UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA RESTAURADORA

ISABELA BARBOSA QUERO

Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental.

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2019

Isabela Barbosa Quero

Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de Concentração em Dentística.

Orientada: C.D**.** Isabela Barbosa Quero

Orientadora: Profª Drª Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo para reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Quero, Isabela Barbosa

Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental. Ribeirão Preto, 2019.

96 p. : il.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Dentística.

Versão corrigida da Dissertação. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. Biofilme. 2. Laser de Diodo. 3. aPDT. 4. Avaliação microbiológica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Isabela Barbosa Quero

Título: Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Odontologia Restauradora
Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Data da defesa:____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus amados pais, **Maria Rita C V A Barbosa Zuero** e **Marcos Antonio Zuero**, que sempre fizeram de tudo para tornar cada sonho realidade. Não tenho palavras para explicar o tamanho do meu amor por vocês. Obrigada por sempre estarem na retaguarda enquanto trilho o meu caminho sozinha. Obrigada por sempre me porem para cima a cada tombo que eu levei. Vocês me ensinaram a não desistir, me ensinaram a fazer mesmo as coisas que eu não queria ou tinha medo por esforço. Vocês me ensinaram a ter coragem e me jogar no mundo, mesmo ele sendo assustador às vezes. Vocês sempre me ensinaram a me esforçar, batalhar e correr atrás do que eu quero, e é por isso que estou aqui hoje. Mil vezes obrigada por ter feito da nossa casa um lar, o meu porto seguro, um lugar para me amparar e voltar quando fosse preciso. Obrigada por todo o amor, às vezes na forma de um beijo e um abraço ou na forma de uma bronca. Vocês são o meu exemplo de superação.

Aos meus irmãos, **Arthur Barbosa Zuero** e **Manoela Barbosa Zuero**, os maiores amores da minha vida. Vocês sempre torceram por mim me fazem querer ir mais longe e deixá-los orgulhosos. Cada um dos dois, com o seu jeitinho especial, faz com que eu me sinta amada e segura, pois eu sei que, independente de onde eu estiver, vocês vão me proteger e comprar uma briga por mim. Vocês são a minha inspiração e meus maiores modelos. **Arthur**, você me mostra que precisamos ser criativos e correr atrás daquilo que sonhamos, mesmo que a vida nos derrube às vezes. **Ma**, você me faz pensar fora da caixa, me mostra como o mundo pode ser diferente com amor e cada abraço que você me dá faz com que os meus medos vão embora. Obrigada por nunca saírem do meu lado, independente das brigas e dos desentendimentos.

Agradecimentos

Agradecimentos Especiais

À Professora **Regina Guenka Palma Dibb**, que participou da minha caminhada na Odontologia desde o começo. **Re**, não tenho como explicar o quão importante você é para mim. Além de ser sua orientada você me acolheu como uma filha, cuidando de mim e me protegendo mesmo estando longe. Eu tenho muito a agradecer por ter você na minha vida, por todos os conselhos, lições, ensinamento e mesmo as broncas que você me deu, tudo isso me ajudou a crescer e me tornar a pessoa que sou hoje. Eu tenho muito no que evoluir ainda e espero que você continue ao meu lado nesse trajeto.

Obrigada por cada docinho que você lembrou de trazer, por cada vez que eu entrava na sua sala sem saber o que estava fazendo e você me acolhia com paciência e carinho. Você é uma orientadora muito zelosa, que entende meus dramas antes mesmo de eu entendê-los e tem paciência comigo mesmo quando eu mesma não tenho. Obrigada por transmitir seus conhecimentos da melhor forma possível e me ensinar tanta coisa, desde fazer uma cavidade até uma busca no PubMed.

Re, você me estimula e me faz querer ser mais, aprender mais e buscar mais, tanto na vida profissional quanto na pessoal. Além de ter uma família linda na sua casa com os seus filhos você conseguiu transformar esse ambiente difícil de trabalho em uma família também. E essa é a parte mais importante, ter junto de você pessoas que te querem bem e que estão ao seu lado independente dos problemas. Você é a minha inspiração. Obrigada, mil vezes, por tudo!!!!

À minha queridíssima **Juliana Jendiroba Faraoni!** Minha amiga, irmã, conselheira e companheira de risadas. **Ju**, sem você aqui eu não sei o que seria de mim. Obrigada por todas as vezes em que eu cheguei com um problema, e não foram poucas, e você sentou comigo e resolveu. Obrigada por todas as risadas e por todas as vezes que você me dava um sorriso nos piores

momentos. Obrigada por estar ao meu lado procurando soluções quando a minha vontade era jogar tudo para o alto. Obrigada por torcer por mim e acreditar na minha capacidade, quando eu mesma duvidava. Obrigada por todas as vezes que você me protegeu e se preocupou comigo. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e que vê a vida da forma mais positiva, isso me ajuda muito e me faz querer ser igual à você!

E como já diria a nossa filósofa mirim "Essa vida não está nada fácil, mas dá, a gente consegue" e nós conseguimos juntas! Sou muito grata por nossos caminhos terem se cruzados e quero te levar para sempre na minha vida.

Ao professor **Sérgio Luiz de Souza Salvador**, que foi a minha base nessa área de microbiologia. Muito obrigada, professor! O senhor sempre teve paciência para me explicar e ensinar essa parte difícil e desconhecida. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório. Obrigada por sempre me receber com um bom-humor contagiante e um sorriso no rosto. Obrigada por cada vez que o senhor comemorou comigo um novo voluntário. O senhor é dessas pessoas raras que torcem pelos outros pelo simples fato de querer-lhes bem. Fico muito feliz de ter tido a oportunidade de trabalhar com o senhor. Espero que nossa parceria continue! Muuito obrigada por tudo!!

Agradecimentos

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan, e do vice-reitor, Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto** da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual diretora, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, e do vice-diretor, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À **Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho e do suplente da coordenação Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto.

À **CNPq**, pela bolsa concedida.

À **Marina Constante Del Arco Mastrange**, minha salvadora! **Ma**, obrigada por tudo que você fez por mim nesse laboratório (e olha que não foi pouco). Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e por todas as diluições que você adiantou!

Aos **Professores do Departamento de Odontologia Restauradora**, por todos os ensinamentos transmitidos e as lições aprendidas.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil na área de Ortodontia **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani** e **Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto** por me receberem tão bem na clínica da disciplina. Em especial à **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani**, que me cedeu espaço na sua clínica para o desenvolvimento da minha pesquisa, mesmo falando que os seus pacientes não tinham biofilme. **Berna**, obrigada pela consideração todas as vezes que você me ajudou e por todo o incentivo para continuar.

Aos **Funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora**, por toda a ajuda e disposição. Em especial ao **Carlos Freitosa dos Santos**, por toda a ajuda, paciência e atenção que você teve comigo nesses dois anos.

À **Seção de Pós-graduação** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo na pessoa de Mary Possani Carmessano, pela atenção e por estar sempre à disposição.

À **todos os meus amigos** que estão ao meu lado. Obrigada por torcerem por mim e estarem junto comigo nas horas de rir e de chorar. Obrigada à todos que se solidarizaram a procurar os pacientes comigo e àqueles que ficariam sem escovar os dentes em prol da pesquisa.

Ao meu melhor amigo, **Hugo Vetorasso Purini**, meu grande amor. Você nunca me deixou desistir e sempre me amparou nas horas difíceis. Obrigada por todas as vezes que você aguentou o meu mau-humor sem reclamar. Por todas as vezes que você me ajudou quando as coisas estavam

pegando fogo. Por todos os dias que eu chegava cansada e você fazia de tudo para me agradar. Por todas as conversas bobas quando eu não queria falar sobre os meus problemas. Por toda paciência e compreensão. Obrigada por estar ao meu lado nessa caminhada.

