



POTENCIAL FOTOCATALÍTICO E ANTIMICROBIANO SOB LUZ VISÍVEL DE REVESTIMENTO DE TiO₂ DOPADO COM CÁLCIO, FÓSFORO E BISMUTO OBTIDO POR PLASMA ELETROLÍTICO DE OXIDAÇÃO

Lyvia Regina Rafaela Gonçalves Hamparian, Ariane Bezerra Santos, Bruna Egumi Nagay, Valentim Adelino Ricardo Barão
Departamento de Prótese e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Piracicaba, Brasil

Introdução e objetivo

O titânio comercialmente puro (Ticp) e suas ligas geralmente são eleitos como materiais de implantes dentários, devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, resistência à corrosão e osseointegração (Mishnaevsky et al., 2014). Entretanto, o sucesso do tratamento pode ser afetado por complicações (Moy et al., 2005), sendo que a peri-implantite representa uma das principais causas de falhas (Lee et al., 2017). Ela é definida como uma reação inflamatória com perda de osso suporte ao redor do implante, desencadeada pelo acúmulo de biofilme sobre a superfície do titânio (Ti) e pela resposta imune do hospedeiro (Han et al., 2016; Heitz-Mayfield e Lang, 2010). O desenvolvimento do biofilme inicia-se pela adesão de colonizadores iniciais ao titânio, como espécies do gênero *Streptococcus*, que possuem papel importante na adesão de colonizadores secundários (Periasamy et al., 2009).

Dentre os tratamentos preconizados para a remoção do biofilme formado sobre os implantes dentários e controle do processo inflamatório estão incluídos debridamento mecânico, uso de agentes químicos, antibioticoterapia e terapia fotodinâmica (Györgyey et al., 2016; Heitz-Mayfield e Mombelli, 2014). A terapia mecânica não é capaz de remover completamente o biofilme formado nas superfícies dos implantes (Renvert et al., 2008), por isso, o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos é de suma importância para o controle de infecções peri-implantares. Dentro do contexto de procedimentos fotoquímicos, o desenvolvimento de revestimentos fotocatalíticos pode ser uma alternativa para a redução do biofilme formado sobre os tais implantes (Pantaroto et al., 2018). O revestimento com dióxido de titânio (TiO₂) têm sido amplamente utilizado em indústrias ambientais e de tintas para fins fotocatalíticos e antimicrobianos utilizando luz ultravioleta (UV) (Allen et al., 2005). Já para que o TiO₂ tenha efeito sob luz visível, é necessário dopá-lo com elementos como metais e ânions (Kim et al., 2017; Raut et al., 2016), como o bismuto (Bi), por exemplo, que comporta-se de forma não-tóxica e apresenta efeito antibacteriano (Lin et al., 2013; Ratova et al., 2018; Wang et al., 2018). Um estudo de Nagay et al. (2019) demonstrou que o bismuto incorporado em revestimento de TiO₂ via plasma eletrolítico de oxidação (PEO), é biocompatível com fibroblastos gengivais humanos e apresenta resultados promissores como terapia adjunta da peri-implantite, por demonstrar efeito fotocatalítico e antimicrobiano contra biofilme composto de *Streptococcus sanguinis* e *Actinomyces naeslundii* ao ser irradiado sob luz visível por 30 minutos. Neste contexto, o PEO é um processo eletroquímico simples e eficaz para a formação de revestimento de TiO₂ cristalino com incorporação de elementos dopantes sobre a superfície do titânio (Lin et al., 2013; Sridhar et al., 2017). A bioatividade e cristalização do titânio pode ser alcançada pela incorporação de cálcio (Ca) e fósforo (P), presentes na composição óssea, na solução eletrolítica utilizada durante o processo de tratamento por PEO (Beline et al., 2016).

Tendo em vista que revestimentos de TiO₂ dopado com Bi, sintetizado via PEO, possui capacidade fotocatalítica antimicrobiana, para consolidar a utilização desse tratamento de superfície em implantes dentários, notou-se a necessidade do desenvolvimento de novos revestimentos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um revestimento de TiO₂ dopado com Ca, P e Bi na superfície de discos de titânio comercialmente puro (Ticp) via PEO e investigar o potencial efeito fotocatalítico e antimicrobiano deste revestimento na presença e ausência de luz visível.

