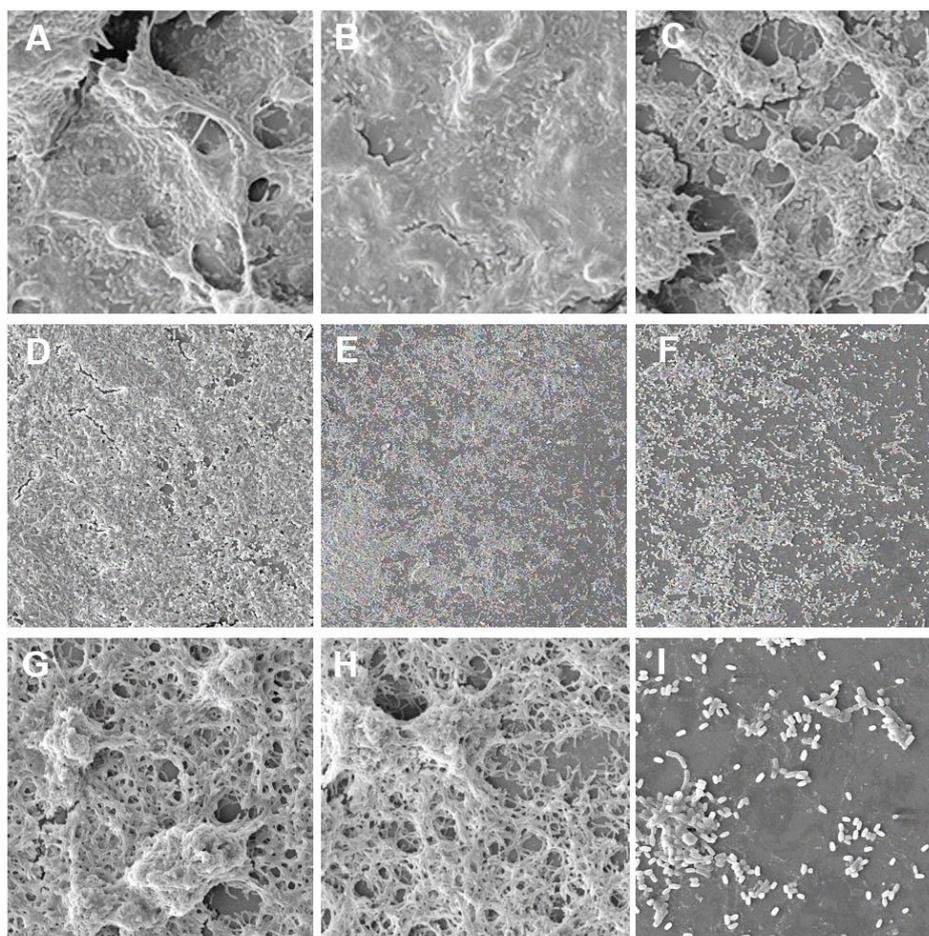
A Figura 12 mostram através das imagens obtidas da MEV o efeito antibiofilme do PBTPA-hélio (P7 min) e clorexidina 0,12% (CHX 7 min) após 7 min de exposição nos biofilmes multi-espécies formados pela composição de *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* (A, B e C). (A) controle negativo (biofilme intacto), (B) P7 min e (C) CHX 7 min. Além disso a Figura 12 também mostra o efeito do P7 min e CHX 7 min sobre biofilmes multi-espécies formados por *S. gordonii*, *S. Pmutans* e *S. sanguinis* (D, E, F), (D) Controle negativo (biofilme intacto), (E) P7 min e (F) CHX 7 min. Por fim, as imagens G, H e I obtidas através da MEV representam o efeito antibiofilme do P7 min e CHX 7 min em biofilmes de duas espécies formados pela composição *S. mutans* e *A. naeslundii*. (G) Controle negativo (biofilme intacto), (H) P7 min e (I) CHX 7 min.

Em (A) a análise revelou que a topografia superficial do biofilme estava homogênea, sem sinal de agressão por agentes, imagem do biofilme íntegro sem ação do PBTPA-hélio. Imagens similares podem ser observadas em (D e G). Já em (B) pode-se identificar através da análise da topografia superficial do biofilme realizada por MEV, que o biofilme apresentou maior agressão pela ação do PBTPA-hélio 7 min e também pela ação das espécies reativa de oxigênio formadas durante a reação em comparação ao biofilme íntegro (A), essa ação pode ser identificada também pela redução no número total de micro-organismos identificada na contagem de log<sub>10</sub> UFC/mL. Resultado similar pode ser observado em (E e H). Por fim, em (C) pode ser observado através da análise da

topografia superficial do biofilme realizada por MEV, que o biofilme apresentou maior agressão pela ação da CHX 7 min, reduzindo a quantidade de micro-organismos neste biofilme. Resultado similar pode ser observado em (F e I).

Em todos tratamentos com P7 min é possível notar mudanças na topografia superficial e estrutural na superfície dos biofilmes sugerindo que o a ação do P7 min pode ter afetado a morfologia dos biofilmes. Por fim, no tratamento por CHX 7 minutos de exposição, também é possível observar mudança na topografia superficial e estrutural na superfície dos biofilmes e redução do número total de micro-organismos após tratamento com esse agente (Figura 12).

Figura 12 - Imagens de Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes cariogênicos dual e polimicrobianos formados pela associação de diferentes micro-organismos. Biofilmes formados por *C. albicans*, *L. acidophilus*, *S. mutans*; *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii* e *S. mutans*. (A, D e G) controles negativos. (B, E e H) tratamentos com PBTPA-hélio por 7 min. (C, F e I) tratamentos com clorexidina 0,12% por 7 min