*À **Minha Família** amada, que nunca deixou de acreditar em mim. Obrigada por todos os abraços e por todos os chacoalhões que vocês me deram. Obrigada por serem meu porto seguro. Sem vocês essa caminhada seria mais difícil e sem graça.*

Epígrafe

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original"

Oliver Wendell Holmes

Sumário

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 37

2. PROPOSIÇÃO 47

3. MATERIAl E MÉTODOS 51

4. RESULTADOS 63

5. DISCUSSÃO 69

6. CONCLUSÃO 79

REFERÊNCIAS 83

ANEXO 91

Resumo

Resumo

QUERO, I. B. Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental. Ribeirão Preto, 2018. 94p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

O acúmulo de biofilme sobre a superfície dental pode gerar diversas complicações para a cavidade bucal, além de acometer a saúde geral do indivíduo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a capacidade do emprego da irradiação com laser de Diodo no biofilme bacteriano dental maduro na inativação dos micro-organismos presentes. Foram selecionados 12 voluntários com acúmulo de biofilme sobre a superfície vestibular dos dentes. O presente estudo foi fatorial, com período de realização da irradiação em 2 níveis (controle/sem irradiação e após a irradiação) e o tipo de tratamento em 2 níveis (irradiação de laser de Diodo com 660 e 970 nm). Foram testados 4 sítios de cada voluntário, divididos aleatoriamente em 2 grupos/4 subgrupos experimentais. Inicialmente, foram coletadas 2 amostras iniciais do biofilme. Cada amostra foi inserida em um tubo Eppendorf correspondente contendo o fluido de transporte reduzido (RTF). Em seguida, previamente à irradiação, foi aplicada uma dose do fotossensibilizador azul de metileno sobre toda a superfície vestibular com um tempo de pré-irradiação de 5 minutos. A irradiação foi realizada sobre a superfície vestibular na forma de varredura. As amostras irradiadas foram coletas e dispersadas em um tubo Eppendorf correspondente. As amostras foram diluídas em RTF e semeadas em meio de cultura MM10 Sacarose Ágar em duplicata. Após 7 dias em anaerobiose à 37°C, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) de cada amostra sobre a superfície da placa. Foi realizada a comparação da quantidade de UFC/mg antes e após os tratamentos. Os dados foram analisados pelos testes de Wilcoxon e Mann Whitney com $\alpha=0,05$. Pode-se observar que ambos os tratamentos realizados foram capazes de diminuir estatisticamente ($p<0,05$) o número de micro-organismos presentes no biofilme bacteriano maduro, não havendo diferença significante entre eles. Conclui-se que os dois comprimentos de onda do laser de diodo apresentaram comportamentos similares, promovendo uma ação bactericida sobre o biofilme dental maduro.

Palavras-chave: Biofilme; Laser de Diodo, Terapia Fotodinâmica; Avaliação Microbiológica.

Abstract

Abstract

QUERO, I. B. Use of Photodynamic Therapy in the Microbiological Remission of Biofilms Adhered to the Dental Surface. Ribeirão Preto, 2018. 94p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo.

Biofilm is a highly structured community capable of causes many bacterial diseases that affects health and quality of life, causing several clinical conditions, such as dental caries. Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vivo* the bactericidal ability of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against a complex biofilm. It was selected twelve volunteers with biofilm accumulation over enamel surface. The presente study was factorial, the irradiation time was diveded in 2 levels (control/without irradiation and after irradiation) and the treatment in 2 levels too (irradiation with a Diode laser with 660 nm and 970 nm). Each volunteer had 4 samples tested, divided randomly into 2 groups/4 subgroups. Before treatments, 2 sample of complex biofilm were collected and stored in reduced transport fluid (RTF) to maintain the viability of the microorganisms. Thereafter, another two corresponding areas with biofilm were irradiated with Diode laser, according to their experimental groups. Which sample was collected and stored in RTF. The biofilm samples from all the experimental groups were diluted in the same RTF as they were stored. All of the samples diluted were cultured in culture media MM10 Sucrose Agar and incubated in anaerobic atmosphere at 37°C. After 7 days, the samples were analysed and the total of colony-forming units (CFU) was determined. A comparison of the CFU/mg of samples before and after treatments was made. Data were analysed using Wilcoxon and Man Whitney test ($\alpha=0.05$). Both treatments were able to statistically reduce ($p<0.05$) the number of microrganisms presentes at a complex biofilme, so there were no significant differences between them. The conclusion is that both wavelength of diode laser behaved in similar ways, acting as a bactericidal agent on a complex oral biofilm.

Key-words: Biofilm; Diode Laser; aPDT; Microbiological Evaluation.

1. Introdução

1. Introdução

A microbiota da cavidade bucal é composta por mais de 700 espécies bacterianas (1,2,3), onde sua grande maioria está organizada na forma de biofilme. Essa microbiota é adquirida ao longo da vida; ao nascimento a cavidade bucal dos recém-nascidos é estéril, e através do contato com a mãe, alimentos, leite e água contaminados há a formação da microbiota residente (2). Os micro-organismos presentes na cavidade bucal à coloniza de maneira transitória, e a microbiota residente se origina através dos micro-organismos capazes de se instalar de maneira definitiva (2). Isso pode ser explicado devido ao fato da cavidade bucal não ser um ambiente uniforme, sendo influenciado por fatores físico-químicos específicos, além de sua diversidade anatômica (2).

Previamente à colonização bacteriana há a formação de uma estrutura denominada película adquirida. Ela é formada sobre a superfície dental, mesmo após vinte segundos da profilaxia realizada no consultório, sendo classificada como uma camada acelular que pode ser colonizada pelos micro-organismos presentes na saliva (2). O biofilme é organizado sobre a superfície dessa película através da aderência irreversível de micro-organismos unicelulares envoltos por uma matriz de polissacarídeos extracelular, podendo ser formado a partir de uma ou diversas espécies bacterianas (2). Pode também infiltrar-se na região subgengival através de colonizações de outros grupos bacterianos. Sua aderência é específica em superfícies duras, como o esmalte dental, não sendo possível o desenvolvimento em mucosa devido à sua constante descamação (2). Ainda, alguns materiais odontológicos comumente utilizados, como resina composta, amálgama, coroas cerâmicas e metálicas e aparelhos ortodônticos, tendem a possibilitar um maior crescimento do biofilme do que as próprias estruturas dentais (3).

Classificado como o primeiro colonizador da película adquirida algumas espécies do gênero estreptococos são responsáveis na formação do biofilme. Nessa etapa inicial ocorre a especificação da colonização bacteriana, onde as bactérias com pouca afinidade pela microbiota local são eliminadas pelo fluxo salivar (2). Durante sua maturação há a formação de colônias que são embebidas em uma matriz extracelular, sendo influenciadas pelo meio em que

estão inseridas (1). Para que esse material seja danoso deve ocorrer um desequilíbrio no ecossistema do biofilme, podendo favorecer o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Algumas espécies de estreptococos do grupo mutans (*S. mutans e S. sobrinus*) são considerados uns dos micro-organismos mais cariogênicos e os principais iniciadores de doenças da cavidade bucal (4). A cárie é considerada uma doença crônica e infecciosa, para seu desenvolvimento é necessária uma interação no tempo certo entre um hospedeiro suscetível, micro-organismo cariogênicos e uma dieta rica em sacarose e carboidratos fermentáveis (2,5).

O biofilme é caracterizado como cariogênico quando há o acúmulo de bactérias na superfície dental enredadas em uma matriz rica em exopolissacarídeos (6). Quando a matriz envolve as colônias há a presença de um pH baixo em seu interior, sendo muito resistentes à neutralização, formando um ambiente extremamente ácido (6). Como consequência dessa diminuição do pH e mudança na homeostase local da microbiota residente, ocorre uma dissolução química local da superfície dental (7). Isso se dá devido à eventos metabólicos que causam uma desmineralização dos tecidos duros dentais. Quando o organismo não consegue neutralizar o pH e ativar a remineralização se instala um processo infeccioso. A doença cárie é uma das principais complicações gerada pelo acúmulo de biofilme bucal, e afeta apenas a estrutura dental, não envolvendo tecidos adjacentes. Quando não tratadas, as lesões de cárie evoluem levando a perda de grande parte da estrutura mineralizada dos dentes, podendo levar a quadros de pulpite e necrose e destruição irreversível do dente, além de ser um foco infeccioso (7).

Além do aparecimento de lesões cariosas, o acúmulo do biofilme pode gerar complicações periodontais. Para seu desenvolvimento é necessária à presença de biofilme na região subgengival. Esse material substitui a microbiota residente da superfície dental e células epiteliais por outra comunidade de micro-organismos (2). As doenças periodontais envolvem o tecido gengival, ligamento periodontal, osso alveolar, cemento e tecidos de sustentação do dente, manifestando-se na forma de gengivite e periodontite. As bactérias patogênicas responsáveis pelo desenvolvimento da doença não conseguem atuar sozinhas, elas precisam de uma resposta imunoinflamatória

do hospedeiro. Frente às toxinas produzidas pelas bactérias, ocorre a ativação de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares que produzem mediadores inflamatórios e outras citocinas (8). Esses mediadores produzidos pelo organismo do hospedeiro são os responsáveis pelo aparecimento dos sinais e sintomas da doença (8). Com o avanço progressivo da destruição dos tecidos de suporte o hospedeiro pode vir a perder o elemento acometido pela doença caso não ocorra nenhum tipo de intervenção. Acredita-se que a infecção crônica causada pela doença periodontal pode estar relacionada a outras doenças fora da cavidade bucal, como a doença cardiovascular aterosclerótica (9). Essa contaminação ocorre através do contato bacteriano com a corrente sanguínea.

