



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Caroline Coradi Tonon

Terapias alternativas para controle in vitro de biofilme periodonto-patogênico

Araraquara

2020

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/02/2022.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Caroline Coradi Tonon

Terapias alternativas para controle in vitro de biofilme periodonto-patogênico

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Implantodontia

Orientador: Denise M. Palomari Spolidorio

Araraquara

2020

Tonon, Caroline Coradi

Terapias alternativas para controle in vitro de biofilme
periodonto-patogênico / Caroline Coradi Tonon.-- Araraquara:
[s.n.], 2020

92 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari
Spolidorio

1. Biofilmes 2. Nanopartículas 3. Ozônio I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Caroline Coradi Tonon

Terapias alternativas para controle in vitro de biofilme periodonto-patogênico

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontologia

Presidente e orientador Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

2º Examinador Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

3º Examinador Profa. Dra. Erica Dorigatti de Avila

4º Examinador Profa. Dra. Cristiane Duque

5º Examinador Profa. Dra. Telma Bedran

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.

DADOS CURRICULARES

Caroline Coradi Tonon

NASCIMENTO: 07/08/1990 – Jaú – SP

FILIAÇÃO: Ana Marcia Coradi Tonon e Luiz Fernando Tonon

1998 – 2005: Ensino Fundamental

2006 – 2008: Ensino Médio

2009 – 2013: Ensino Superior – Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2014 – 2016: Mestrado em Odontologia, Área de concentração Biologia Crânio Facial e Biomateriais, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2015 – 2016: Especialização em Implantodontia pela Associação Brasileira de Odontologia de Araraquara.

2016 – Atual: Doutorado em Odontologia, Área de concentração Implantodontia - Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2018 – 2020: Visiting Scholar - Department of Cariology, Operative Dentistry and Dental Public Health – Indiana University School of Dentistry – IUPUI – Indianapolis – IN – EUA.

À Deus,

Pela fé, esperança e força concedida e por ter guiado meus passos para que chegassem a este momento.

Aos meus pais,

Ao meu pai, Luiz Fernando, que não está mais aqui comigo, mas tenho certeza de que estaria muito orgulhoso de me ver alcançar esta etapa.

À minha mãe, Ana Marcia, meu exemplo e inspiração na vida. As palavras são poucas para expressar tamanho amor e admiração que tenho por vocês, que me ensinaram e me inspiraram a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida. Por sempre me colocarem em primeiro lugar e buscar o melhor para mim, me dando a oportunidade de realizar meus sonhos. Obrigada pelo apoio incondicional, amizade, carinho e paciência. Vocês são minha base e força.

Às minhas irmãs,

Karina e Taís, minhas melhores amigas, que me proporcionam momentos de grande alegria e cumplicidade. Agradeço o companheirismo, o apoio, e a paciência e a amor, que mesmo longe, estamos mais unidas que nunca.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio pela orientação, amizade e atenção em todos os momentos. Obrigada pela motivação, na confiança recebida e na liberdade e apoio nas decisões tomadas. Agradeço diariamente pela Mestra paciente que proporcionou anos de trabalho prazerosos e de ótima convivência.

À Profa. Dra. Simone Duarte, por ter confiado em mim e ter me recebido em sua cidade, em seu laboratório e em sua casa como uma filha. Me ensinou muito sobre academia e pesquisa, mas muito mais sobre a vida.

À Profa. Dra. Beatriz Panariello, primeiramente pela amizade e companheirismo que construímos juntas. Por ter me ajudado tanto, mesmo antes de eu chegar em Indianápolis. Por ter aberto a porta de sua casa e me dado um lar para morar, me tratando como uma irmã. Por todos os altos e baixos e experiências que vivemos juntas. Por todos os ensinamentos no meio acadêmico, tanto laboratoriais, quanto científicos. Agradeço a paciência, a atenção e a disposição em me ensinar.

À Profa. Dra. Ana Gossweiler por confiar em mim para realizar as pesquisas e os experimentos e pela oportunidade proporcionada, juntamente com a profa. Simone, de continuar mais um tempo na minha segunda casa que é Indianapolis.