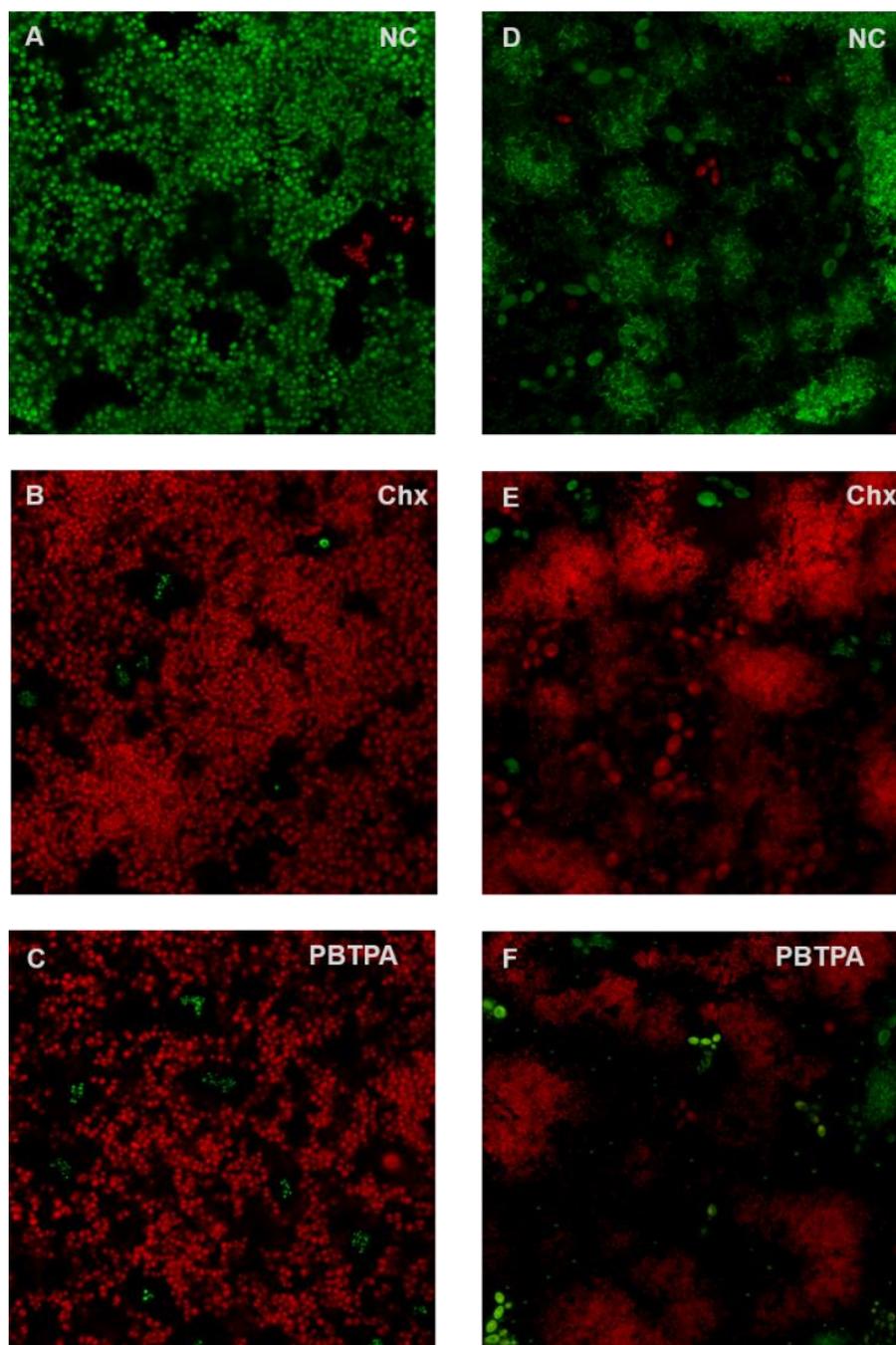
Legenda: Biofilme multi-espécies, cariogênico formado por *C. albicans*, *L. acidophilus*, *S. mutans* (A, B e C); biofilme multi-espécies, cariogênico formado por *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis* (D, E, F) e biofilme de duas espécies, cariogênico formado por *A. naeslundii* e *S. mutans* (G, H, I) expostos ou não ao PBTPA-hélio ou digluconato de clorexidina (0,12%) (x2000). Biofilme formado por *C. albicans*, *L. casei*, *S. mutans*: controle negativo (A), PBTPA-hélio 7 minutos (B) e digluconato de clorexidina (0,12%) (C) 7 minutos de tratamentos. Biofilme formado por *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis*: controle negativo (D), PBTPA-hélio 7 minutos (E) e digluconato de clorexidina (0,12%) (F) 7 minutos de tratamentos. Biofilme formado por *A. naeslundii* e *S. mutans*: controle negativo (G), PBTPA-hélio 7 minutos (H) e digluconato de clorexidina (0,12%) (I) 7 minutos de tratamentos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## Microscopia Eletrônica de Varredura Confocal (CSLM)

As imagens representativas da CSLM mostram a morfologia e a organização estrutural dos biofilmes multi-espécies formados por *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis* (A, B e C); *C. albicans*, *L. casei*, *S. mutans* (D, E e F) após tratamento dos biofilmes por PBTPA-hélio ou clorexidina (0,12%). Foi aplicado controle negativo. Na figura 13 podemos observar as imagens de células vivas que estão coradas de verde, enquanto as células mortas estão coradas de vermelho. As imagens obtidas são de biofilmes formados na superfície de lamínulas de 13 mm de diâmetro estéreis. As amostras tratadas por 7 minutos com PBTPA-hélio (P7) ou também por clorexidina (0,12%) (Chx), apresentaram maior número de células mortas (coradas em vermelho) quando comparadas visualmente ao controle negativo (CN) (maior número de células vivas que estão coradas em verde).

Figura 13 - Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) dos biofilmes multi-espécies cariogênicos expostos ao PBTPA-hélio e por clorexidina 00,12% ambos por 7 min. As imagens representa a morfologia e organização estrutural do biofilme multi-espécies, controle negativo (NC), clorexidina (0,12%) (Chx), exposição ao PBTPA-hélio por 7 min (PBTPA). As células vivas são coradas de verde, enquanto as células inviáveis são coradas de vermelho



Legenda: Zoom 25x. Biofilme corado com o kit Live / Dead BacLight Viability. Células vivas em verde e células mortas em vermelho. Células vivas e mortas (vivas / mortas) misturadas em verde fluorescente e vermelho. A) Controle Negativo de biofilme formado por *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*; B) Imagem do biofilme formado por *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. gordonii* após tratamento com digluconato de clorexidina (0,12%) por 7 min; C) Imagem do biofilme formado por *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. gordonii* após tratado com PBTPA-hélio por 7 min, D), A) Controle Negativo do biofilme formado por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans*; ; E) Imagem do biofilme formado por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* após tratamento com digluconato de clorexidina (0,12%) por 7min; F) Imagem do biofilme formado por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* após o tratamento com PBTPA-hélio por 7 min.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito do PBTPA-argônio sobre biofilmes cariogênicos

O biofilme dental que se forma na superfície do dente é uma estrutura altamente organizada, formada por diferentes micro-organismos que se abrigam na cavidade bucal, embebidos por uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos extracelulares (EPS) (Xu et al., 2018; Koo et al., 2013). Neste estudo, foram abordadas diferentes espécies de micro-organismos que são comumente relacionadas a formação do biofilme cariogênico na superfície do dente. Além disso, esse estudo permitiu uma compreensão melhor dos equipamentos envolvidos e dos parâmetros que foram aplicados nos tratamentos dos biofilmes com PBTPA.

Um estudo anterior que verificou a ação do PBTPA-argônio em biofilmes mono e de duas espécies formado por *S. mutans* e *S. sanguinis* no fundo de placas de poliestireno posteriormente tratados por 120 s, e distância de 5 mm da saída do plasma até a superfície da amostra, mostrou redução de 99% das células viáveis quando comparadas ao controle negativo (Liu et al., 2017). Os resultados do presente estudo corroboram com nossos resultados relatados de Liu et al. (2017) no capítulo 4, redução significativa na viabilidade do biofilme multi-espécies formado por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* após apenas 30 s de exposição ao PBTPA-argônio foi observada. Além disso; a distância da saída do plasma até a superfície da amostra do trabalho anteriormente citado foi inferior a nossa, o que pode ter contribuído no resultado. Nossos biofilmes foram tratados e a uma distância entre a saída do plasma até a superfície da amostra de 1,5 cm em intervalos de tempos de 30 s, 60 segundos e 120 segundos.