Outa consequência do acúmulo de biofilme é a periimplantite. Com a viabilização do uso de implantes osseointegrados houve um aumento do número de peças instaladas, porém, acompanhando esse crescimento, o surgimento de doenças periimplantares se tornou cada vez mais comum (10). Não se sabe ao certo quanto a iniciação da doença, mas pode-se afirmar que o principal causador é de origem bacteriana, associado com fatores de risco (11). Apesar de todos os tratamentos implementados, nenhum se provou totalmente eficaz contra a inflamação tecidual, sendo, atualmente, a melhor solução a prevenção (10).

Além do envolvimento com a cavidade bucal, o acúmulo de biofilme pode gerar diversas complicações em todo o organismo (12-14). Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, entubados e que fazem uso de ventilação mecânica estão sujeitos a maiores infecções. Isso ocorre devido ao acúmulo de biofilme bucal por negligência da higiene, junto com sua colonização por patógenos respiratórios provenientes do ambiente hospitalar (12,15,16). Visto os danos causados, é recomendada a manutenção da saúde bucal em centros de UTI para evitar uma disseminação bacteriana, principalmente em casos de pacientes imunossuprimidos.

Diversas condutas têm sido estabelecidas para desorganizar, remover e inativar os micro-organismos. É considerado padrão ouro a remoção mecânica através da escovação com dentifrício fluoretado e fio dental, porém nem todo

paciente consegue manter um controle adequado. Essa falha na higienização pode ser causada por diversos fatores. Pode estar envolvido a falta de instrução ao paciente, nível socioeconômico, limitações mecânicas, idade, sensibilidade bucal, entre outros. Frente à esse quadro, o paciente deve procurar um profissional capacitado para remoção do biofilme e receber instruções sobre a higiene bucal. No consultório odontológico é realizada a profilaxia para desestruturar e remover as colônias bacterianas, porém há uma disseminação de micro-organismos no meio interno (bucal) e externo (consultório). Essa disseminação ocorre na forma de aerossol onde há a suspensão de pequenas partículas e gotículas contaminadas no ar, oferecendo um risco biológico (3,17). Dessa forma, um meio de conter a viabilidade desses micro-organismos previamente á profilaxia é interessante para evitar possíveis contaminações.

Outros meios, como os químicos, podem vir a ser utilizados apenas como complemento. O uso excessivo de agentes químicos pode proporcionar o desenvolvimento de espécies resistentes aos agentes antimicrobianos convencionais, levando a futuras infecções crônicas (2,18). Diversos produtos podem ser usados para bochecho, como principal agente químico há a clorexidina (19); e como um coadjuvante natural temos o óleo de coco e extratos de plantas (20). Porém, o problema com esses métodos é a demanda de tempo e ineficácia, respectivamente, não sendo viáveis. Ainda, o uso contínuo da clorexidina leva a uma alta tolerância por parte dos micro-organismos e apresenta diversos efeitos adversos (2).

Uma solução alternativa à remissão bacteriana é o emprego de protocolos clínicos de fototerapia que atuam no controle do biofilme dental, proporcionando uma manutenção da saúde bucal dos indivíduos (2,21). A terapia laser pode causar diversas reações nos tecidos bucais (duros e moles) dependendo do nível de energia aplicada (22). Há diversos tipos de aparelhos laser e estes se organizam de acordo com o seu meio de ação (2), podendo ser classificados como lasers cirúrgicos (alta potência) e lasers terapêuticos (baixa potência). Como exemplo temos Lasers Gasosos (Laser de Dióxido de Carbono, de Argônio, Criptônio e Nitrogênio), Lasers Químicos (Laser Coil), Lasers Corante, Lasers de Vapor de Metal (Laser Hélio-Cádmio), Lasers

Sólidos (Laser de Rubí), Lasers YAG (Laser Nd:YAG, Er:YAG), Lasers Semicondutores (Laser de Diodo), entre outros (2). Para diferentes tipos de aparelhos laser há diferentes tipos de reações teciduais, já que seu efeito é altamente influenciado meio de ação e o tipo de potência empregada. No caso do laser de alta potência, estima-se que sua energia penetra e espalha-se nos tecidos circundantes durante sua aplicação (22), promovendo uma ação antimicrobiana através de uma esterilização térmica da superfície irradiada devido às altas temperaturas emitidas pela luz (2). O laser de baixa potência promove biomodulação, apresenta resultados de regeneração e cura tecidual, estimula o desenvolvimento celular e respostas anti-inflamatórias, assim como um aumento na proliferação celular (23). Isso ocorre por efeitos fotoquímicos e fotoelétricos, restabelecendo o equilíbrio biológico celular, sem apresentar efeito antimicrobiano quando utilizado isoladamente (2).

Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é um moderno protocolo de desinfecção baseado na combinação de um agente fotossembilizador não-tóxico (como o azul de toluidina, azul de metileno e cúrcuma) com uma fonte de luz (no comprimento de onda apropriado), na presença de oxigênio (2,3,24). A aPDT era utilizada inicialmente para o tratamento de tumores através da aplicação de um fotossensibilizador sistêmico ativado por uma fonte de luz apropriado (24). Com a evolução das pesquisas, a aPDT está se disseminando em diversos campos da medicina, envolvendo desde o tratamento de câncer até condições dermatológicas (3). Na odontologia, essa terapia se mostrou eficaz na redução de micro-organismo (bactérias, vírus e fungos) provenientes do biofilme oral (3). Seu mecanismo de ação funciona através da interação de moléculas com o fotossensibilizador excitado pela irradiação laser que produz hidroxilas e outros radicais livres através da sua interação com aceptores de elétrons (fotoprocesso tipo I) ou incita a produção de oxigênio singlete altamente reativo através da interação com oxigênio molecular (fotoprocesso tipo II) (2,3,24).

Tem sido observado que em diversas áreas da odontologia têm empregado protocolos laser com propósitos diferentes obtendo resultados positivos. Na periodontia há uma remissão da bolsa periodontal, diminuição da inflamação e uma melhor remoção dos patógenos do complexo vermelho (25-

27). Na cirurgia são vistos casos de diminuição da infecção em osteonecrose mandibular, cura de defeitos ósseos maxilomandibulares e alívio no desconforto pós-cirúrgico de terceiros molares (28-30). Na endodontia os resultados mostraram uma remissão bacteriana total através da associação de laserterapia (25,31). Nos exemplos citados acima as áreas são fechadas e o protocolo é para fins curativos, portanto é interessante buscar resultados clínicos com um protocolo para áreas abertas e com finalidade profilática.

A utilização do laser de baixa potência tem como vantagem a rapidez da aplicação, obtenção de resultados positivos e ser de fácil transporte. Pacientes acamados e com locomoção reduzida que não conseguem comparecer à um consultório odontológico pode receber tratamento em casa. O protocolo também pode ser inserido na rotina de pacientes em tratamento de câncer de cabeça e pescoço. Como efeito adverso ao tratamento, esses pacientes apresentam casos de mucosites, lesões que causam muita dor e impedem o paciente de realizar tarefas básicas (32). Como o protocolo laser já é implementado para dor (33) ele pode ser incluído para a desinfecção, já que a higienização é prejudicada devido às condições bucais. Pacientes que fazem uso de medicamentos ou que possuem desordens genéticas que causam hiperplasia gengival sentem muita sensibilidade. Esse desconforto prejudica ainda a higiene bucal por falta de escovação, havendo um acúmulo maior de biofilme e inflamação gengival. Como a primeira intervenção odontológica também gera grande desconforto pode ser aplicado o protocolo laser para a remissão da inflamação e o número de micro-organismo. Após a estabilização do caso o paciente estará apto ao tratamento completo com remoção mecânica e controle do biofilme (34). Pacientes portadores de necessidades especiais precisam de intervenção profissional e serviços especializados para o auxílio da saúde bucal (35). Muitas vezes esses pacientes apresentam limitações mecânicas e mentais que impedem a realização dessas tarefas, comprometendo a saúde bucal e geral, sendo benéfico à aplicação laser como prevenção de futuras doenças.

Outro ponto vantajoso deste tratamento é sua ação minimamente invasiva, podendo passar a ser usado para adaptação de pacientes jovens inseguros e temerosos. Além de criar um vínculo inicial com o profissional o

tratamento já é iniciado. Essa conduta de protocolo laser já foi comprovada com eficácia na pediatria, usando outro tipo de fototerapia, apresentando resultados positivos quanto os fins bactericidas (36).

Frente às limitações que ocorrem para remoção do biofilme bacteriano e buscando evitar diferentes tipos de contaminação estudados *in vivo* são necessários com a função de estabelecer um protocolo para inativar ou reduzir os micro-organismos através do uso da fototerapia.