Materiais e Métodos

Os discos de titânio comercialmente puro (Ticp) (Barão et al., 2012) foram obtidos e após os tratamentos de superfície, foram divididos em: I – Discos de Ticp com superfície polida (Ticp – controle); II – Discos de Ticp + revestimento de TiO₂ via PEO (TiO₂); III – Discos de Ticp + revestimento de TiO₂ via PEO com Bi (Bi-TiO₂); IV – Discos de Ticp + revestimento de TiO₂ via PEO com Bi, Ca e P (Bi,Ca,P- TiO₂).

Para o preparo dos discos de Ticp, as superfícies de todos os discos foram polidas (Barão et al., 2012), sob irrigação (Beline et al., 2016), limpos e secos (Barão et al., 2012). Os discos do grupo controle apenas tiveram a superfície polida, os demais foram revestidos de TiO₂ com Ca, P e Bi via plasma eletrolítico de oxidação (PEO), de acordo com cada grupo. O protocolo adotado seguiu Nagay et al., 2019, Lin et al., 2013 e Marques et al., 2015. Foi feita a caracterização das superfícies pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) (Patelli et al., 2018; Nagay et al., 2019), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (Zitzmann et al., 2008), perfilometria (rugosidade de superfície) (Cordeiro et al., 2017), difração de raios X (DRX) (Marques et al., 2015; Matos et al., 2017), ângulo de contato com a água (molhabilidade) (Marques et al., 2015; Doll et al., 2017) e a atividade fotocatalítica (Akatsu et al., 2013; Nagay et al., 2019).

Também foi realizado o ensaio microbiológico seguindo os seguintes passos: formação da película adquirida sobre os discos previamente à adesão microbiana. Para isso, a saliva foi estimulada e coletada de dois voluntários saudáveis, sem uso de medicamentos (Cavalcanti et al., 2014), que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e que foi previamente submetido

e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP (CAAE 19096919.2.0000.5418). A saliva foi coletada (Guggenheim et al., 2001), misturada e centrifugada (Souza et al., 2019).

Os discos foram posicionadas em placas de cultura de células de 24 poços, irradiados com luz UV (Zhao et al., 2010) e a saliva filtrada foi pipetada em cada poço. As placas foram incubadas, para a formação da película adquirida (Souza et al., 2019); em seguida a viabilidade das células bacterianas de *Streptococcus sanguinis* foi determinada antes do ensaio microbiológico das amostras com os discos controle (Ticp) em condições de ausência de luz e sob irradiação de luz branca visível seguindo o protocolo descrito a seguir; o ensaio fotocatalítico antimicrobiano foi realizado com *S. Sanguinis* crescido em placas de Brain Heart Infusion (BHI) ágar, cujas colônias foram coletada e inoculadas em tubos de BHI caldo (Cordeiro et al., 2018). Em seguida, os tubos foram centrifugados e o precipitado foi ressuspensionado em novo meio BHI caldo (Cordeiro et al., 2018).

Os discos já cobertos por película adquirida foram transferidos para novas placas e foram cobertos com o inóculo ajustado de meio BHI caldo. As amostras foram incubadas para a formação de biofilme sobre as superfícies. As amostras foram lavadas (Cushnie et al., 2009) e transferidas para novas placas de NaCl 0,9% em cada poço. O ensaio fotocatalítico antimicrobiano foi realizado sob as mesmas condições do teste de fotocatalise (escuro e exposto por luz visível) em ambiente com temperatura controlada. De acordo com os resultados de viabilidade bacteriana realizado anteriormente, o tempo de irradiação das bactérias foi de 30 minutos. O teste foi realizado em dois ensaios microbiológicos independentes e dois períodos de adesão bacteriana e formação de biofilme independentes (8 h e 24 h) (n = 6); 4) Análise microbiológica foi feita após a exposição à luz visível, os discos foram transferidos para tubos com NaCl 0,9% e sonificados (Pantaroto et al., 2018). A suspensão de células foi serialmente diluída e a diluição foi semeada em placas de BHI ágar. As placas foram incubadas e foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Com essas etapas finalizadas, foi feita a análise estatística, morfologia, composição química, rugosidade, molhabilidade, cristalinidade, atividade fotocatalítica, adesão bacteriana e formação de biofilme de *Streptococcus sanguinis* sobre os discos, após irradiação ou não, foram avaliadas. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido de Teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