Em um artigo publicado por Hirano et al. (2019) foram analisados os efeitos de um dispositivo de PBTPA diferente do utilizado em nosso trabalho. Os autores analisaram a ação em células planctônicas e biofilme. Suspensões de células bacterianas contendo  $10^7$  UFC/mL de *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* ou *E. faecalis* foram analisadas. O gás de trabalho empregado foi ar comprimido, o dispositivo utilizava tensão elétrica e foram adotadas a distância de 1, 3 e 5 mm entre a saída do PBTPA até a superfície do biofilme foi aplicada, as amostras foram tratadas por 1, 3, 5 e 7 min (Hirano et al., 2019). Após tratamento com PBTPA os autores observaram redução significativa de mais de 4 logs no número de *S. mutans* após 3 min de tratamento e para os biofilmes, houve redução quase total na viabilidade bacteriana após 5 min. Em nosso estudo, além de termos utilizado uma distância maior da saída do dispositivo de plasma até a superfície da amostra, foi aplicado menor tempo de exposição. Mesmo sabendo que o biofilme multi-espécie é conhecido por ser mais resistente a terapias antibiofilme (Mah et al., 2012), os resultados obtidos em nosso trabalho foram importantes e significativos, pois foram utilizadas maiores distâncias e menores tempos de exposição dos biofilmes ao PBTPA. Além disso, não houve recuperação para *S. gordonii* após tratamento com PBTPA-argônio em todos os tempos de exposição testados, para ambos biofilmes mono ou multi-espécies espécies. *S. gordonii* é um dos primeiros colonizadores da cavidade oral e pode se ligar diretamente às proteínas salivares na superfície do dente, estabelecendo uma base para a construção de comunidades microbianas do biofilme cariogênico (Wright et al., 2013; Dû et al., 2000). A redução desses micro-organismos na cavidade oral pode prejudicar a formação do biofilme cariogênico (Dû et al., 2000).

Gorynia et al. (2013) testaram o PBTPA-argônio produzido pelo kinpen09 como uma opção para inativar micro-organismos e eliminar biofilme cariogênico. Os autores analisaram biofilmes de *S. sanguinis*, um dos colonizadores iniciais no

processo de formação do biofilme cariogênico. Os biofilmes foram cultivados em um reator europeu (EUREBI) e em placas de 24 poços. Ambos os biofilmes foram formados em superfície de placa de titânio por 72h. Em seguida, os biofilmes foram tratados com PBTPA-argônio (kINPen09™) por 180 s a 10 mm de distância entre o topo do disco até a saída do plasma. Os resultados demonstraram redução significativa do biofilme em relação ao controle negativo em ambos os modelos testados. Após a aplicação do plasma por 180 s, o biofilme produzido em EUREBI ou em placas de 24 poços foi reduzido em 0,6 log<sub>10</sub> UFC/ml ou 0,5 log<sub>10</sub> UFC/ml, respectivamente (Gorynia et al., 2013). Em comparação ao nosso trabalho, os biofilmes foram produzidos na superfície de discos de hidroxiapatita e os resultados obtidos após tratamento das amostras com PBTPA-argônio por 30 s, 60 s, 120 s e 10 mm da ponta do equipamento até a superfície da amostra foram significativos em comparação ao grupo controle negativo. Assim, todos os resultados obtidos em nosso trabalho (biofilme mono e multi-espécies) puderam contribuir para o entendimento mais amplo da ação do PBTPA-argônio em biofilmes mono e multi-espécies envolvendo essa espécie. *S. sanguinis* é tipicamente associado à formação do biofilme cariogênico na cavidade oral (Bik et al., 2010; Belda-Ferre et al., 2011) e assim como *S. gordonii*, *S. sanguinis* é um colonizador pioneiro que está intimamente relacionado com a ligação adicional de outros micro-organismos na superfície do dente e subsequente auxilia na formação de um biofilme cariogênico maduro (Caufield et al 2000; Aas et al., 2005).

Não há estudos na literatura relatando a ação da PBTPA sobre o biofilme polimicrobiano formado por *C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans*, esse fato mostra a originalidade do presente trabalho e neste estudo foi possível elucidar como os biofilmes formados pela associação desses micro-organismos foram significativamente reduzido após tratamento com PBTPA-argônio em todos grupos experimentais em comparação aos controles negativos e positivos.

Futuramente, nossos resultados obtidos para essa associação de micro-organismos poderão contribuir muito em outros trabalhos envolvendo essas espécies de micro-organismos.

Contagens de *L. casei* no biofilme multi-espécies também foram significativamente reduzidas após tratamento com PBTPA no presente trabalho. Em um estudo onde Blumhagen et al. (2015) analisaram a ação da escova do PBTPA-argônio (99,9%) sobre biofilmes mono espécie formados por baixa ( $10^5$ ) e alta ( $10^7$ ) concentração de *Lactobacillus* sp. e *S. mutans* sobre discos de hidroxiapatita, os autores identificaram que após tratamentos por 3, 9, 13, 15 e 18 s a uma distância de 5mm da ponta do jato de PBTPA-argônio até a superfície da amostra, que a exposição por 13 s do PBTPA-argônio inviabilizou completamente todas as células presente no biofilme formados por baixa concentração tanto de *Lactobacillus* quanto por *S. mutans*. No entanto, quando o biofilme foi formado com maior concentração, o biofilme apresentou maior resistência ao PBTPA-argônio e as reduções foram de 1,5 a 2 log e 2 a 2,5 log para *Lactobacillus* e *S. mutans*, respectivamente (Blumhagen et al., 2015). Comparando os resultados anteriormente citados com os obtidos no presente trabalho, podemos observar que mesmo que a distância do trabalho citado tenha sido menor e os parâmetros usados tenham sido diferentes dos utilizados em nosso estudo, nossos resultados também foram significativos e poderão contribuir para trabalhos futuros envolvendo PBTPA-argônio e/ou outros gases utilizados por diferentes equipamentos para formação do jato de PBTPA. Além disso, o equipamento gerador de plasma utilizado em nosso trabalho é capaz de formar apenas um único jato de plasma, diferente da escova de plasma que abrange uma área maior. Nosso trabalho apresentou redução similar em número de células viáveis (1,28 a 3,21 log e de 0,526 a 2,66 log tanto para *L. acidophilus* quanto para *S. mutans*, respectivamente). Estudos anteriores sugerem que a escova de

PBTPA pode produzir maior número de espécies reativas de oxigênio (Duan et al., 2007; Yang Y et al., 2021) em comparação com um único jato.