Aos amigos do Brasil Ester Bordini, Patricia Maquera, Vivan Telaroli, Juliana Pirola, José Antônio, Dania Ramadan que fizeram meus dias na faculdade e no laboratório serem mais animados e alegres.

Aos meus amigos dos Estados Unidos Beatriz Panariello, Adaias Matos, Savio Bezerra, Alan Carneiro, Victor Motta, Helena Duarte. Definitivamente esse tempo que vivi em Indianapolis não seria o mesmo sem vocês compartilhando tantas experiências, dificuldades, mas principalmente momentos incríveis de alegria.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” e à Indiana University School of Dentistry, onde tive a honra de estudar e trabalhar.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE. Código de financiamento: 88881.188661/2018-01

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/10836-2) pelo apoio financeiro com Auxílio Pesquisa, essencial para realização dessa pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, José Alexandre e Cristiano pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos.

Aos funcionários da Biblioteca por estarem sempre dispostos a nos ajudar

Às secretárias do Departamento de Fisiologia e Patologia, Silvana e Carla por nos atender sempre com muita eficiência.

Aos funcionários da portaria e seguranças por fazerem das minhas inúmeras entradas e saídas, inclusive aos de finais de semana e feriado, sempre “Bem-Vindas”.

E à todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Tonon CC. Terapias alternativas para controle in vitro de biofilme periodonto-patogênico [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

O biofilme bacteriano persistente sobre a superfície do implante é o fator etiológico mais comum para peri-implantite, e os tratamentos antimicrobianos disponíveis buscam reduzir a carga microbiana e eliminar a inflamação da mucosa peri-implantar. Terapias alternativas envolvendo produtos naturais e nanobiotecnologia abrem novas perspectivas para controlar e reduzir a carga microbiana. O curcumin é um polifenol natural com propriedades terapêuticas eficazes como anti-inflamatória, quimioterápica, anti-oxidante, anti-HIV e antimicrobiana sendo um bom candidato para uso na nanobiotecnologia. Além de seus efeitos diretos, o curcumin tem sido avaliado como um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica. As nanopartículas poliméricas associadas aos produtos naturais apresentam um papel promissor no controle de biofilmes, podendo ser consideradas como uma nova forma de prevenir e/ou tratar infecções. Atualmente, a ozonioterapia vem sendo cada vez mais utilizada na odontologia com resultados positivos no tratamento de doença periodontal e peri-implantar. Possui ação antimicrobiana, e contribui para diminuir os sinais da inflamação oral. Assim, os objetivos do presente estudo foram: a. sintetizar e caracterizar nanopartículas poliméricas carregadas com Curcumin; b. avaliar seu efeito antimicrobiano com e sem fotoativação, sobre culturas planctônicas e biofilmes de *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*; c. avaliar o potencial citotóxico sobre queratinócitos orais; d. investigar o efeito antibiofilme da ozonioterapia no mesmo modelo de biofilme anaeróbico. Nanopartículas (NP) foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação usando poliprolactona como polímero. A curcumina-NP teve suas características físico-químicas avaliadas e foi comparada à curcumina livre como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica em biofilmes microbianos. O efeito citotóxico da curcumina-NP foi avaliado sobre células orais normais imortalizadas (NOK-Si). A curcumina-NP mostrou atividade antibiofilme e não foi citotóxica quando fotoativada por luz azul. Para avaliar o efeito antimicrobiano da ozonioterapia, biofilmes simples e multi-espécies foram formados sobre superfícies de titânio e tratados com diferentes concentrações de solução salina ozonizada e avaliados por Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM). A solução salina ozonizada mostrou atividade antibiofilme reduzindo, principalmente, a viabilidade de *P. gingivalis* em biofilmes simples e multi-espécies. Em conclusão, ambas as terapias estudadas possuem atividade antibiofilme sendo candidatas promissoras para o tratamento de doenças peri-implantares.

Palavras chave: Biofilmes. Nanopartículas. Ozonio.