São observadas diferentes morfologias de superfície dos discos tratados se comparado ao grupo controle (Figura 1). O grupo controle apresentou-se mais liso, regular, homogêneo, com sulcos longitudinais resultantes do processo de polimento, enquanto os grupos tratados via PEO (TiO_2 , Bi-TiO_2 e Bi,Ca,P-TiO_2) apresentaram-se mais irregulares e heterogêneos. As micrografias tri-dimensionais de MCVL indicaram a presença de “crateras” caracterizadas por depressões circulares (cor azul), sendo menos notório para o grupo Bi,Ca,P-TiO_2 . Além disso, foi observada menor área superficial para o grupo controle, seguido dos grupos Bi,Ca,P-TiO_2 , Bi-TiO_2 e TiO_2 .

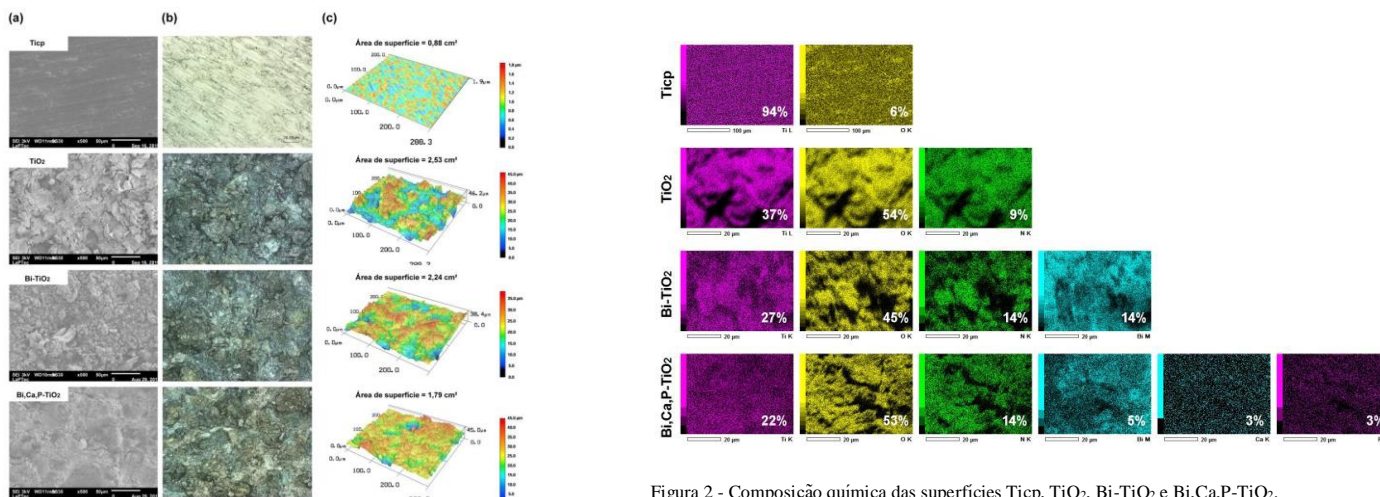


Figura 2 - Composição química das superfícies Ticp, TiO_2 , Bi-TiO_2 e Bi,Ca,P-TiO_2 .

Figura 1 - Morfologia da superfície dos grupos Ticp, TiO_2 , Bi-TiO_2 e Bi,Ca,P-TiO_2 . (a) MEV (500 \times) e imagens (b) bi- e (c) tri-dimensionais (50 \times) de MCVL do Ticp e superfícies tratadas por PEO.

Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Com relação à composição química, pode-se observar na Figura 2 que a superfície de Ticp polido, as porcentagens superficiais de foram 94% de Ti e 6% de O. Na superfície de TiO_2 , foram identificados 37% de Ti, 54% de O e 9% de N, já na superfície de Bi-TiO_2 , identificou-se 25% de Ti, 45% de O, 14% de N e 14% de Bi. Por fim, nas superfícies de Bi,Ca,P-TiO_2 , as observou-se: 22% de Ti, 53% de O, 14% de N, 5% de Bi, 3% de Ca e 3% de P. A partir desta análise, pode-se confirmar que o tratamento de superfície via PEO foi capaz de incorporar os elementos químicos desejados nas superfícies dos discos.

Difração de raios X (DRX)

Os padrões de DRX das superfícies controle e experimentais estão demonstrados na Figura 3. Todos os grupos apresentaram picos de Ti referentes à fase α amorfa (JCPDS 65-3362). As fases cristalinas de TiO_2 , anatase e rutilo, foram identificadas em todas as superfícies tratadas por PEO, com picos característicos de anatase em $\sim 25^\circ$ (JCPDS 83-2243) e rutilo em $\sim 27^\circ$ (JCPDS 73-1765).

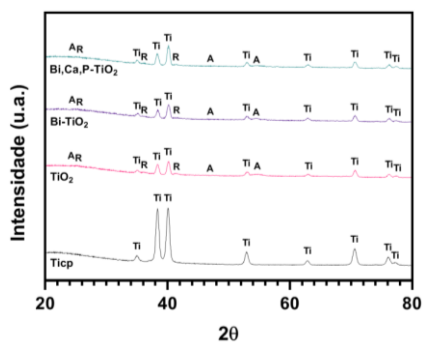


Figura 3 - Padrões de difração de raios X dos grupos Ticp, TiO₂, Bi-TiO₂ e Bi,Ca,P-TiO₂. Ti = titânio, A = Anatase, R = Rutilo.

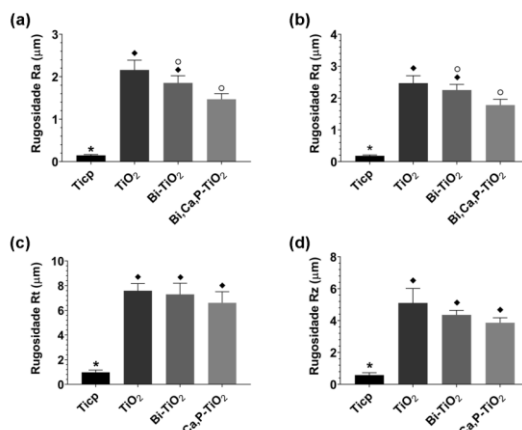


Figura 4 - Rugosidade superficial dos grupos Ticp, TiO₂, Bi-TiO₂ e Bi,Ca,P-TiO₂. (a) Ra; (b) Rq; (c) Rt; e (d) Rz. Símbolos diferentes (*, ♦ e ○) indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$; teste de Tukey).

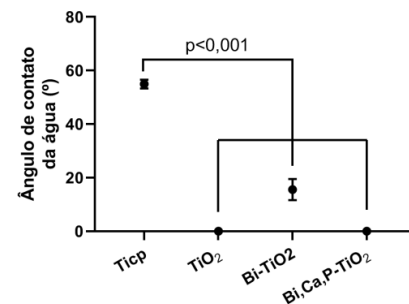


Figura 5 - Ângulo de contato da água com as superfícies controle e experimentais. As barras indicam diferença estatisticamente significante entre Ticp e os grupos tratados com PEO ($p < 0,001$; teste de Tukey).

Perfilometria (rugosidade de superfície)

A Figura 4 apresenta os dados de rugosidade Ra (a), Rq (b), Rt (c) e Rz (d) das superfícies controle e experimentais. Observa-se que o Ticp apresentou valores médios de todos os padrões de rugosidade estatisticamente menores quando comparado aos grupos tratados com PEO ($p < 0,001$). Além disso, com relação aos dados de rugosidade Ra e Rq, a superfície de Bi,Ca,P-TiO₂ apresentou valores estatisticamente menores quando comparada à superfície de TiO₂ ($p = 0,010$), bem como apresentou-se menos rugosa em relação ao grupo Bi-TiO₂, contudo sem diferença estatística.