Estudos na literatura relatando a ação da PBTPA-argônio e/ou outros PBTPA sobre o biofilme de duas espécies formado por *A. naeslundii* e *S. mutans* são escassos. Entre estes micro-organismos, as espécies de estreptococos compreendem a maioria da população do biofilme cariogênico (Pratten et al., 2003). Análises revelaram que a desmineralização do esmalte é induzida pela aumentando a acidez do microambiente ao redor do dente, e esta acidez é principalmente gerada por um grupo seletivo de bactérias (Sheiham, 2015). Um estudo utilizando técnicas moleculares caracterizou a microbiota oral saudável e no estágio de doença de cárie revelou a diversidade de micro-organismos nesse biofilme oral, introduzindo *Actinomyces* spp. às espécies bacterianas associadas às cáries (Neves et al., 2017). da Silveira (2017), mostrou através da análise da concentração relativa de bactérias orais realizado por qPCR resultados significativos após tratamentos das amostras com PBTPA-argônio. O trabalho envolveu o mesmo equipamento utilizado em nosso trabalho (kINPen09™) para gerar PBTPA-argônio. Após tratamento das amostras de biofilmes bucal formados *in situ* aplicando a mesma distância utilizada em nosso trabalho (1,0 cm), as concentrações de *S. mutans*, *L. acidophilus*, grupo *S. mitis*, *A. naeslundis* e o grupo *Bifidobacterium* foram significativamente reduzidas após tratamento com PBTPA-argônio comparando aos outros grupos de tratamento (Gás argônio e Clorexidina 0,12%). Nosso trabalho envolveu uma forma diferente de análise dos micro-organismos, entretanto, nossos resultados corroboram com os resultados apresentando anteriormente. Em nosso estudo foi possível elucidar e compreender através de contagem de log<sub>10</sub> UFC/mL, como os biofilmes formados pela associação desses micro-organismos foi significativamente reduzida após tratamento com PBTPA-argônio em todos tempos testados em comparação aos controles negativo e positivo.

## 5.2 Efeito do PBTPA-hélio sobre biofilmes cariogênicos

No presente estudo verificou-se que o PBTPA-hélio apresentou efeito antibiofilme frente a *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis* e as reduções foram significativas e apresentadas em log<sub>10</sub> UFC/mL após tratamento das amostras dos biofilmes com PBTPA-hélio em todos os tempos analisados em comparação ao controle negativo. O equipamento utilizado em nosso estudo foi descrito no item 3.1.2, a distância utilizada foi de 1,5 cm da ponta do PBTPA até a amostra. Os resultados obtidos corroboram os achados por Yang et al. (2020), onde os autores verificaram a ação do PBTPA-hélio sobre biofilmes mono espécie formado por *S. mutans*. Entretanto, diferente do nosso estudo, os biofilmes foram formados em discos de zircônia em diferentes tempos de crescimento (24, 48 e 72h). Após esses períodos de crescimento os biofilmes foram tratados e uma distância de 1,0 cm da saída do jato de plasma até a superfície da amostra foi aplicada. Os biofilmes foram tratados com PBTPA-hélio por 30, 60 e 90s e, após os tratamentos, os biofilmes foram submetidos a ensaio um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular (ensaio de MTT). Os resultados da densidade óptica (DO) de todos grupos tratados com PBTPA-hélio mostraram redução significativa em comparação ao grupo controle negativo (Yang et al., 2020). Complementando o trabalho anterior, em um outro estudo, Yang et al. (2021) formaram os biofilmes no mesmo substrato de zircônia pelos mesmos tempos (24, 48 e 72h), e posteriormente foram tratados com PBTPA-hélio também pelos mesmos tempos (30, 60 e 90s). Anteriormente, o objetivo dos autores foi descobrir se o crescimento de *S. mutans* poderia ser inibido após tratamento com PBTPA-hélio, esta hipótese foi confirmada. Neste trabalho, os autores também confirmaram que a presença de espécies reativas de oxigênio na superfície do biofilme formado por

*S. mutans* após o tratamento com PBTPA-hélio inibiu o crescimento deste biofilme. Para tanto, coloração de ERO e um eliminador de ERO foram utilizados para avaliar o nível de ERO intracelular bacteriano e também para determinar o papel de ERO na inibição do crescimento bacteriano quando os biofilmes são tratados com PBTPA-hélio. Mudanças nas características da superfície antibacteriana foram causadas pela ERO. Além disso, a confirmação de ERO na superfície do biofilme levou os autores a concluir que a eficácia é dependente do tempo do tratamento com PBTPA-hélio, corroborando ainda mais com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual as concentrações de micro-organismo foram reduzidas com o aumentar do tempo de exposição das amostras ao PBTPA-hélio.

Em um outro estudo os autores analisaram a aplicação do PBTPA-hélio em biofilme de *S. mutans* cultivados em dentes humanos para avaliar a eficiência do PBTPA-hélio na redução dos biofilmes formados por *S. mutans* e também o impacto do PBTPA-hélio no esmalte e dentina após tratamentos. Os resultados mostram que tanto o modo do jato de corona pulsado quanto o contínuo podem reduzir a população bacteriana nos biofilmes formados nos dentes em até 3 log com 10 min de exposição. Além disso, os autores também determinaram que este efeito bactericida pode ser alcançado mais rapidamente (dentro de 5 min) por pulverização eletrostática de água através da descarga na superfície do dente tratado (Kovalová et al., 2014).

Diferente dos estudos citados acima, Qing et al. (2016) investigaram o efeito do tratamento da escova de PBTPA composto por uma mistura de dois gases em biofilme mono espécie. A vazão do gás foi 3.000 sccm, a potência do equipamento foi ajustada para 10 W, corrente ajustada a 8 mA e um tensão inicial de 3 kV. A distância da ponta do gerador de plasma até a superfície da amostra foi de 4 mm. O efeito da escova de plasma foi analisado sobre biofilmes mono espécie formados por *S. mutans* por 3 dias nas superfícies de discos de

hidroxiapatita. Após tratamento com PBTPA por 1 minuto, 90% de redução do biofilme foi observado. Comparado ao nosso estudo que utilizou um dispositivo gerador de PBTPA diferente e jato de plasma ao invés de escova de plasma, nossos resultados foram extremamente significativos. Primeiramente, porque a escova de plasma pode tratar uma superfície maior. Além disso, a distância utilizada em nosso estudo foi maior (15 mm) em relação ao estudo de Qing et al. (2016) (4mm), o que representa uma vantagem clínica relevante. O jato de plasma tem a vantagem de tratar um ponto específico quando comparada à escova de plasma (Duan et al., 2017), o que pode ser útil em algumas situações clínicas onde há necessidade de aplicações em locais mais estreitos.

Em outro estudo que investigou a ação do PBTPA de argônio/oxigênio com vazão de 3.000 sccm, corrente ajustada a 10 mA, tensão inicial de 0,8 kV e distância da ponta do gerador de plasma até a superfície da amostra de 5 mm. A ação do PBTPA foi analisada com aplicação de 120 segundos em biofilmes de duas espécies formados por *S. mutans* e *S. sanguinis* no fundo de placas de poliestireno. Após exposição do biofilme ao PBTPA, foi observada uma redução de 99% de células viáveis quando comparado ao controle negativo (Liu et al., 2017). Em nosso estudo foi observada redução significativa no total de células viáveis em todos os tempos de exposição no biofilme multi-espécies formado por *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*. Além de nosso estudo corroborar o estudo citado acima, confirmando a eficácia do PBTPA no tratamento de biofilmes cariogênicos formados *in vitro*, nosso estudo comprovou a eficácia nos tempos de exposição mais longos (5 e 7 minutos), nos quais foram detectadas reduções superiores a 2 logs de log<sub>10</sub> UFC/mL.