Tonon CC. Alternative therapies to control in vitro periodontal-pathogenic biofilm [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

The persistent bacterial biofilm on the implant surface is the most common etiological factor for peri-implantitis, and the available antimicrobial treatments seek to reduce the microbial load and eliminate inflammation of the peri-implant mucosa. Alternative therapies involving natural products and nanobiotechnology open new perspectives to control and reduce the microbial load. Curcumin is a natural polyphenol with effective therapeutic properties such as anti-inflammatory, chemotherapy, anti-oxidant, anti-HIV and antimicrobial and is a good candidate for use in nanobiotechnology. In addition, curcumin has been evaluated as a photosensitizer for photodynamic therapy. The polymeric nanoparticles associated with natural products have a promising role in the control of biofilms, and can be considered as a new way to prevent and/or treat infections. Ozone therapy is currently being increasingly used in dentistry with positive results in the treatment of periodontal and peri-implant disease. It has antimicrobial action, and helps to reduce the signs of oral inflammation. Thus, the objectives of the present study were: a. synthesize and characterize polymeric nanoparticles loaded with Curcumin; b. to evaluate its antimicrobial effects with and without photoactivation on planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus oralis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*; c. to evaluate its cytotoxic potential on oral keratinocytes; d. to investigate the antibiofilm effect of ozone therapy in the same anaerobic biofilm model. Nanoparticles (NP) were synthesized by the nanoprecipitation method using polyprolactone as a polymer. Curcumin-NP had its physicochemical characteristics evaluated and was compared to free curcumin as a photosensitizer for photodynamic therapy in microbial biofilms. The cytotoxic effect of curcumin-NP was evaluated on immortalized normal oral cells (NOK-Si). Curcumin-NP showed antibiofilm activity and was not cytotoxic when photoactivated by blue light. To assess the antimicrobial effect of ozone therapy, simple and multi-species biofilms were formed on titanium surfaces and treated with different concentrations of ozonated saline and evaluated by Colony Forming Units (UFC mL⁻¹) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The ozonated saline solution showed antibiofilm activity, mainly reducing the viability of *P. gingivalis* in simple and multi-species biofilms. In conclusion, both therapies studied exhibited antibiofilm activity and are promising candidates for the treatment of peri-implant diseases.

Keywords: Biofilms. Nanoparticle. Ozone.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	14
3 PUBLICAÇÃO (ÇÕES).....	15
3.1 Publicação 1.....	15
3.2 Publicação 2.....	51
5 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE	77

1 INTRODUÇÃO

A peri-implantite é considerada uma doença inflamatória que afeta tecidos moles e duros ao redor de implantes osseointegrados¹. Os problemas associados aos implantes vêm aumentando e as consequências, como por exemplo, a peri-implantite é identificada com uma frequência que varia de 1% a 47% na população² e a presença de biofilme bacteriano persistente sobre a superfície do implante é o fator etiológico mais comum para peri-implantite^{1,3}. Imediatamente após a colocação do implante, as superfícies do implante e do abutment são colonizadas por espécies bacterianas tais como *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp, que, ao longo da maturação do biofilme, desenvolvem uma comunidade que inclui outros membros pertencentes aos complexos vermelho, laranja e verde⁴.

Por se tratar de infecção polimicrobiana com predominância de microrganismos anaeróbios^{5,6}, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* são os principais patógenos⁷ e os sinais clínicos são semelhantes aos da periodontite, como sangramento e perda óssea⁸. A presença de microrganismos primários como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis* durante o desenvolvimento de biofilme em superfícies de titânio pode interferir no crescimento e desenvolvimento dos colonizadores secundários (*Fn* e *Pg*), sendo então necessária a presença desses colonizadores primários para o estabelecimento de colonizadores secundários em biofilmes⁴. Devido a isso, os tratamentos disponíveis buscam reduzir a carga microbiana, eliminar a inflamação da mucosa peri-implantar, como também buscam a descontaminação da superfície do implante com a finalidade de preservar o osso de suporte⁹.