Ângulo de contato com a água (molhabilidade)

A molhabilidade foi analisada a partir do ângulo de contato formado pela água com as superfícies controle e experimentais (Figura 5). O Ticp apresentou maior valor de ângulo de contato com a água ($\Theta_w = 55^\circ$), diferindo estatisticamente dos grupos tratados com PEO ($p < 0,001$). O grupo Bi-TiO₂ apresentou ângulo de contato com a água de $\Theta_w = 16^\circ$. As superfícies de TiO₂ e Bi,Ca,P-TiO₂ foram capazes de absorver a gota de água imediatamente após o gotejamento, impossibilitando a medição do ângulo de contato. Decorrente a esse fato, assume-se que o ângulo Θ_w foi zero, caracterizando-as como superfícies super-hidrofílicas.

Atividade fotocatalítica

O potencial fotocatalítico foi avaliado pela degradação do alaranjado de metila (AM) em função do tempo de exposição à luz visível (Figura 6). Observa-se que o grupo controle não apresentou atividade fotocatalítica na presença de luz; tampouco no escuro. A medida que o tempo progride de 0, 15, 30, 60, 90, 120 à 180 minutos, a atividade fotocatalítica aumenta progressivamente para todos os grupos tratados via PEO (Figura 6a). O grupo Bi-TiO₂ apresentou maior atividade fotocatalítica mesmo após 180 minutos de exposição à luz, seguido pelo grupos Bi,Ca,P-TiO₂ e TiO₂. Especificamente, no período de 30 minutos (Figura 6a'), pode-se observar maior porcentagem significativa de atividade fotocatalítica dos grupos Bi-TiO₂ ($p = 0,013$) e Bi,Ca,P-TiO₂ ($p = 0,049$) quando comparados ao grupo controle. Com relação à atividade fotocatalítica das superfícies no escuro (Figuras 6b e 6b'), observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,300$).

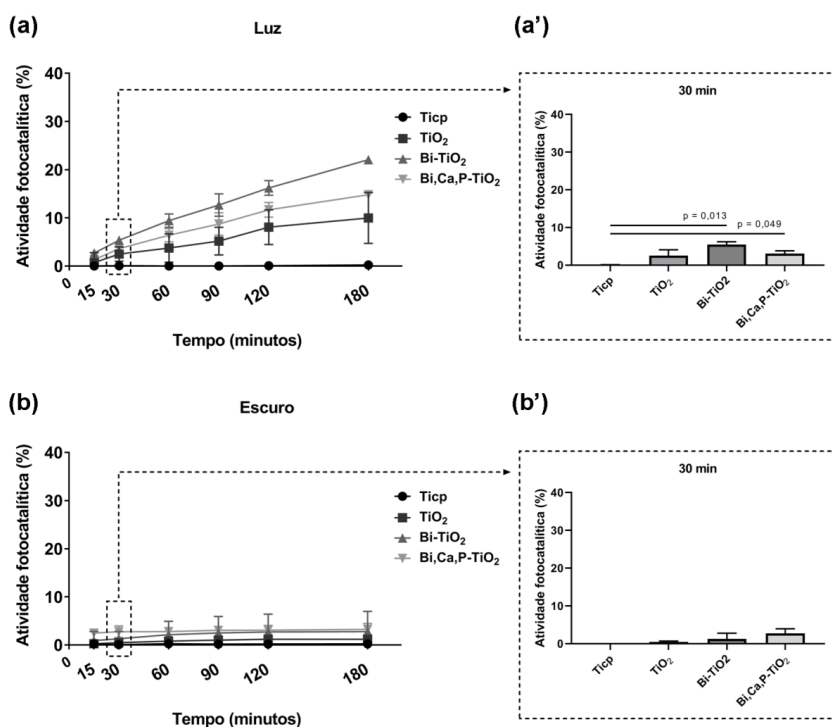


Figura 6 - Atividade fotocatalítica dos grupos Ticp, TiO₂, Bi-TiO₂ e Bi,Ca,P-TiO₂ em função do tempo (minutos) de exposição (a) ou não (b) à luz visível, e após 30 minutos de irradiação com (a') e sem exposição à luz (b'). As barras indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Viabilidade de células bacterianas