2. Proposição

2. Proposição

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da irradiação laser empregando diferentes comprimentos de onda do laser de Diodo (660nm e 970nm), com diferentes protocolos, com a finalidade de inativar os micro-organismos presentes no biofilme bacteriano maduro.

Objetivos Específicos

- Quantificar as unidades formadoras de colônias (UFC) microbianas presentes no biofilme antes e após a irradiação laser;
- Comparar os tratamentos experimentais quanto à remissão bacteriana.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

O presente estudo foi previamente submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (Processo n° 2.820.736; Anexo 1) e ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (n° 2.833.228; Anexo 2).

Delineamento Experimental

O presente estudo foi fatorial, com período da realização da irradiação em 2 níveis (controle/sem irradiação e após a irradiação) e tipo de tratamento em 2 níveis (irradiação de laser de Diodo com comprimento de onda de 660 e 970 nm). A unidade experimental foi composta por 12 voluntários, onde 4 sítios foram testados em cada voluntário, divididos aleatoriamente em 2 grupos/4 subgrupos experimentais.

A variável de resposta quantitativa foi a contagem UFC/mg de massa úmida de biofilme supragengival realizada em duas etapas: antes da aplicação laser; e imediatamente após a irradiação uma nova contagem de UFC/mg de massa úmida de biofilme supragengival. Assim, foi analisado o número de colônias e proliferação bacteriana com e sem os protocolos laser.

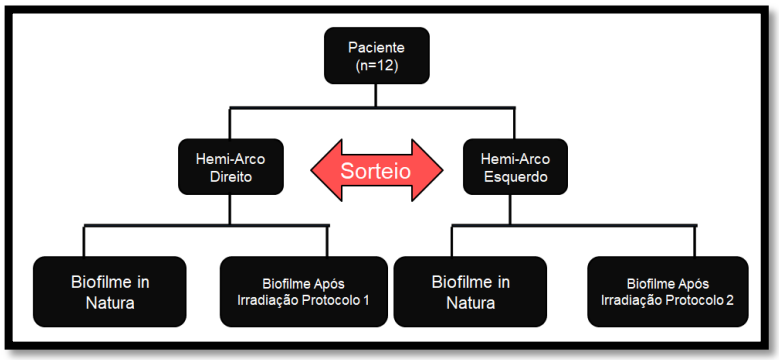

Figura 1- Fluxograma expressando o delineamento experimental.

Preparo do meio de cultura e líquido de transporte

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o MM10 Sacarose Ágar (Figura 1) e o líquido de transporte foi o Fluído de Transporte Reduzido, propostos por Syed et al (37,38).

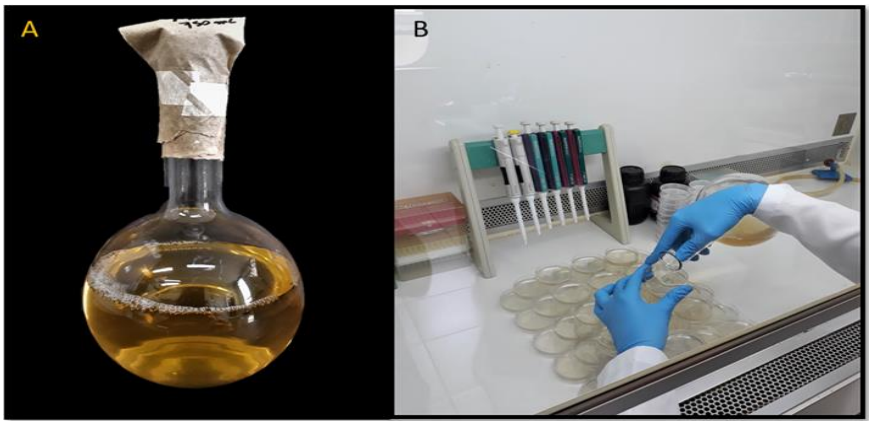

Figura 2- Preparo do meio de cultura MM10 Sacarose Ágar. A. meio de cultura autoclavado. B. preparo das placas de cultura em capela de fluxo laminar.

Seleção dos voluntários

Foram selecionados voluntários de ambos os sexos, residentes em Ribeirão Preto, com idade entre 10 e 40 anos, esclarecido, com disponibilidade de tempo para comparecer à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e ao Núcleo de Saúde da Família 3. Os voluntários foram orientados sobre a metodologia do trabalho, seus riscos e benefícios, e após receberem estas informações assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” concordando em participar e colaborar com a execução da pesquisa. Em casos de pacientes menores de idade, as informações foram passadas a ambos, sendo assinado pelo responsável legal o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e pela criança o “Termo de Assentimento Livre e Esclarecido”. Anteriormente ao início da execução do experimento, os voluntários foram submetidos à anamnese e exame clínico, sendo excluídos pacientes que apresentavam doenças sistêmicas, que faziam uso de medicamentos que alteram o fluxo salivar, mulheres grávidas e lactantes e pacientes que não apresentavam acúmulo de biofilme sobre a superfície dental.

Coleta do biofilme antes da irradiação

Previamente à coleta do material biológico, foi pipetado 1 ml do fluido de transporte reduzido (RTF; Figura 2A) em microtubo de polietileno do tipo Eppendorf (tubo Eppendorf) para armazenamento da amostra coletada. Esse fluido conserva o material biológico de forma que o mesmo não sofra danos e

alterações antes de ser preparado para cultura. Logo após, os tubos foram pesados em balança analítica (Bel Equipamentos Analíticos LTDA, SP, Brasil) para obtenção do valor de sua massa inicial para futuras comparações (Figura 2B).

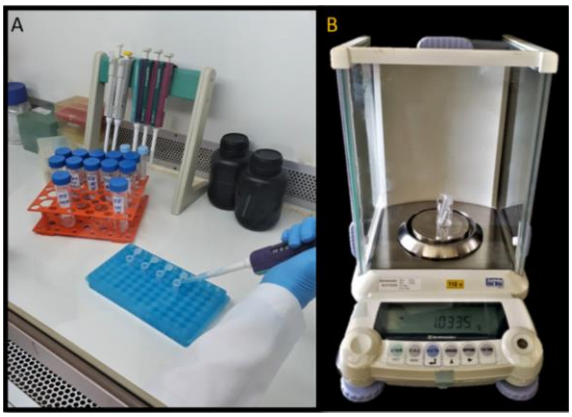

Figura 3- A. Preparo dos tubos Eppendorf com o líquido de transporte RTF. B. Mensuração da massa inicial dos tubos Eppendorf contendo o líquido de transporte RTF em balança analítica.

Para o experimento, o voluntário precisava apresentar um acúmulo de biofilme na superfície vestibular dos elementos dentais (Figura 3A) em ambos quadrantes da arcada. O instrumento utilizado para a coleta foi uma colher de dentina previamente selecionada e esterilizada, individual para cada amostra, para a remoção de aproximadamente dois miligramas de massa úmida (Figura 3B). O material removido foi depositado em um tubo Eppendorf sinalizado conforme a área e tempo do experimento (Figura 4), resguardando o conteúdo líquido do tubo de modo que não houvesse nenhuma perda do material através do contato da cureta com o RTF. Esse procedimento de coleta prévia à irradiação foi realizado em 1 dente de ambos os hemi arcos, obtendo, desse modo, as duas amostras iniciais.

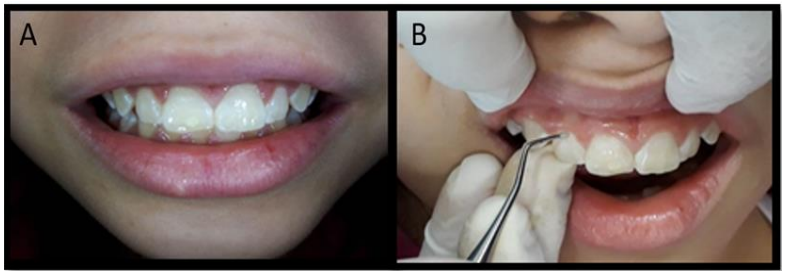

Figura 4- Perfil de paciente selecionado para participar da pesquisa. Na figura A observa-se um acúmulo de biofilme sobre a superfície dental. Na figura B indica-se a quantidade necessária da amostra coletada.

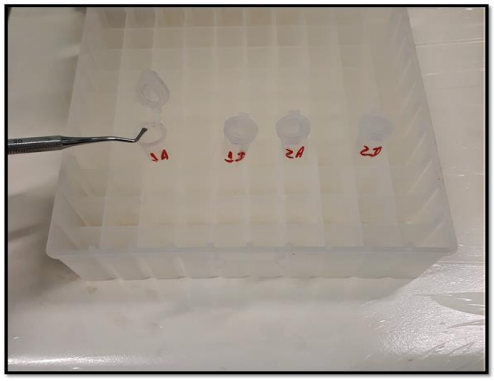

Figura 5- Dispersão do material coletado em tubos Eppendorf sinalizados conforme o tratamento e o tempo do experimento.