Para o tratamento da peri-implantite, pode-se combinar diferentes métodos, incluindo técnicas regenerativas e métodos de descontaminação⁸. Superfícies de implantes de titânio podem ser limpas utilizando-se meios mecânicos (curetas dentais, raspadores ultra-sônicos, procedimentos abrasivos de ar-pó) e/ou químicos (ácido cítrico, H₂O₂, fluoreto estânico, tetraciclina, niocilina, digluconato de clorexidina, e EDTA), geralmente associados a antibióticos locais ou sistêmicos^{8,11,12}. Há grande diversidade de tratamentos e devido à heterogeneidade dos estudos e a variabilidade dos tipos de superfícies de implantes⁹, não parece existir consenso para esse tipo de infecção. Também é importante destacar que alguns desses métodos, como a remoção mecânica e aplicação local de clorexidina, podem danificar as propriedades de superfície dos implantes ou promover a resistência bacteriana¹⁰.

Terapias adjuntas, como utilização de antibióticos locais e sistêmicos, têm sido desenvolvidas para melhorar o prognóstico da peri-implantite e têm mostrado melhores resultados clínicos e microbiológicos, em curto prazo^{1,5}, sendo eficazes no tratamento de infecções orais¹³. A clorexidina possui função bactericida, inibe as atividades glicosídicas e proteolíticas, reduz as atividades das metaloproteinases de matriz de uma variedade de bactérias orais¹⁴. No entanto, evidências sugerem que este composto pode também ter efeitos adversos aos tecidos e células orais, como por exemplo, atividade citotóxica sobre o osso alveolar, células epiteliais gengivais, redução da proliferação de fibroblastos gengivais, produção de colágeno e proteínas e efeitos genotóxicos secundários em células epiteliais¹³. Associada à prática odontológica, resultados mostram que concentrações elevadas de CHX (0,5% - 2% por 10 min) podem conseguir efeito bactericida substancial¹³.

O alarmante problema da resistência a multidrogas (MDR – multi-drug resistance) por bactérias patogênicas obrigou pesquisadores a enfrentar o problema e buscar novas drogas e moléculas na natureza. É reconhecido que as nanopartículas poliméricas apresentam, entre outras propriedades, ação antimicrobiana¹⁵. Com o aumento dos microrganismos resistentes aos antibióticos e consequentemente das infecções provocadas por biofilmes microbianos, as nanopartículas poliméricas associadas a produtos naturais parecem apresentar um papel promissor no controle desses biofilmes que precisam ser mais estudados e pesquisados podendo assim ser considerados como uma nova forma de prevenir e/ou tratar infecções, como a peri-implantite^{15,16}.

A eficácia de um tratamento depende, em grande parte, da técnica pela qual os produtos são entregues a um sistema vivo e à concentração dos mesmos, podendo ser tóxico ou ainda não produzir nenhum benefício terapêutico. Os sistemas de entrega de medicamentos se dedicam geralmente, a aumentar a biodisponibilidade do mesmo em locais específicos do corpo e ao longo de um período de tempo. Dessa forma, abordagens nanotecnológicas estão sendo exploradas e desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade do medicamento a fim de orientar sua ação para o local específico de interesse, tornando sua aplicabilidade uma alternativa eficaz e segura¹⁷.

A nanobiotecnologia possui o potencial de melhorar a distribuição de medicamentos levando ao aumento da eficácia e toxicidade reduzida, o que resulta em grande benefício para os pacientes^{18,19}. Além disso, permite uma melhor

biodegradabilidade e tolerabilidade, liberando o produto aos poucos e, em muitos casos, tornando os medicamentos mais eficazes no tratamento das infecções²⁰.

A nanotecnologia, entre outras definições, é o desenvolvimento da pesquisa e da tecnologia em nível atômico, molecular e macromolecular, para a produção de conhecimentos fundamentais dos fenômenos e dos materiais em nanoescala, possibilitando a criação e o uso de estruturas, dispositivos e sistemas com novas propriedades e funções devido a estes tamanhos. Espera-se que a sociedade seja beneficiada pela fusão dessas duas tecnologias, devido às potenciais aplicações em medicina, odontologia, agricultura, meio ambiente dentre outras áreas.