Hirano et al. (2019) analisaram o efeito de um protótipo gerador de PBTPA-ar em biofilmes mono espécies formado por *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*. O dispositivo operou em modo pulsado, tensão de  $7,5 \pm 0,5$  kV, frequência de 200 Hz, fluxo de gás de 1,0 L/minuto, distância

entre a saída do PBTPA até a superfície do biofilme formado por *S. mutans* foram de 1, 3 e 5 mm e o tratamento foi realizado por 1, 3, 5 e 7 minutos. Para *S. mutans*, o tratamento com PBTPA-ar causou redução significativa a partir de 3 minutos de tratamento. Em nosso estudo, foi observado maior resistência do biofilme multi-espécies formado por *S. gordonii*, *S. mutans* e *S. sanguinis* ao PBTPA-hélio em comparação aos biofilmes mono-espécies. Entretanto, a distância de trabalho usada em nosso estudo foi maior, o que pode ser vantajoso para a aplicação em odontologia clínica.

A viabilidade dos os micro-organismos presentes em biofilmes multi-espécies formados por *C. albicans*, *L. acidophilus* e *S. mutans* foi significativamente reduzida após tratamento com PBTPA-hélio em todos grupos experimentais em comparação ao controle negativo.

Em um estudo *in vitro* onde o objetivo foi testar PBTPA-hélio quanto à sua eficácia antimicrobiana frente a *Lactobacillus casei*, os autores tiveram dois objetivos, avaliar a ação PBTPA-hélio em *L. casei* compostos em placas de petri e em fragmentos de dentina. Para tanto, 100µl das suspensões microbianas foram semeados (6 log<sub>10</sub> UFC em placas de ágar (90 mm de diâmetro) e secos por 15 min a 37 °C. A duração do tratamento das placas de ágar foi de 33, 63 e 91 s em varredura, uma área de superfície de 1 cm<sup>2</sup> resultando em tempos de irradiação de 0,3, 0,6 e 0,9 s por mm<sup>2</sup>, respectivamente. As placas de ágar foram incubadas por 48 h a 37 °C. A área irradiada foi avaliada em comparação com a superfície circundante do ágar não tratada. As colônias foram contadas e as zonas de inibição foram medidas. Fragmentos de dentina de 2 mm de espessura com diâmetros de 8 a 10 mm foram obtidas a partir de coroas de molares humanos extraídos. Posteriormente, as amostras foram lixadas, limpas em ultrassom por 15 min e autoclavadas. 5 µl das suspensões microbianas foram inoculadas no centro das fatias de dentina cobrindo uma área de aproximadamente 20 mm<sup>2</sup>. Os espécimes foram incubados por 15 min para aderência bacteriana. Fragmentos de dentina

foram fixadas em placas de vidro estéreis e expostas imediatamente. As áreas das fatias de dentinas contaminadas foram tratadas, semelhante ao tratamento com placa de ágar descrito acima. Os resultados dos tratamentos PBTPA-hélio das placas de ágar mostraram completa inibição do crescimento de *L. casei* nas aéreas de superfície irradiada. Uma média de 2 log<sub>10</sub> CFU *L. casei* foram recuperados dos fragmentos de dentina após tratamento com PBTPA-hélio a uma taxa de varredura de 0,3 s mm<sup>2</sup>. Após 63 e 91 segundo de tratamento a uma taxa de 0,6 e 0,9 s mm<sup>2</sup> de tratamento, respectivamente, este número diminuiu para 1 log<sub>10</sub> CFU (Rupf et al., 2010). Apesar de nosso trabalho ter objetivos diferentes, os resultados apresentados acima corroboram com nosso trabalho no sentido de demonstrar a eficácia do PBTPA-hélio em eliminar *Lactobacillus* tanto cultivados em placas, fatias de dentina ou em biofilme multi-espécie. Todos esses resultados nos fornece uma compreensão melhor sobre a ação do PBTPA-hélio em lactobacilos, pois nos fornece parâmetros efetivos para redução do biofilme formados por essa espécie.

Para *A. naeslundii*, houve redução significativa de log<sub>10</sub> UFC / mL após todos os tempos de exposição do PBTPA (1, 3, 5 e 7 minutos) quando comparado ao controle negativo (p <0,0001). A decisão de ter escolhido *A. naeslundii* e *S. mutans* para a formação de um biofilme de duas espécies foi porque é sabido que a microbiota isolada de lesões de cárie inclui diversas espécies que são capazes de proliferar no ambiente cariogênico, tais como lactobacilos, *Actinomyces* spp., *S. mutans*, *S. sobrinus*, leveduras e bifidobactérias (Mantzourani et al., 2009; Peterson et al., 2011). Não há na literatura estudo envolvendo biofilme formado por *Actinomyces* spp. seguida de tratamento com PBTPA, o que dificulta uma discussão mais abrangente.

Neste estudo, comparamos os resultados obtidos no tratamento com PBTPA com digluconato de clorexidina 0,12% (CHX 0,12%). Digluconato de clorexidina é uma substância química padrão-ouro com ação antibacteriana contra

bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nayak et al., 2020). Foi possível observar que o tratamento com CHX 0,12% foi capaz de reduzir quantidade de UFC de acordo com o tempo de exposição em relação ao negativo. A eficácia da CHX 0,12% pode estar associada à proteção que apresenta um biofilme bem estabelecido e maduro, capaz de proteger os micro-organismos contra dessecação, biocidas oxidantes ou carregados, antibióticos, cátions metálicos e radiação ultravioleta (Flemming, Wingender, 2010). No entanto, é de conhecimento que um único tratamento com clorexidina 0,12%, não é capaz de reduzir a quantidade de células viáveis quando comparado a controle negativo tanto em biofilme mono quanto multi-espécies. Como enxaguatório bucal e agente antiplaca, é recomendado que a clorexidina 0,12% seja usada duas vezes ao dia (McBain et al., 2003).

Após análise dos resultados tanto do PBTPA-argônio quanto PBTPA-hélio é possível sugerir que quando o equipamento gerador de PBTPA trabalha com gases diferentes, diferentes resultados também são obtidos. Especificamente neste estudo o PBTPA-argônio apresentou resultados mais promissores em comparação ao PBTPA-hélio. Estudos mais abrangente com a finalidade comparativa dos gases é necessário para o melhor entendimento dos jatos de PBTPA formados por esses dois gases e de seus produtos finais. A espectroscopia de emissão óptica talvez possa fornecer um melhor entendimento das principais espécies reativas de oxigênio presentes nos dois tipos de PBTPA presente neste trabalho.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os PBTPA-argônio e hélio mostraram efeito antibiofilme significativos contra biofilmes mono, dual e multi-espécies formados por *A. naeslundii*, *C. albicans*, *L. casei*, *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis*.