Procedimento de irradiação laser

Após a coleta inicial do biofilme, foi aplicado o agente fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 0,005% (Chimiolux, DMC, São Carlos – SP; Figura 5A). Sua aplicação foi realizada em toda a superfície dental dos elementos selecionados, com um tempo de pré-irradiação de 5 minutos (Figura 5B). Após essa etapa, foi feito um sorteio para aleatorizar os sítios para a aplicação de cada grupo.

Figura 6- A. Fotossensibilizador azul de metileno da Chimiolux, DMC, na concentração de 0,005%. B. Aplicação do fotossensibilizador sobre o biofilme bacteriano maduro.

Antes do experimento, foi realizado a mensuração da energia de *output* liberada pelos aparelhos laser utilizados, e então foram calibrandos para os valores preconizados neste estudo.

Grupo I – O biofilme dental e a superfície do dente foram irradiados com laser de diodo de comprimento de onda de 660 nm (Whitening Laser II, DMC, São Carlos, SP, Brasil; Figura 6A) com uma fibra óptica de 200 µm de diâmetro, posicionado perpendicularmente a superfície varrendo toda região do biofilme dental. Os parâmetros empregados foram: potência de 0,1 W, corrente contínua, por um tempo de 90 s de varredura no modo não contato com energia total depositada de 9 J, e densidade de energia de 318,31 J/cm^2.

Grupo II - O biofilme dental e a superfície do dente foram irradiados com laser de diodo de comprimento de onda de 970 nm (Sirona Laser, Sirona Dental, Bensheim, HE, Alemanha; Figura 6B) com uma fibra óptica de 300 µm de diâmetro, perpendicularmente a superfície varrendo toda região do biofilme dental. Empregou-se a potência de 0,4 W, corrente contínua, por um tempo de 11 s de varredura no modo não contato com energia total depositada de 9 J e densidade de energia de 565,88 J/cm^2.

Figura 7- Lasers de Diodo utilizados com os parâmetros de tratamento. A. laser de Diodo DMC Whitening Laser II. B. laser Sirona.

A irradiação foi empregada em toda a superfície vestibular do dente em questão, envolvendo até as ameias proximais, no modo varredura (Figura 7). Durante o experimento, o voluntário recebeu paramentação com o equipamento de proteção individual (EPI) preconizado pelo fabricante do aparelho, protegendo o paciente durante a aplicação do tratamento (Figura 8).

Figura 8- Aplicação do protocolo laser sobre o biofilme bacteriano maduro.

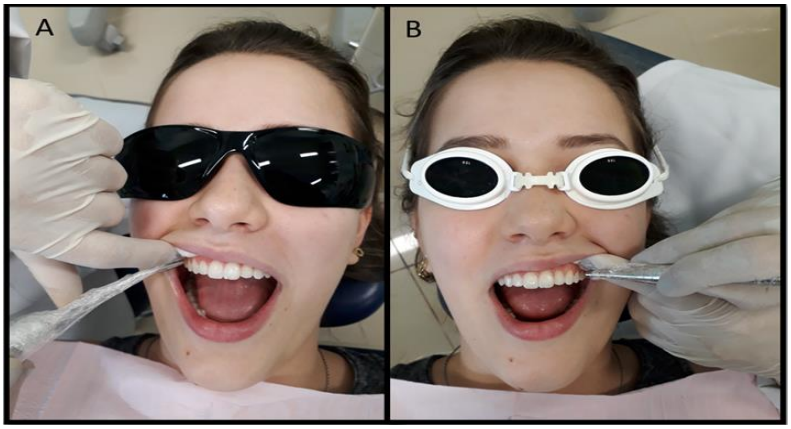

Figura 9- Paciente devidamente paramentado com o EPI preconizado pelo fabricante. A. óculos de proteção do aparelho Whitening Laser II; B. Óculos de proteção do aparelho Sirona Laser.

Após a realização dos tratamentos, o biofilme irradiado foi coletado e armazenado da mesma maneira que o controle, conforme citado anteriormente. Os Eppendorfs foram identificados e armazenados em um recipiente apropriado para transporte, sendo mantidos sobre refrigeração (4°C) até o processamento da amostra. O transporte do material ao laboratório foi realizado imediatamente após sua coleta para evitar alterações microbiológicas.

Preparo das amostras

Os tubos contendo os materiais biológicos coletados passaram por uma nova mensuração para obtenção da massa final. Sendo assim, as medições iniciais foram comparadas com as finais, resultando no valor da massa úmida coletada para cada amostra. Os procedimentos para preparo da amostra foram executados em Capela de Fluxo Laminar, a fim de manter o material em segurança biológica e evitar contaminação.

Em todos os tubos foram adicionadas pérolas de vidro estéril e os mesmos foram submetidos à agitação por dois minutos em Vortex (Figura 9), com a finalidade de dispersar os grupamentos de micro-organismos.

Figura 10- Uso do Vortex para dispersão dos grupamentos microbiológicos.

Em seguida, a partir do tubo mãe, a amostra passou por uma sequência de diluições decimais seriadas, utilizando o líquido de transporte (RTF). Nesse procedimento, foram pipetados 100 µl da suspensão, provenientes do tubo mãe, em um tubo contendo 900 µl de RTF. Logo após, esse tubo foi submetido à agitação em Vortex por 10 segundos, obtendo a amostra diluída 10 vezes (10^{-1}). Para a diluição seguinte, 100 µl foram coletados do tubo -1 e pipetados em um novo tubo contendo 900 µl de RTF, sendo submetido à agitação em Vortex por 10 segundos, obtendo a amostra 10^{-2}. Essa metodologia foi repetida até a diluição 10^{-6}, diluindo a amostra inicial em 1 milhão de vezes (Figura 10).

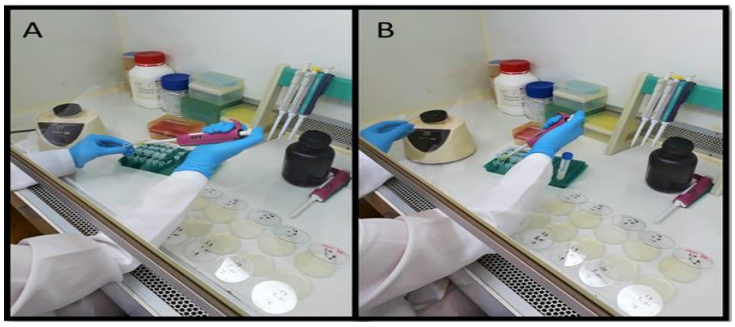

Figura 11- Preparo da diluição da amostra. A. Coletado 100 µl provenientes do tubo mãe. B. Amostra está sendo dispersada no tubo de diluição -1.

Para plaquear as amostras, foram pipetados 50 µl de cada tubo de diluição, incluindo o tubo mãe, sobre o meio de cultura MM10 Sacarose Ágar (Figura 11A). A solução amostral foi semeada, cuidadosamente, sobre o meio com o auxílio de uma haste de vidro estéril em forma de “L” (alça de Drigalski) por 10 segundos (Figura 11B). Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

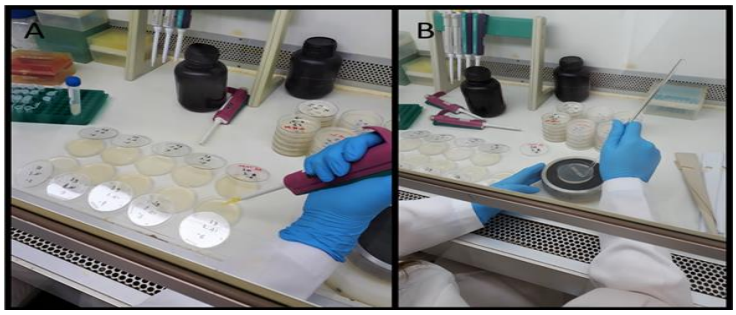

Figura 12- Preparo da cultura bacteriana. A. dispensando 50 µl da amostra na placa. B. Amostra sendo semeada sobre o meio de cultura.

Ao finalizar o processamento e a semeadura das amostras, as placas foram inseridas em uma jarra de incubação junto com um gerador (BD GasPak EZ - Anaerobe Container System with Indicator, Sparks, MD, USA). A incubação foi realizada em atmosfera de anaerobiose (composta por 85% N_2, 10% CO_2, 5% H_2) por 7 dias na temperatura de 37ºC.