Dentre a variedade de nanopartículas, os produtos à base de polímeros possuem algumas vantagens em relação ao fornecimento de medicamentos e recentemente o interesse em estudar esses produtos tem aumentado^{26,27}. Praticidade e rapidez na síntese das formulações^{22,28}, além da atividade antimicrobiana aumentada, são propriedades observadas, pois de modo geral, as nanopartículas se apresentam carregadas positivamente quando em pH neutro e, portanto, podem exibir uma forte atração eletrostática pelas cargas negativas presentes na cama externa das bactérias²⁹. A nanotoxicidade nos microrganismos é desencadeada pela indução do estresse oxidativo pelos radicais livres formados, que são chamados de ROS (reactive oxygen singlet), durante a aplicação das nanopartículas³⁰.

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis, são preparadas a partir de ácido polilático, ácido co-glicólico, quitosana e poli- ϵ -caprolactona (PCL), e tem sido amplamente empregados na entrega de drogas devido à sua excelente biodisponibilidade, melhor encapsulamento, capacidade de controlar a liberação de fármacos e propriedades menos tóxicas²⁸. O PCL é um polímero sintético versátil, que foi projetado para possuir biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo extensivamente estudado para entrega controlada de fármacos³¹. Assim, o PCL tem sido usado para encapsular uma variedade de medicamentos com múltiplas aplicações.

Várias abordagens estão disponíveis para a síntese de nanopartículas poliméricas, sendo que a preparação de nanopartículas de PCL carregadas com medicamentos ocorre pelo método de nanoprecipitação, com posterior caracterização físico-química envolvendo tamanho de partícula, polidispersidade, potencial zeta, encapsulamento, determinação de eficiência, avaliação de morfologia por microscopia de varredura e análises térmicas³².

O curcumin é um polifenol denominado [(E,E)-1,7-bis(4- hidroxí-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-ione] natural de coloração alaranjado, extraído do rizoma seco de açafrão *Curcuma longa* Linn. Este pigmento exibe propriedades terapêuticas eficazes não só como droga anti-inflamatória, mas também como quimioterapêutico, anti-oxidante, anti-HIV e antimicrobiano. Assim, o curcumin é um bom candidato para preparar nanopartículas^{16,33}, e, além de seus efeitos diretos, também tem sido avaliado como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica. Possui largo pico de absorção entre 300 a 500 nm e não apresenta efeitos tóxicos em culturas de células e estudos em animais³⁴.

A terapia fotodinâmica envolve três componentes principais: a luz visível, um fotossensibilizador (PS) e moléculas de oxigênio³⁵. O PS é uma substância fotoativável seletiva para células alvo procarióticas e é ativado por luz a um comprimento de onda específico. Com esta ativação, formam-se radicais livres formam-se, tal como espécies de oxigênio reativo (ROS) que têm um efeito tóxico nas células³⁵⁻³⁷. As vantagens da terapia fotodinâmica (PDT) envolvem menores custos, reprodutibilidade, amplo espectro de efeitos antimicrobianos, segurança para o tecido hospedeiro³⁸, além de não causar resistência microbiana³⁹. Os efeitos do curcumin como PS são benéficos (40) e sua atividade antimicrobiana está extensivamente documentada na literatura^{7, 39,41-47}. Essas características e atividades descritas, fazem do curcumin uma substância favorável para o tratamento de periodontite e peri-implantite³³.

Para aplicação na terapia fotodinâmica (PDT), as nanopartículas contendo fotossensibilizador possuem algumas vantagens em relação ao corante livre que incluem: maior massa crítica (pacote concentrado de PS) para a produção local de ROS; capacidade de limitar a célula alvo de bombear o medicamento, reduzindo assim a possibilidade de resistência a múltiplos medicamentos; aumentar a seletividade do tratamento pela entrega localizada de agentes, e não ser imunogênica⁴⁸.