Os baixos tempos de exposição do PBTPA-argônio afetaram os biofilmes cariogênicos de uma, duas e multi-espécies. PBTPA-hélio os tempos mais efetivos foram 5 e 7 min de exposição. Os resultados apontam o PBTPA, sendo um candidato promissor para contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos para o tratamento e controle da cárie dentária e/ou novo protocolo de Odontologia de Intervenção Mínima.

**REFERÊNCIAS\***

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-32. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005. PMID: 16272510; PMCID: PMC1287824.
- Abonti TR, Kaku M, Kojima S, Sumi H, Kojima S, Yamamoto T, et al. Irradiation effects of low temperature multi gas plasma jet on oral bacteria. *Dent Mater J.* 2016;35(5):822-8. doi: 10.4012/dmj.2016-062. PMID: 27725521.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1001-9. doi: 10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002. PMID: 11880430; PMCID: PMC120252.
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012 Jan;6(1):46-56. doi: 10.1038/ismej.2011.85. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21716308; PMCID: PMC3246241.
- Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010 Aug;4(8):962-74. doi: 10.1038/ismej.2010.30. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20336157; PMCID: PMC2941673.
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16630-5. doi: 10.1073/pnas.0407460101. Epub 2004 Nov 16. PMID: 15546998; PMCID: PMC528905.
- Borges AC, Lima GMG, Nishime TMC, Gontijo AVL, Kostov KG, Koga-Ito CY. Amplitude-modulated cold atmospheric pressure plasma jet for treatment of oral candidiasis: In vivo study. *PLoS One.* 2018 Jun 27;13(6):e0199832. doi: 10.1371/journal.pone.0199832. PMID: 29949638; PMCID: PMC6021106.
- Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol.* 2017 Aug;123(2):308-24. doi: 10.1111/jam.13429. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28245092.

Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):126-31. doi: 10.1177/154411130201300203. PMID: 12097355.

Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem AC, Delbem AC, Oliveira MA, Soares CP, et al. Systematic screening of plant extracts from the Brazilian Pantanal with antimicrobial activity against bacteria with cariogenic relevance. *Caries Res*. 2014;48(5):353-60. doi: 10.1159/000357225. Epub 2014 Mar 6. PMID: 24603299.

Carreiro AFP, Delben JA, Guedes S, Silveira EJD, Janal MN, Vergani CE, et al. Low-temperature plasma on peri-implant-related biofilm and gingival tissue. *J Periodontol*. 2019 May;90(5):507-15. doi: 10.1002/JPER.18-0366. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30387879.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4018-23. doi: 10.1128/IAI.68.7.4018-4023.2000. PMID: 10858217; PMCID: PMC101685.

Colombo APV, Souto RMD, da Silva Boghossian CM, Miranda R, Lourenço TGB. Microbiology of oral biofilm-dependent diseases: have we made significant progress to understand and treat these diseases? *Curr. Oral Health Rep*. 2015;2:37-47. doi: <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0041-8>.

Dame-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, Tugnait A, Devine D, Do T. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions. *J Oral Microbiol*. 2016 Sep 16;8:32383. doi: 10.3402/jom.v8.32383. PMID: 27640531; PMCID: PMC5027334.

de Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on mono- and multi-species cariogenic biofilms: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2017 May;35(5):239-45. doi: 10.1089/pho.2016.4108. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28121497; PMCID: PMC5439435.

de Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, Koga-Ito CY, Farias AL, Kirker KR. *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* Interaction in Dual-Species Biofilm. *Microorganisms*. 2020 Jan 31;8(2):194. doi: 10.3390/microorganisms8020194. PMID: 32023892; PMCID: PMC7074783.

Delben JA, Murata RM, Wei X, Castro ML, Assunção WG, da Silva NRFA, et al. Low-temperature plasma: an effective approach against *Candida*

*albicans* biofilm. *Plasma Med.* 2014;18(4):231–44. doi: 10.1615/PlasmaMed.2014012361.

Delben JA, Zago CE, Tyhovych N, Duarte S, Vergani CE. Effect of atmospheric-pressure cold plasma on pathogenic oral biofilms and in vitro reconstituted oral epithelium. *PLoS One.* 2016 May 25;11(5):e0155427. doi: 10.1371/journal.pone.0155427. PMID: 27224027; PMCID: PMC4880209.

Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, Quinton D, Camus M, Garrigues L, et al. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Sci Rep.* 2017 Jan 25;7:41163. doi: 10.1038/srep41163. PMID: 28120925; PMCID: PMC5264585.

do Nascimento CA, Kim RR, Ferrari CR, de Souza BM, Braga AS, Magalhães AC. Effect of sweetener containing Stevia on the development of dental caries in enamel and dentin under a microcosm biofilm model. *J Dent.* 2021 Dec;115:103835. doi: 10.1016/j.jdent.2021.103835. Epub 2021 Oct 12. PMID: 34653536.

Dû LD, Kolenbrander PE. Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4834-7. doi: 10.1128/IAI.68.8.4834-4837.2000. PMID: 10899901; PMCID: PMC98450.

Duan Y, Huang C, Yu QS. Cold plasma brush generated at atmospheric pressure. *Rev Sci Instrum.* 2007 Jan;78(1):015104. doi: 10.1063/1.2409624. PMID: 17503943.

Fachon-Kalweit S, Elder BL, Fives-Taylor P. Antibodies that bind to fimbriae block adhesion of *Streptococcus sanguis* to saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun.* 1985 Jun;48(3):617-24. doi: 10.1128/iai.48.3.617-624.1985. PMID: 2860066; PMCID: PMC261206.

Frencken J. Caries Epidemiology and its challenges. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:11-23. doi: 10.1159/000487827. Epub 2018 May 24. PMID: 29794449.

Frencken JE. Atraumatic restorative treatment and minimal intervention dentistry. *Br Dent J.* 2017 Aug 11;223(3):183-9. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.664. PMID: 28798450.

Gomar-Vercher S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a

pyrosequencing study. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2087-94. doi: 10.1007/s00784-014-1200-y. Epub 2014 Feb 15. PMID: 24532386.

Goree J, Liu B, Drake D, Stoffels E. Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci*. 2006;34(4):1317–24. doi: 10.1109/TPS.2006.878431.

Gorynia S, Koban I, Matthes R, Welk A, Gorynia S, Hübner NO, et al. In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models. *GMS Hyg Infect Control*. 2013 Apr 29;8(1):Doc01. doi: 10.3205/dgkh000201. PMID: 23967387; PMCID: PMC3746598.

Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47722. doi: 10.1371/journal.pone.0047722. Epub 2012 Oct 16. PMID: 23091642; PMCID: PMC3472979.

Hirano Y, Hayashi M, Tamura M, Yoshino F, Yoshida A, Masubuchi M, et al. Singlet oxygen generated by a new nonthermal atmospheric pressure air plasma device exerts a bactericidal effect on oral pathogens. *J Oral Sci*. 2019 Nov 27;61(4):521-5. doi: 10.2334/josnusd.18-0455. Epub 2019 Oct 5. PMID: 31588099.