Análises realizadas

Após o tempo da incubação, as placas foram removidas das jarras de anaerobiose e levadas para observação microbiológica para o registro das colônias bacterianas, identificação e contagem das mesmas. O avaliador passou por uma calibração para identificação de colônias composta por micro-organismos específicos do grupo mutans, desprezando qualquer estrutura não compatível. A contagem foi realizada sobre a superfície da placa com um marcador permanente (Figura 12), apoiada sobre um fundo preto. Em caso de dúvidas durante a contagem foi utilizado para auxílio de um microscópio topográfico e uma fonte de luz suplementar. A contagem foi realizada em placas com o número de colônias entre 30 e 300, dispensando as que não entraram nesse espectro (Figura 13).

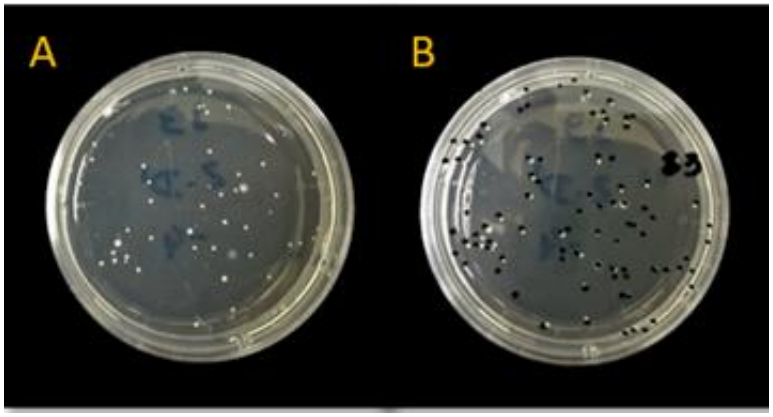

Figura 13- Enumeração das colônias microbianas. Na figura A identifica-se as colônias. Na figura B foi realizada a enumeração das colônias.

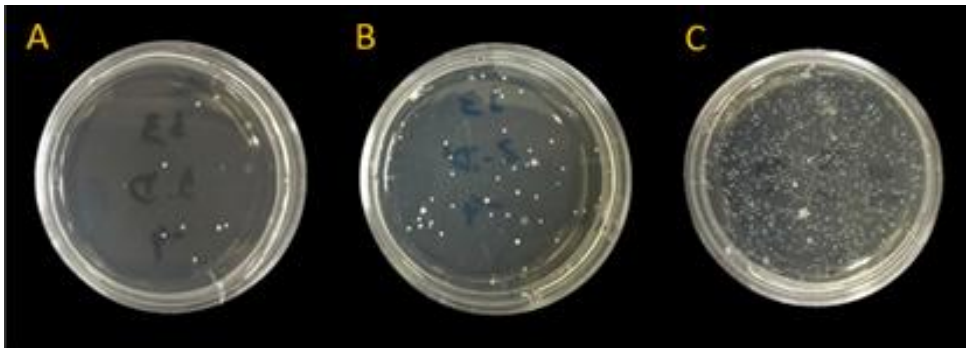

Figura 14- Amostras com diferentes concentrações de colônias. A. As colônias não atingiram a contagem de 30. B. Contagem entre 30 e 300. C. Amostra excedeu a contagem de 300 colônias.

Todos os valores obtidos da contagem foram anotados em uma planilha para realização dos cálculos, obtendo:

- UFC/ml = (número de colônias x fator de diluição) / volume pipetado na placa em ml;
- UFC/mg = (UFC/ml) /mg de massa úmida coletada;
- % de redução = (UFC/mg antes - UFC/mg depois) x 100 / UFC/mg antes.

Análise dos dados

Os dados obtidos foram avaliados e comparados em diferentes tempos, realizando uma comparação entre as amostras com e sem tratamento e outra comparação entre os dois tipos de tratamentos implementados. Ao realizar a análise entre a porcentagem de redução de ambos os tratamentos, foi empregado o Mann-Whitney Rank Sum Test. Para avaliação da relação entre a contagem de micro-organismos nos dois tempos do experimento, antes e após o tratamento, foi utilizado Wilcoxon Signed Rank Test. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4. Resultados

Avaliação da quantidade de colônias

Laser Sirona

Na análise dos dados da quantificação de colônias encontradas nas amostras antes e após a irradiação laser sobre biofilme maduro, observou-se que o laser de comprimento de onda de 970 nm apresentou uma redução estatisticamente significante (p = 0,002) do número total de UFC em relação ao biofilme antes da irradiação (Figura 14).

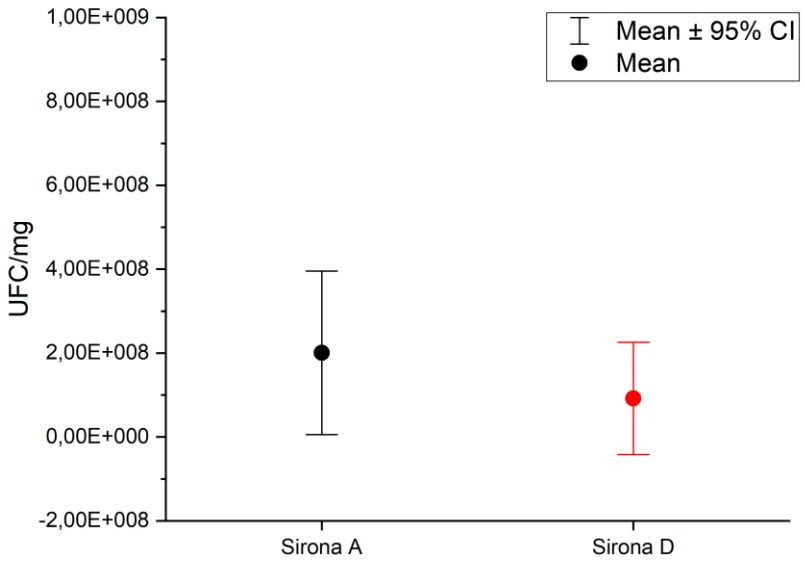

Figura 15- Número total de colônias viável antes e após o tratamento com o laser Sirona. Intervalo de confiança de 95% da contagem de UFC/mg.

A Tabela 1 representa o valore médio em UFC/mg observadas antes e após tratamento com o Sirona Laser, bem como o desvio padrão e a mediana.

Tabela 1- Média, desvio padrão e mediana de UFC/mg do laser Sirona antes e após tratamento.

Sirona	Antes	Depois
Média	$2,00 \times 10^8$	$0,91 \times 10^8$
Desvio Padrão	$3,07 \times 10^8$	$2,10 \times 10^8$
Mediana	$0,21 \times 10^8$	$0,06 \times 10^8$

DMC

Para o grupo II observou que o comprimento de onda de 660 nm também proporcionou um efeito de diminuição no número total de micro-organismos encontrados no biofilme maduro. Essa diminuição proporcionou uma remissão significante (p = 0,027; Figura 15).

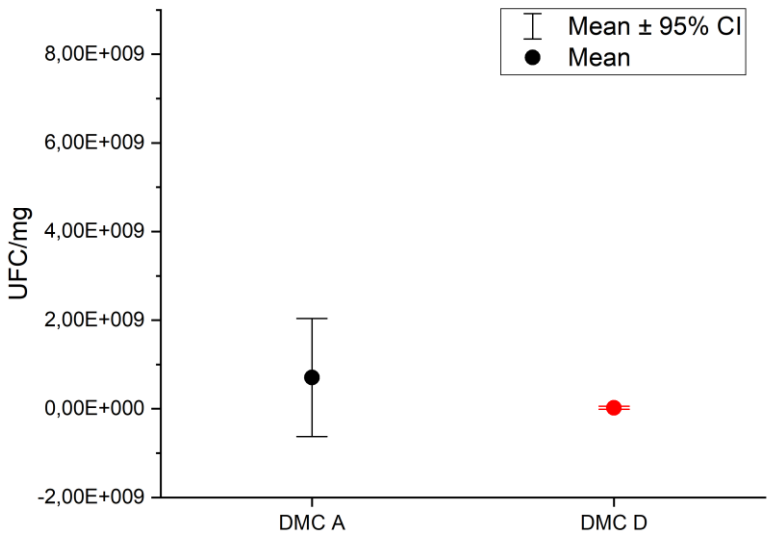

Figura 16- Número total de colônias viável antes e após o tratamento com o laser DMC. Intervalo de confiança de 95% da contagem de UFC/mg.

A Tabela 2 representa os valores médio em UFC/mg observadas antes e após tratamento com o Whitening Laser II, bem como o desvio padrão e a mediana

Tabela 2- Média, desvio padrão e mediana de UFC/mg do laser DMC antes e após tratamento.