Outra abordagem alternativa aos agentes antimicrobianos ou antissépticos convencionais na supressão de bactérias subgengivais é a inibição do crescimento microbiano alterando a tensão de oxigênio do ambiente subgengival, o qual se mostra altamente anaeróbio⁴⁹. Vários agentes como oxigênio molecular⁵⁰, oxigenação hiperbárica⁵¹ e peróxido de hidrogênio foram testados⁵². Foi demonstrado que a irrigação subgengival repetida de oxigênio em bolsas periodontais profundas não

tratadas previamente resultou numa melhora clínica significativa das condições periodontais⁵³.

O ozônio (O_3) é uma modificação alotrópica da molécula de oxigênio em uma cadeia de três átomos de oxigênio com alto potencial oxidativo. É produzido por eventos naturais como radiação ultravioleta ou descargas elétricas. O gás é instável e é facilmente degradado em oxigênio por oxidação. Devido ao seu alto potencial oxidativo, possui alta afinidade pelas ligações duplas de carbono e pode interagir com muitos compostos orgânicos e inorgânicos⁵⁴. Stoker⁵⁵ relatou o primeiro uso do ozônio na medicina como agente germicida no tratamento de soldado alemão afetado por gangrena gasosa. Desde então, o entendimento da complexidade das ações bioquímicas, metabólicas e imunológicas que o oxigênio / ozônio médico pode ter no corpo humano vai muito além dos efeitos bactericidas.

Metabolicamente, o efeito biológico da ozonioterapia tem sido descrito principalmente como o aumento no uso de glicose no nível celular, melhor metabolismo de proteínas e peroxidação de lipídios insaturados que resultam na produção de produtos de oxidação lipídica (LOPs). Na concentração correta, esses LOPs podem sinalizar a regulação positiva dos mecanismos de reparo tecidual⁵⁶.

O efeito terapêutico do ozônio é determinado pelo método de aplicação e dosagem. O ozônio pode ser administrado como gás (mistura de ozônio e oxigênio), como óleo ozonizado ou como solução ozonizada. Cada via de administração e concentração pode levar a um efeito terapêutico, placebo ou tóxico. Esse efeito terapêutico dependente da dose e do tempo é denominado hormesis⁵⁸.

O uso de gás ozonizado deve seguir diretrizes muito rígidas para evitar a inalação de ozônio, especialmente em altas doses. A unidade brônquio-alveolar tem muito pouca proteção antioxidante, por esse motivo, o ozônio nos pulmões pode produzir estresse oxidativo crônico, o que resulta na liberação de produtos peroxidativos pró-inflamatórios e citocinas⁵⁹.

Atualmente, o ozônio está sendo discutido na odontologia como um possível agente antisséptico alternativo. Seu alto poder antimicrobiano sem o desenvolvimento de resistência a medicamentos tem sido observado na purificação de água e preservação de alimentos. Investigações recentes relataram efeitos antimicrobianos nos patógenos orais das formas gasosa e aquosa do ozônio, e a eficácia do ozônio no tratamento de doenças bucais é atualmente objeto de intensa pesquisa⁶⁰.

5 CONCLUSÕES

1. Curcumin incorporado ou não em nanopartículas poliméricas apresentou atividade antimicrobiana, promovendo efeitos bactericidas e bacteriostáticos em baixas concentrações e, com melhores efeitos quando associados à luz azul. Devido às suas propriedades antimicrobianas e antibiofilme, ambos podem representar uma abordagem promissora para a prevenção e tratamentos de doenças peri-implantares, uma vez que o curcumin mostrou resultados muito semelhantes à clorexidina em relação à atividade antibiofilme. Além disso, quando usado em baixas concentrações, curcumin e curcumin-NP não apresentam citotoxicidade quando não expostos à luz azul ou em períodos curtos de fotossensibilização.
2. A solução salina ozonizada teve seus antimicrobianos confirmados, *in vitro*, em biofilmes simples e multiespécies formados compostos por *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *S. oralis*. Portanto, consideramos a solução salina ozonizada uma terapêutica candidata promissora para a prevenção e tratamento de doenças peri-implantares. Mais estudos devem ser realizados para confirmar sua biossegurança para uso clínico.