A Figura 7 mostra que houve redução bacteriana significativa a partir de 60 minutos de exposição das amostras à luz visível comparado às amostras testadas imediatamente após o período de adesão de 8 horas (0 minutos). Frente a esses resultados, o tempo de 30 minutos de luz foi estabelecido para ser utilizado no ensaio fotocatalítico antibacteriano, visto que esse tempo de exposição permitiu a viabilidade das células bacterianas sem diferença estatística com o tempo 0 minutos.

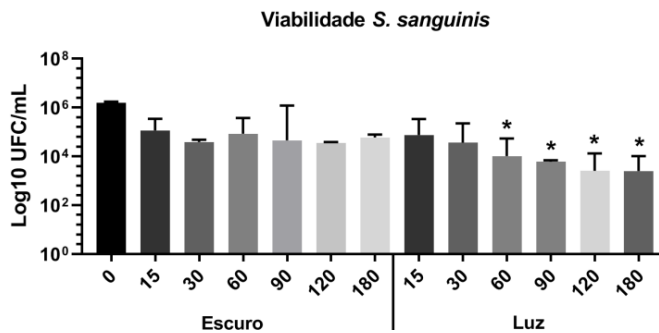


Figura 7 - Viabilidade de *S. sanguinis* (adesão de 8 horas) em função do tempo (minutos) de exposição (luz) ou não (escuro) à luz visível das superfícies de Ticp. * indica diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$; teste de Tukey).

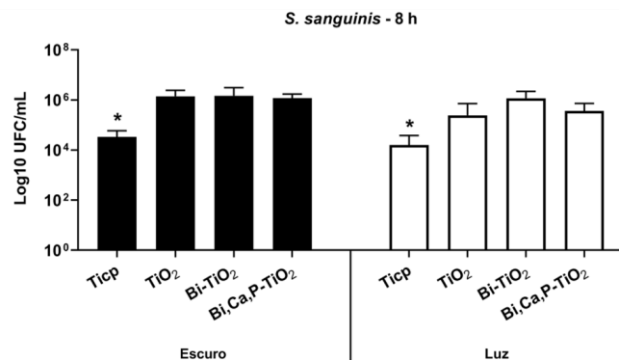


Figura 8 - Número de UFC (\log_{10} UFC/mL) de *S. sanguinis* após 8 horas de adesão bacteriana sobre as superfícies controle e experimentais na presença (luz) ou ausência (escuro) de luz visível. * indica diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,01$; teste de Tukey).

Atividade fotocatalítica antimicrobiana

Com relação aos resultados microbiológicos, os grupos tratados com PEO apresentaram maior adesão de *S. sanguinis* (8 horas) quando comparado ao grupo controle em ambas as condições de escuro e luz ($p < 0,01$) (Figura 8).

Em períodos mais tardios de desenvolvimento do biofilme (24 horas), todos os grupos apresentaram resultados similares em condições de escuro. Em contrapartida, após exposição à luz visível, observa-se a eficácia do grupo Bi,Ca,P-TiO₂ na redução bacteriana de *S. sanguinis* quando comparado aos grupos controle ($p = 0,016$) e TiO₂ ($p = 0,032$). Além disso, observa-se no gráfico de fold change (diferença de \log_{10} UFC/mL de cada grupo entre as condições de escuro e após exposição à luz visível), que houve redução bacteriana de *S. sanguinis* após irradiação por luz visível, sendo que o grupo Bi,Ca,P-TiO₂ apresentou maior redução, seguido dos grupos Bi-TiO₂ e TiO₂, contudo sem diferença estatística. O grupo controle não apresentou redução bacteriana após exposição à luz visível quando comparado à condição de escuro.