DMC	Antes	Depois
Média	$7,07 \times 10^8$	$0,24 \times 10^8$
Desvio Padrão	21×10^8	$0,54 \times 10^8$
Mediana	$0,12 \times 10^8$	$0,08 \times 10^8$

Ao comparar os diferentes comprimentos de onda, observou-se que ambos apresentaram comportamento semelhante quanto à porcentagem de redução de micro-organismos, não havendo diferença estatística significante entre os aparelhos (p = 0,0883; Figura 16, Tabela 3).

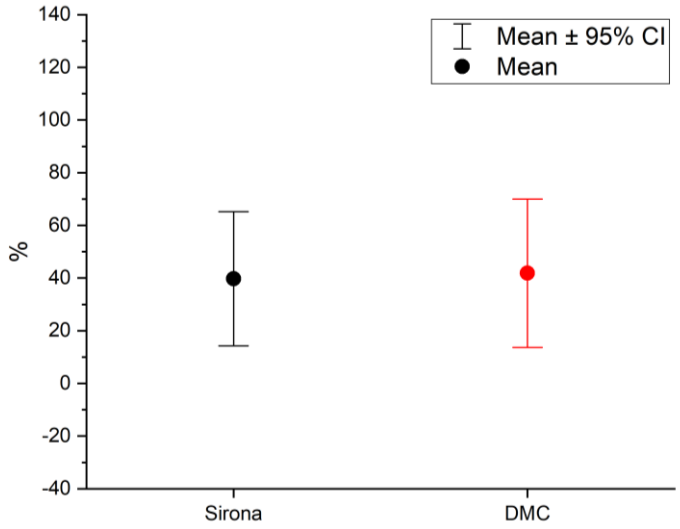

Figura 17- Porcentagem de redução dos dois comprimentos de onda estudados. Intervalo de confiança de 95% da porcentagem de redução.

Tabela 3- Média, desvio padrão e mediana da porcentagem de redução dos aparelhos laser estudados.

	Sirona	DMC
Média	39,76	41,83
Desvio Padrão	40,06	44,31
Mediana	31,41	23,87

5. Discussão

5. Discussão

A interação entre bactérias da microbiota oral humana é integralmente destinada à formação e desenvolvimento do biofilme bucal (39). Inicialmente, células planctônicas com pouca afinidade são aderidas ao substrato dental. Em seguida, através de receptores específicos, ocorre uma troca da microbiota residente, aderindo apenas micro-organismo com alta afinidade. Dessa forma, há o desenvolvimento das colônias (40) e com o recrutamento de novas células planctônicas e a adesão de múltiplas espécies à colônia, há a formação de uma comunidade de multiespécies (40). A partir dessa formação, há uma colonização dessa comunidade densamente povoada por uma matriz diversificada de espécies bacterianas, buscando a maturação desse biofilme (39).

O acúmulo de biofilme sobre a superfície dental é extremamente danoso à saúde. Sua presença favorece o desenvolvimento das principais doenças da cavidade bucal (42). Como exemplo, tem-se que o biofilme cariogênico é o fator etiológico da cárie primária e secundária (41), promovendo perdas irreversíveis à estrutura dental (42). O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o principal colonizador do biofilme bacteriano, compreendendo cerca de 70% das bactérias (42,43). Suas propriedades cariogênicas são influenciadas por diversos genes envolvidos nas vias metabólicas, como a adesão microbiana, síntese de polissacarídeos extracelulares, formação de biofilme, carboidratos de absorção e tolerância ao ácido (44). Normalmente, o *S. mutans* está presente em biofilmes mais complexos, onde há uma grande produção de exopolissacarídeos, principalmente na presença de glicose, o que facilita o processo de adesão (44). Sendo assim, a alimentação é um fator importante para a formação do biofilme, junto com a microbiota residente e o meio em que estão inseridas. Além do mais, o *S. mutans* também é responsável pelo desenvolvimento de infecções da saúde geral, como a endocardite bacteriana que pode levar à morbidade e mortalidade em até 50% dos casos (42).

Para controlar tais infecções, terapias antimicrobianas vêm sendo implementadas buscando erradicar ou reduzir tais micro-organismo, com o auxílio de antibióticos e agentes químicos. Porém, a eficácia dessa abordagem está sendo cada vez mais reduzida devido ao surgimento de cepas resistentes

(42), acarretando em uma situação emergencial de infecções crônicas. A clorexidina é um composto químico amplamente utilizado como enxaguante bucal para fins antimicrobianos. Contudo, seu uso contínuo pode causar alguns efeitos adversos como, perda da sensibilidade gustativa, queimaduras no tecido mole, dor, xerostomia e alteração da coloração de dentes, restaurações e língua (43).

Considerando tratamentos alternativos, a terapia fotodinâmica (PDT) foi implementada em diversas áreas médicas e odontológicas por ser um método terapêutico inovador, conservador e com poucos efeitos adversos (3,24,41). Na odontologia, a terapia fotodinâmica antibacteriana (aPDT) é vista como um protocolo moderno para desinfecção, mostrando-se eficaz no processo do combate à resistência medicamentosa (3,42). aPDT é um tratamento local minimamente invasivo que faz uso da combinação entre um fotossensibilizador apropriado e uma fonte de luz com um comprimento de onda específico em contato com oxigênio externo (45,46). Sua aplicabilidade é ampla dentro do campo odontológico, podendo realizar desde diagnóstico de lesões orais malignas e tratamento de câncer oral, até a inativação de infecções causadas por micro-organismos como bactérias, vírus e fungos (46). Em áreas específicas, aPDT obteve sucesso em tratamentos periodontais e endodônticos, através do auxílio em procedimentos de alisamento radicular e desinfecção de bolsas periodontais e do canal radicular (46,47). Essa terapia também se aplica para preparo de cavidade de lesões cariosas. É realizada uma desinfecção da dentina contaminada (45,46,48) e uma inativação dos micro-organismos presentes no biofilme bacteriano (41-44,46). Diversos estudos *in vitro* analisaram a ação da aPDT com diferentes materiais e protocolos, porém, nenhum foi capaz de inativar completamente os micro-organismos presentes no biofilme bacteriano (41-44,46).

Assim, o presente estudo teve o objetivo de aprofundar e tentar compreender o efeito do aPDT *in vivo* sobre a possível remissão microbiana do biofilme maduro. Para tanto, empregou-se um fotossensibilizador (azul de metileno) para melhor interação da luz laser sobre os micro-organismos. O azul de metileno foi muito utilizado em cirurgias para detecção de células e tecidos pré-malignos. Ele faz parte da segunda geração de fotossensibilizadores, são compostos químicos puros que absorvem luz em comprimentos de onda mais

altos (24). É um corante sintético de fenotiazina catiônico, de baixo peso molecular e com um pico de absorção de luz de 550 nm até 700 nm (24,45,48). O mecanismo é baseado em um processo fotofísico que produz espécies de oxigênio reativo citotóxico (ROS), capazes de levar à morte celular de vírus, bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos (41). Essa reação se desencadeia a partir da interação entre moléculas do fotossensibilizador e um comprimento de onda adequado em um ambiente rico em oxigênio (41). A partir da absorção de fótons provenientes da luz empregada, as moléculas não-tóxicas passam de um estado fundamental ao excitado (42). Moléculas excitadas são altamente reativas e instáveis, podendo voltar ao seu estado fundamental através da liberação de energia na forma de calor ou através da emissão de luz fluorescente (41). Em casos em que o fotossensibilizador é mais estável, suas moléculas excitadas podem passar por um cruzamento intersistema e se converter ao estado triplete (41). Essas moléculas possuem um estado de energia mais duradouro, podendo reagir com biomoléculas ao seu redor (oxigênio tecidual) através de dois tipos de reação (tipo I e tipo II) (41).

Reações do tipo I são baseadas na transferência de elétrons entre as moléculas excitadas do fotossensibilizador, resultando na produção de espécies de radical livre (41). Em casos como a aPDT, acredita-se que reações catalíticas tipo II sejam predominantes. Nesses casos, a energia em excesso, proveniente do fotossensibilizador, é transferida para as moléculas de oxigênio triplete ao seu redor, resultando em uma mudança na orientação do seu spin para um estado ainda mais excitado, o oxigênio singlete (41). Esse tipo de oxigênio mais reativo é altamente tóxico. Participa de inúmeras reações capazes de causar danos irreversíveis ao DNA, às organelas e membrana celular, levando à morte celular dos micro-organismos (41,42). O oxigênio singlete é considerado a ROS mais importante devido à sua eficiência oxidativa capaz de causar danos irreparáveis às células procariontes (42). Essa ROS age através de sua penetração na barreira membranosa celular, podendo degradar tanto a membrana celular da bactéria quanto seu ácido nucleico (42). Por ser não-tóxicas às células eucariontes devido à sua complexa estrutura, essa reação não causa prejuízos ao paciente (42).