Jakubovics NS, Gill SR, Iobst SE, Vickerman MM, Kolenbrander PE. Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *J Bacteriol*. 2008 May;190(10):3646-57. doi: 10.1128/JB.00088-08. Epub 2008 Mar 21. PMID: 18359813; PMCID: PMC2395002.

Jang HJ, Kim JH, Lee NK, Paik HD. Inhibitory effects of *Lactobacillus brevis* KU15153 against *Streptococcus mutans* KCTC 5316 causing dental caries. *Microb Pathog*. 2021 Aug;157:104938. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104938. Epub 2021 May 20. PMID: 34022360.

Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS ONE*. 2011;6:e16270. doi: 10.1371/journal.pone.0016270.

Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk j, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phy*. 2009 nov;11(11).doi: 10.1088/1367-2630/11/11/115012.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013 Dec;92(12):1065-73. doi: 10.1177/0022034513504218. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24045647; PMCID: PMC3834652.

Kovalová Z, Zahoran M, Zahoranová A, Machala Z. Streptococci biofilm decontamination on teeth by low-temperature air plasma of dc corona discharges. *J Phys D Appl Phys*. 2014;4(22):224014(8pp).

Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Jun;23(3):213-9. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00413.x. PMID: 18402607.

Kuramitsu HK, Wang BY. Virulence properties of cariogenic bacteria. *BMC Oral Health*. 2006 Jun 15;6 Suppl 1(Suppl 1):S11. doi: 10.1186/1472-6831-6-S1-S11. PMID: 16934112; PMCID: PMC2147595.

Laroussi M. Plasma medicine: a brief introduction. *Plasma*. 2018 Jan;1(1):47-60. doi: <https://doi.org/10.3390/plasma1010005>

Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019 Jan;7(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. PMID: 30657107; PMCID: PMC6615571.

Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2007 Jan;45(1):81-7. doi: 10.1128/JCM.01622-06. Epub 2006 Nov 1. PMID: 17079495; PMCID: PMC1828962.

Liu T, Wu L, Babu JP, Hottel TL, Garcia-Godoy F, Hong L. Effects of atmospheric non-thermal argon/oxygen plasma on biofilm viability and hydrophobicity of oral bacteria. *Am J Dent*. 2017 Feb;30(1):52-56. PMID: 29178715.

Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci*. 2012 Sep;4(3):135-40. doi: 10.1038/ijos.2012.54. Epub 2012 Sep 21. PMID: 22996271; PMCID: PMC3465751.

Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC, Urzúa Orellana BR. Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida*

non-albicans in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontol Scand.* 2017 Jan;75(1):30-5. doi: 10.1080/00016357.2016.1244560. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27796162.

Mackenzie L, Banerjee A. Minimally invasive direct restorations: a practical guide. *Br Dent J.* 2017 Aug 11;223(3):163-71. doi: 10.1038/sj.bdj.2017.661. PMID: 28798466.

Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012 Sep;7(9):1061-72. doi: 10.2217/fmb.12.76. PMID: 22953707.

Maia TS, Lima TD, Vieira WA, Blumenberg C, Agostini BA, Nascimento GG, et al. Survival of atraumatic restorative treatment restorations in the elderly patients: a systematic review. *Braz Oral Res.* 2021 Dec 6;35:e130. doi: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0130. PMID: 34878085.

Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent.* 2010 Jun;38 Suppl 1:S11-5. doi: 10.1016/S0300-5712(10)70005-1. PMID: 20621238.

Martignon S, Roncalli AG, Alvarez E, Aránguiz V, Feldens CA, Buzalaf MAR. Risk factors for dental caries in Latin American and Caribbean countries. *Braz Oral Res.* 2021 May 28;35(suppl 01):e053. doi: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0053. Erratum in: *Braz Oral Res.* 2021 Jul 19;35(Suppl 1):e053err. Erratum in: *Braz Oral Res.* 2021 Sep 06;35(Suppl 1):e053err2. PMID: 34076077.

Mattos-Graner RO, Klein MI, Smith DJ. Lessons Learned from clinical studies: roles of mutans streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Curr Oral Health Rep.* 2014;1:70-8. doi: <https://doi.org/10.1007/s40496-013-0008-1>.

McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Aug;69(8):4770-6. doi: 10.1128/AEM.69.8.4770-4776.2003. PMID: 12902270; PMCID: PMC169085.

Mohan PV, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC. In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemp Clin Dent.* 2016 Jan-Mar;7(1):45-50. doi: 10.4103/0976-237X.177110. PMID: 27041900; PMCID: PMC4792055.

Naidu BV, Reginald BA. Quantification and correlation of oral candida with caries index among different age groups of school children: a case-control study.

Ann Med Health Sci Res. 2016 Mar-Apr;6(2):80-4. doi: 10.4103/2141-9248.181843. PMID: 27213089; PMCID: PMC4866371.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JL. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social [Dental caries in Brazil: decline, polarization, inequality and social exclusion]. Rev Panam Salud Publica. 2006 Jun;19(6):385-93. Portuguese. doi: 10.1590/s1020-49892006000600004. PMID: 16968593.

Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. Oral Microbiol Immunol. 2009 Apr;24(2):89-95. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00477.x. Erratum in: Oral Microbiol Immunol. 2009 Jun;24(3):264. PMID: 19239634; PMCID: PMC2742966.

Neves BG, Stipp RN, da Silva Bezerra D, de Figueiredo Guedes SF, Rodrigues LKA. Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions. Clin Oral Investig. 2017 Jul;21(6):2053-61. doi: 10.1007/s00784-016-1995-9. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27837345.

Neyts EC, Brault P. Molecular dynamics simulations for plasma-surface interactions. Plasma Processes and Polymers. 2016 set;14:1-2. Doi: <https://doi.org/10.1002/ppap.201600145>.

Nishikawara F, Nomura Y, Imai S, Senda A, Hanada N. Evaluation of cariogenic bacteria. Eur J Dent. 2007 Jan;1(1):31-9.

Nobbs AH, Khammanivong AZY, Herzberg MC. *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. J Bacteriol. 2007;189(8):3106-14. doi: 10.1128/JB.01535-06.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. J Dent Res. 2004 Jan;83(1):71-5. doi: 10.1177/154405910408300114. PMID: 14691117.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J Dent Res. 2006 Oct;85(10):878-87. doi: 10.1177/154405910608501002. PMID: 16998125; PMCID: PMC2257872.

Pai K, Timmons C, Roehm KD, Ngo A, Narayanan SS, Ramachandran A, et al. Investigation of the roles of plasma species generated by surface dielectric barrier discharge. *Sci Rep*. 2018 Nov 12;8(1):16674. doi: 10.1038/s41598-018-35166-0. PMID: 30420780; PMCID: PMC6232176.

Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, De Souza-E-Silva CM, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-Dos-Santos M. Assessment of cavitated and active non-cavitated caries lesions in 3- to 4-year-old preschool children: a field study. *Int J Paediatr Dent*. 2012 Mar;22(2):92-9. doi: 10.1111/j.1365-263X.2011.01171.x. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21815955.

Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranayake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*. 2018 May;24(4):518-26. doi: 10.1111/odi.12691. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28513096.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 25;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30. PMID: 28540937.

Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Aug 15;189(2):215-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09233.x. PMID: 10930741.

Qi X, Zhu XM, Liu X, Li J, Zhao LX, Li HP, et al. Effects of a helium cold atmospheric plasma on bonding to artificial caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2022 Feb 1;41(1):101-9. doi: 10.4012/dmj.2021-091. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34602586.

Qiu R, Li W, Lin Y, Yu D, Zhao W. Genotypic diversity and cariogenicity of *Candida albicans* from children with early childhood caries and caries-free children. *BMC Oral Health*. 2015 Nov 17;15(1):144. doi: 10.1186/s12903-015-0134-3. PMID: 26576955; PMCID: PMC4650516.

Rajoka MSR, Riaz Rajoka MS, Mehwish HM, Siddiq M, Haobin Z, Zhu J, et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT - Food Sci Technol*. 2017 oct;84:271–80. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055.

Ranjan R, Krishnamraju PV, Shankar T, Gowd S. Nonthermal plasma in dentistry: an update. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017 May-Jun;7(3):71-5. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD\_29\_17. Epub 2017 May 22. PMID: 28584774; PMCID: PMC5452569.

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000 Nov;2(13):1599-607. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01316-2. PMID: 11113379 .

Rupf S, Lehmann A, Hannig A, Schäfer B, Schubert A, Feldman U, et al. Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 2):206-12. doi: 10.1099/jmm.0.013714-0. Epub 2009 Nov 12.

Salonen L, Allander L, Bratthall D, Hellden L. Mutans Streptococci, oral hygiene, and caries in an adult swedish population. *J Dent Res.* 1990 Aug;69(8):1469-75. doi: 10.1177/00220345900690080401.

Sampaio FC, Bönecker M, Paiva SM, Martignon S, Ricomini Filho AP, Pozos-Guillen A, et al. Dental caries prevalence, prospects, and challenges for Latin America and Caribbean countries: a summary and final recommendations from a Regional Consensus. *Braz Oral Res.* 2021;28(35 suppl 1):e056. doi: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0056.

Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect Control.* 2019 may;16(8):76. doi: 10.1186/s13756-019-0533-3.4.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. *J Dent* 2004;32:667-78.

So M, Ellenikiotis YA, Husby HM, Paz CL, Seymour B, Sokal-Gutierrez K. Early childhood dental caries, mouth pain, and malnutrition in the ecuadorian amazon region. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 may;14(5):E550. doi:10.3390/ijerph14050550.

Sounah SA, Madfa AA. Correlation between dental caries experience and the level of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in saliva and carious teeth in a Yemeni adult population. *BMC Research Notes.* 2020;13(1):112. doi: 10.1186/s13104-020-04960-3.

Souza JCM, Mota RRC, Sordi MB, Passoni BB, Benfatti CAM, Magini RS. Biofilm formation on different materials used in oral rehabilitation. *Braz Dent J.* 2016 apr;27(2):141–7. doi.org/10.1590/0103-6440201600625

Sreenivasan PK, Gittins E. The effects of a chlorhexidine mouthrinse on culturable microorganisms of the tongue and saliva. *Microbiol. Res.* 2004;(159):365–70.

Sutthavong S, Taebanpakul S, Kuruchitkosol C, Ayudhya TI, Chantveerawong T, Fuangroong S, et al. Oral health status, dental caries risk factors of the children of public kindergarten and schools in Phranakornsriayudhya, Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2010 Nov;93 Suppl 6:S71-8. PMID: 21284137.

Tabata M, Ratanaporncharoen C, Ishihara N, Masu K, Sriyudthsak M, Kitasako Y, et al. Surface analysis of dental caries using a wireless pH sensor and Raman spectroscopy for chairside diagnosis. *Talanta*. 2021 Dec 1;235:122718. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122718. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34517586.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008 oct;42:409–18. doi: 10.1159/000159604.

Takahashi N, Yamada T. Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(4):487–503. doi: 10.1177/10454411990100040501.

Takamatsu T, Uehara K, Sasaki Y, Miyahara H, Matsumura Y, Iwasawa A, et al. Investigation of reactive species using various gas plasmas. *RSC Adv*. 2014;4:39901–39905. doi: 10.1039/C4RA05936K

Tanaka H, Nakamura K, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Kajiyama H, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6:36282. doi: 10.1038/srep36282. PMID: 27824103; PMCID: PMC5099972.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001 Oct;65(10):1028-37.

Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res*. 2006 Sep;85(9):834-8. doi: 10.1177/154405910608500911. PMID: 16931867

Teshome A, Muche A, Girma B. Prevalence of dental caries and associated factors in east africa, 2000-2020: systematic review and meta-analysis. *Front Public Health*. 2021 Apr 29;9:645091. doi: 10.3389/fpubh.2021.645091. PMID: 33996722; PMCID: PMC8116500.

VON Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann KD. Plasma medicine: a field of applied redox biology. *In Vivo*. 2019 Jul-Aug;33(4):1011-26. doi: 10.21873/invivo.11570. PMID: 31280189; PMCID: PMC6689367.

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013 Apr;28(2):83-101. doi: 10.1111/omi.12012. Epub 2012 Dec 17. PMID: 23253299; PMCID: PMC3600090.

Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med.* 2016 Jun;37(6):1594-600. doi: 10.3892/ijmm.2016.2550. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27082817.

Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res.* 2018;52(1-2):102-12. doi: 10.1159/000481833. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29262404; PMCID: PMC5828948.

Xu X, Chen F, Huang Z, Ma L, Chen L, Pan Y, et al. Meeting report: A close look at oral biofilms and microbiomes. *Int J Oral Sci.* 2018;(10):1–5.

Yamazaki H, Ohshima T, Tsubota Y, Yamaguchi H, Jayawardena JA, Nishimura Y. Microbicidal activities of low frequency atmospheric pressure plasma jets on oral pathogens. *Dent Mater J.* 2011;30(3):384-91. doi: 10.4012/dmj.2010-190. Epub 2011 May 20. PMID: 21597211.

Yang B, Chen J, Yu Q, Li H, Lin M, et al. Oral bacterial deactivation using a low-temperature atmospheric argon plasma brush. *J Dent.* 2011 jan;39(1):48-56.

Yang R, Argimon S, Li Y, Zhou X, Caufield PW. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. *J Microbiol Methods.* 2010 aug;82(2):163-9.

Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012;57(8):1048-53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.05.012.

Yang Y, Zheng M, Yang Y, Li J, Su Yong-Fei, Li He-Ping , et al. Inhibition of bacterial growth on zirconia abutment with a helium cold atmospheric plasma jet treatment. *Clin Oral Investig.* 2020 Apr;24(4):1465-77. doi: 10.1007/s00784-019-03179-2

Yoshihara K, Nagaoka N, Nakamura A, Hara T, Hayakawa S, Yoshida Y, et al. Three-dimensional observation and analysis of remineralization in dentinal caries lesions. *Sci Reports*. 2020;10:4387. doi: 10.1038/s41598-020-61111-1