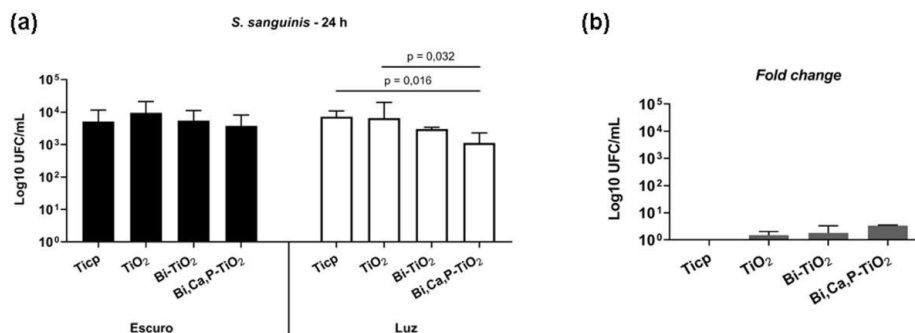


Figura 9 - (a) Número de UFC (\log_{10} UFC/mL) de *S. sanguinis* após 24 horas de formação de biofilme sobre as superfícies controle e experimentais na presença (luz) ou ausência (escuro) de luz visível; (b) Fold change dos grupos controle e experimentais demonstrando a diferença de UFC entre as condições de escuro e luz. As barras indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0,05$; teste de Tukey).

Conclusão

Baseados nos resultados deste estudo in vitro e considerando as limitações do mesmo, pode-se concluir que:

- O revestimento de TiO₂ cristalino dopado com Bi, Ca e P foi sintetizado com sucesso via PEO, apresentando topografia complexa, características superficiais (rugosidade e hidrofobicidade) e atividade fotocatalítica superiores à superfície controle de Ticp polido.
- Bi,Ca,P-TiO₂ apresentou menor área superficial comparado aos demais grupos experimentais e demonstrou redução bacteriana de *S. sanguinis* (24 horas) após 30 minutos de irradiação com luz visível.
- O revestimento de TiO₂ cristalino dopado com Bi, Ca e P desenvolvido neste estudo pode ser considerado uma alternativa de tratamento de superfície para implantes dentários por apresentar elementos bioativos (Ca e P) e propriedades superficiais favoráveis à osseointegração, bem como é fotocatalítico, podendo ser utilizado como forma de tratamento adjuvante da peri-implantite através da sua irradiação com luz visível.

Referências

- Allen NS, Edge M, Sandoval G, Verran J, Stratton J, Maltby J. Photocatalytic coatings for environmental applications. *Photochem Photobiol.* 2005 Mar-Apr;81(2):279-290.
- arão VA, Mathew MT, Assunção WG, Yuan JC, Wimmer MA, Sukotjo C. Stability of cp-Ti and Ti-6Al-4V alloy for dental implants as a function of saliva pH – an electrochemical study. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Sep;23(9):1055-62.
- Beline T, Marques Ida S, Matos AO, Ogawa ES, Ricomini-Filho AP, Rangel EC, et al. Production of a biofunctional titanium surface using plasma electrolytic oxidation and glow-discharge plasma for biomedical applications. *Biointerphases.* 2016 Mar;16(1):011013.