REFERÊNCIAS*

1. Mombelli A, Feloutzis A, Bragger U, Lang NP. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline: clinical, microbiological and radiological results. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(4): 287-94.
2. Monje A, Aranda L, Diaz KT, Alarcon MA, Bagramian RA, Wang HL et al. Impact of maintenance therapy for the prevention of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2016; 95(4): 372-9.
3. Mombelli A, Lang NP. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 1998 Jun; 17: 63-76.
4. Manti A, Ciandrini E, Campana R, Dominici S, Ciacchi C, Federici S et al. A dual-species microbial model for studying the dynamics between oral streptococci and periodontal pathogens during biofilm development on titanium surfaces by flow cytometry. *Res Microbiol.* 2016; 167(5): 393-402.
5. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis: a review. *Head Face Med.* 2014 Sep; 10: 34.
6. Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. *Sci Rep.* 2014; 4: 6602.
7. Mahdi Z, Habiboallh G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser Ther.* 2015; 24(2): 103-11.
8. Figuero E, Graziani F, Sanz I, Herrera D, Sanz M. Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis. *Periodontol 2000.* 2014; 66(1): 255-73.
9. Mellado-Valero A, Buitrago-Vera P, Sola-Ruiz MF, Ferrer-Garcia JC. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(6): e869-76.
10. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden FA. Titanium surface alterations following the use of different mechanical instruments: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23(6): 643-58.
11. Norowski PA, Jr., Bumgardner JD. Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 530-43.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Subramani K, Wismeijer D. Decontamination of titanium implant surface and re- osseointegration to treat peri-implantitis: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012; 27(5): 1043-54.
13. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(2): 308-17.
14. Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by chlorhexidine: synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21(4): 212-7.
15. El-Sherbiny IM, El-Shibiny A, Salih E. Photo-induced green synthesis and antimicrobial efficacy of poly (varepsilon-caprolactone)/curcumin/grape leaf extract-silver hybrid nanoparticles. *J Photochem Photobiol B*. 2016; 160: 355-63.
16. El Khoury E, Abiad M, Kassaify ZG, Patra D. Green synthesis of curcumin conjugated nanosilver for the applications in nucleic acid sensing and anti-bacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 127: 274-80.
17. Charman WN, Chan HK, Finnin BC, Charman SA. Drug delivery: a key factor in realising the full therapeutic potential of drugs. *Drug Development Research*. 1999; 46(3-4): 316-27.
18. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*. 2001; 70(1-2): 1-20.
19. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004; 100(1): 5-28.
20. Sun L, Stout DA, Webster TJ. The nano-effect: improving the long-term prognosis for musculoskeletal implants. *J Long Term Eff Med Implants*. 2012; 22(3): 195-209.
21. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine*. 2008; 3(2): 133.
22. Abdollahi S, Lotfipour F. PLGA-and PLA-based polymeric nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Biomed Int*. 2012; 3: 11-6.
23. Fonseca-Santos B, Gremião MPD, Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*. 2015 Aug; 10: 4981.

24. Luiza Ribeiro de Souza A, Priscila Kiill C, Kolenyak dos Santos F, Marielli da Luz G, Rocha e Silva H, Chorilli M et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment. *Current Nanoscience*. 2012; 8(4): 512-9.
25. Rillo Sato M, Bento da Silva P, Alves de Souza R, Cristina dos Santos K, Chorilli M. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. *Curr Top Med Chem*. 2015; 15(4): 287-97.
26. Deng X, Liang Y, Peng X, Su T, Luo S, Cao J, et al. A facile strategy to generate polymeric nanoparticles for synergistic chemo-photodynamic therapy. *Chem Commun (Camb)*. 2015; 51(20): 4271-4.
27. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev*. 2015; 115(4): 1990-2042.
28. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 75(1): 1-18.
29. Thill A, Zeyons O, Spalla O, Chauvat F, Rose J, Auffan M et al. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli* : physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environ Sci Technol*. 2006; 40(19): 6151-6.
30. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Rojo T et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*. 2012; 30(10): 499-511.
31. Dash TK, Konkimalla VB. Poly-small je, Ukrainian-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J Control Release*. 2012; 158(1): 15-33.
32. Abriata JP, Eloy JO, Riul TB, Campos PM, Baruffi MD, Marchetti JM. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Aug; 77: 1196-203.
33. Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Kharazi Fard MJ, Bahador A. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Lasers Med Sci*. 2016; 7(1): 21-5.
34. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen H. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations: studies on curcumin and curcuminoids, XLI. *Pharmazie*. 2010; 65(8): 600-6.
35. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Mima EG, Machado AL, Bagnato VS et al. Photodynamic inactivation of microorganisms present on complete dentures. A clinical investigation. Photodynamic disinfection of complete dentures. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(1): 161-8.

36. Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S, Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(2): 389-95.
37. Calin MA, Parasca S. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. *Lasers in medical science.* 2009; 24(3): 453-60.
38. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
39. Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Kamath V, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sci Biol Med.* 2015; 6(Suppl 1): S102-9.
40. Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2006; 25(1-2): 487-504.
41. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, et al. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. *J Immunol.* 2005; 174(12): 8116-24.
42. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009; 44(6): 751-9.
43. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 58(1): 190-2.
44. Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(2): 324-30.
45. Carvalho LH, D'Avila GB, Leao A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(12): 1070-6.
46. Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2015; 16(1): 1-6.

47. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10(3): 313-9.
48. Koo YE, Fan W, Hah H, Xu H, Orringer D, Ross B, et al. Photonic explorers based on multifunctional nanoplateforms for biosensing and photodynamic therapy. *Appl Opt*. 2007; 46(10): 1924-30.
49. Mettraux GR, Gusberti FA, Graf H. Oxygen tension (pO₂) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol*. 1984; 55(9): 516-21.
50. Hirsch RS, Clarke NG, Townsend GC. The effect of locally released oxygen on the development of plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol*. 1981; 8(1): 21-8.
51. Guentherman RH, Bishop JG, Collings KC, Dorman HL. The effect of increased blood oxygen tensions on induced periodontal disease. *J Periodontol*. 1972; 43(4): 233-6.
52. Wennstrom J, Lindhe J. Effect of hydrogen peroxide on developing plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol*. 1979; 6(2): 115-30.
53. Schlagenhauf U, Horlacher V, Netuschil L, Brex M. Repeated subgingival oxygen irrigations in untreated periodontal patients. *J Clin Periodontol*. 1994; 21(1): 48-50.
54. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozone: a new therapeutic agent in vascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2011; 11(2): 73-82.
55. Stoker G. The Surgical Uses of Ozone. *The Lancet*. 1916; 188(4860): 712.
56. Schwartz A, Martínez-Sánchez G. Ozone therapy and its scientific foundations. *Revista Española de Ozonoterapia*. 2015; 2(1): 199-232.
57. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med*. 2011 May; 9: 66.
58. Schwartz A. Manual de ozonoterapia clínica: medizeus soluciones medicas. Pozuelo de Alercon: Meizeus Soluciones Medicas; 2017.
59. Bocci VA. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arch Med Res*. 2007; 38(2): 265-7.
60. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res*. 2000; 34(6): 498-501.
61. Saini R. Ozone therapy in dentistry: a strategic review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011; 2(2): 151-3.

62. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1): 15-22.
63. de Avila ED, Avila-Campos MJ, Vergani CE, Spolidorio DM, Mollo F de A Jr. Structural and quantitative analysis of a mature anaerobic biofilm on different implant abutment surfaces. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(4): 428-36.
64. Maquera-Huacho PM, Tonon CC, Correia MF, Francisconi RS, Bordini EAF, Marcantonio E, Spolidorio DM, et al. In vitro antibacterial and cytotoxic activities of carvacrol and terpinen-4-ol against biofilm formation on titanium implant surfaces. *Biofouling.* 2018; 34(6): 699-709.