- Cavalcanti IM, Ricomini Filho AP, Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Paes Leme AF, Senna PM, et al. Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*. 2014 Jul;59(7):695-703.
- Cordeiro JM, Beline T, Ribeiro ALR, Rangel EC, da Cruz NC, Landers R, et al. Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants. *Dent Mater*. 2017 Nov;33(11):1244-57.
- Doll K, Fadeeva E, Schaeske J, Ehmke T, Winkel A, Heisterkamp A, et al. Development of laser-structured liquid-infused titanium with strong biofilm-repellent properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Mar 22;9(11):9359-68.
- Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*. 2001 Jan;80(1):363-70.
- Györgyey Á, Janovák L, Ádám A, Kopniczky J, Tóth KL, Deák Á, et al. Investigation of the in vitro photocatalytic antibacterial activity of nanocrystalline TiO₂ and coupled TiO₂/Ag containing copolymer on the surface of medical grade titanium. *J Biomater Appl*. 2016 Jul;31(1):55-67.
- Han A, Li X, Huang B, Tsoi JKH, Matinlinna JP, Chen Z, et al. The effect of titanium implant surface modification on the dynamic process of initial microbial adhesion and biofilm formation. *The International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2016 Mar;69:125-32.
- Han A, Tsoi JKH, Rodrigues FP, Leprince JG, Palin WM. Bacterial adhesion mechanisms on dental implant surfaces and the influencing factors. *The International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2016 Sep;69:58-71.
- Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. *Periodontol* 2000. 2010 Jun;53:167-81
- Heitz-Mayfield LJ, Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29 Suppl:325-45.
- Kim CH, Lee ES, Kang SM, de Josselin de Jong E, Kim BI. Bactericidal effect of the photocatalytic reaction of titanium dioxide using visible wavelengths on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Jun;18:279-83.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017 Jul;62:1-12.
- Lin DJ, Tsai MT, Shieh TM, Huang HL, Hsu JT, Ko YC, et al. In vitro antibacterial activity and cytocompatibility of bismuth doped micro-arc oxidized titanium. *J Biomater Appl*. 2013 Jan;27(5):553-63.
- Marques IDaSV, Cruz NCDa, Landers R, Yuan JCC, Mesquita MF, Sukotjo C, et al. Incorporation of Ca, P, and Si on bioactive coatings produced by plasma electrolytic oxidation: the role of electrolyte concentration and treatment duration. *Biointerphases*. 2015 Oct;10(4):041002.
- Matos AO, Ricomini-Filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-Oliveira BE, de Almeida AB, et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Apr 1;152:354-66.
- Mishnaevsky L, Levashov E, Valiev RZ, Segurado J, Sabirov I, Enikeev N, et al. Nanostructured titanium-based materials for medical implants: modeling and development. *Materials Science & Engineering R: Reports*. 2014 Jul;81(1):1-19.
- Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Jul-Aug;20(4):569-77.
- Nagay BE, Dini C, Cordeiro JM, Ricomini-Filho AP, de Avila ED, Rangel EC, et al. Visible- light-induced photocatalytic and antibacterial activity of TiO₂ codoped with nitrogen and bismuth: new perspectives to control implant-biofilm-related diseases. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 May 22;11(20):18186-202.
- Pantaroto HN, Ricomini-Filho AP, Bertolini MM, Dias da Silva JH, Azevedo Neto NF, Sukotjo C, et al. Antibacterial photocatalytic activity of different crystalline TiO₂ phases in oral multispecies biofilm. *Dent Mater*. 2018 Jul;34(7):e182-e195.
- Patelli A, Mussano F, Brun P, Genova T, Ambrosi E, Michieli N, et al. Nanoroughness, surface chemistry, and drug delivery control by atmospheric plasma jet on implantable devices. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018 Oct;10(46):39512-23.
- Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three- species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Appl Environ Microbiol*. 2009 May;75(10):3250-7.
- Ratova M, Redfern J, Verran J, Kelly PJ. Highly efficient photocatalytic bismuth oxide coatings and their anti- microbial properties under visible light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2018 Dec;239:223-32.
- Raut AV, Yadav HM, Gnanamani A, Pushpavanam S, Pawar SH. Synthesis and characterization of chitosan-TiO₂:Cu nanocomposite and their enhanced antimicrobial activity with visible light. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Dec 1;148:566-75.
- Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of peri-implant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):305-1.
- Souza JGS, Cordeiro JM, Lima CV, Barão VAR. Citric acid reduces oral biofilm and influences the electrochemical behavior of titanium: an in situ and in vitro study. *J Periodontol*. 2019 Feb;90(2):149-58.
- Sridhar S, Arunnellaiappan T, Rameshbabu N, Mika S, Viswanathan A. Solar photocatalytic activity of nitrogen doped TiO₂ coating by micro-arc oxidation. *Surf Eng*. 2017;33(10):779-86.
- Wang R, Lai TP, Gao P, Zhang H, Ho PL, Woo PCY, et al. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo-β-lactamase inhibitors. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-12.
- Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):286-91.