Sua ação é efetiva contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, sendo extremamente efetivo na redução da viabilidade dos micro-organismos presentes no biofilme bacteriano (45). Para ser considerado efetivo, o fotossensibilizador deve cumprir 3 fundamentos básicos ao se relacionar com os micro-organismos. Deve ser capaz de: se ligar à célula, de penetrá-la e agir em seu interior, e produzir oxigênio singlete (46,48). Baseando-nos na literatura, o presente estudo empregou um tempo de pré-irradiação do fotossensibilizador de 5 minutos, tempo necessário para que o corante possa penetrar na estrutura do biofilme (41,45,46).

A fonte de luz utilizada é monocromática, com uma radiação coerente e com comprimentos de onda e densidade de energia adequados, transmitidos através de fibras ópticas. A luz laser traz diversos benefícios aos tecidos irradiados, podendo gerar desde respostas antiinflamatórias e analgésicas em tecidos moles até levar à morte celular de micro-organismos (24). Alguns autores (41-44,48) já comprovaram a ação antimicrobiana do laser de 660 nm sobre o biofilme bacteriano. Sendo assim, esse comprimento foi considerado o controle positivo, além de pertencer ao espectro de luz absorvido pelo azul de metileno. Pode-se observar no presente estudo que o laser de 660 nm foi capaz de provocar uma remissão de micro-organismos no biofilme maduro. Porém, a eficácia foi variável não tendo a mesma ação para todos os voluntários. Esse fato provavelmente ocorreu porque o biofilme bem estruturado possui um grupamento de comunidades microbiológicas associadas ao substrato e embebidas em um pool de uma substância de matriz polimérica extracelular (42). Essa matriz é composta por proteínas, polissacarídeos e ácido nucleico, provenientes do micro-organismo e do meio, funcionando como uma barreira física contra agentes antimicrobianos (42). Sua arquitetura dificulta a penetração do fotossensibilizador e a difusão da fonte de luz, resguardando suas camadas mais profundas e protegendo seus micro-organismos (45).

Em relação ao laser de comprimento de onda de 970 nm observa-se que em dentina infectada e em canais radiculares (45,49) ele é eficaz. Em relação ao biofilme maduro pode-se observar resultados muito semelhantes ao laser de 660 nm, inclusive no comportamento de atuação no biofilme dos diferentes voluntários, em que 66,6% dos voluntários apresentaram um efeito

positivo sobre os micro-organismos. Um fato interessante que pode ser observado é que em 2 voluntários não ocorreu remissão em nenhum dos lasers testados, provavelmente isso ocorreu devido a composição do biofilme bacteriano ou mesmo o biofilme estava muito estruturado que possivelmente o corante não conseguiu penetrar adequadamente.

Como controle de qualidade do experimento, ambos os aparelhos laser utilizados passaram pela mensuração da energia de *output*, para que os parâmetros fossem realmente de acordo com o proposto no estudo. Esse cuidado prévio ao uso do laser é muito importante para a energia depositada seja aquela desejada. Outro fato que foi considerado no estudo foi a padronização da distância de irradiação de 10 mm que vem sendo indicado para um tratamento de aPDT (48).

Pode-se observar que na análise da contagem de colônias nos diferentes tempos do experimento, ambos os protocolos aplicados (660 nm e 970 nm) foram capazes de reduzir o número de micro-organismos presentes no biofilme bacteriano maduro. Neste estudo, o aPDT foi capaz de diminuir um alto número de micro-organismos, em alguns casos conseguiu até atingir mais de 90% de redução. Nossos resultados vão de encontro com os obtidos na literatura, em que se observa a efetividade desse tratamento em diminuir a viabilidade das células presentes no biofilme bacteriano (41) com laser de Diodo com comprimento de onda de 660 nm associado com azul de metileno. Apesar de ser testado em um modelo de biofilme cultivado em laboratório por 24 horas, Florez et al (41) sugere que aPDT tem um potencial promissor como uma terapia adicional para o controle do biofilme oral cariogênico. Por outro lado, Nagai et al (48) observou diferença de comportamento entre os lasers de 940 nm e 660 nm, obtendo uma melhor resposta com comprimento de onda de 940 nm.

Além do efeito antimicrobiano positivo sobre o biofilme bacteriano, observa-se na literatura (47) uma ação *in vitro*, em micro-organismos Gram-positivos associados à casos endodônticos. Os parâmetros de irradiação são os mesmos empregados no presente estudo (660 nm, 100mW, 9 J, 3 minutos), assim como o fotossensibilizador testado (azul de metileno 0,005%). Essa ação de maior eficácia da aPDT em Gram-positivos comparados aos Gram-negativos (24) ocorre devido à fisiologia desses micro-organismos (47,48). A

parede celular dos Gram-positivos apresenta uma superfície externa relativamente porosa, formada por uma camada mais espessa de peptidoglicano e ácido lipoteicóico (47). Isso favorece a penetração de materiais hidrofílicos, como o azul de metileno (48), facilitando sua difusão no interior da célula e a propagação da radiação laser (47). Em contrapartida, a parede celular do Gram-negativo é mais fina e complexa, formada por proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas que agem como uma barreira limitante à penetração de diversas substâncias (47).

Apesar dos resultados positivos dos dois comprimentos de onda estudado, observou que ambos os tratamentos não reduziram os micro-organismos em 4 pacientes. Isso pode ser explicado devido à heterogeneidade da amostra. Como este é um estudo clínico e realizado em pacientes rotina de clínica e não controlados, não é passível de prever o grau de maturação de cada biofilme ou o tipo de micro-organismos presentes. Conforme o biofilme vai se desenvolvendo sua estrutura vai se tornando cada vez mais tolerante à agentes antimicrobianos, comparados aos micro-organismos livres (45). Além disso, ocorre uma mudança em sua composição ao decorrer do tempo (39). Nos primeiros estágios de sua formação, os estreptococos, bactérias Gram-positivas, são os micro-organismos predominantes do biofilme inicial. Conforme o desenvolvimento desse biofilme, mudanças ocorrem em sua composição devido à constante deposição de novas células sobre essa estrutura. Os novos membros dessa comunidade encontram um ambiente adequado para sua divisão e proliferação celular. Dessa forma, após 7 dias da formação ininterrupta do biofilme, há uma troca na população bacteriana predominante. Isso torna os primeiros colonizadores minoria enquanto a proporção de bactérias Gram-negativas aumenta constantemente (39). Isso indica que, durante a maturação do biofilme, ocorre uma grande mudança nas espécies de bactérias predominantes, há interações entre bactérias com morfotipos diferentes e um aumento na diversidade bacteriana (39). Bactérias do complexo laranja, mais especificamente fusobacterias, proliferam-se constantemente por volta do 4° dia da formação do biofilme (39). Por consequência, essa bactéria Gram-negativa é considerada a estrutura central que compõe o biofilme, além de ser peça-chave em sua maturação (39).

Dessa forma, um dos fatores ligados à eficácia da ação da aPDT é o modelo de biofilme utilizado, pois a localização da célula na estrutura do biofilme é relevante, pois as que se localizam em camadas mais profundas são mais resistentes. Isso ocorre devido ao seu perfil de metabolismo mais baixo causado pela escassez de espaço intercelular, pela quantidade de matriz extracelular e baixas concentrações de oxigênio e nutrientes (45). Uma das consequências dessa arquitetura é dificuldade de difusão e acesso às células por agentes antimicrobianos. Outro meio de proteção é a capacidade de transporte de agente tóxicos por estruturas provenientes do *S. mutans*, funcionando como uma bomba de efluxo, que consegue eliminar grandes quantidade de compostos tóxicos que não se assemelham quimicamente à célula. Pode até ser considerado uma ameaça contra as terapias medicamentosas e até mesmo à aPDT, já que esse mecanismo de efluxo elimina também o fotossensibilizador (44). Assim, o tempo de formação do biofilme pode ter interferido na penetração do fotossensibilizador e consequentemente a ação do laser.

Além disso, os micro-organismos presentes podem ser mais resistentes devido a tratamentos prévios com agentes antimicrobianos. Essa diferença também pode ocorrer dentro do mesmo paciente, o mesmo pode apresentar diferentes sítios microbiológicos e pode realizar a escovação com mais cautela em uma região do que em outra. Esses são fatores de difícil controle, o que torna essa pesquisa essencial para dados mais apurados num comportamento clínico desse tipo de tratamento. Pesquisas laboratoriais (41,43) obtiveram altos graus de sucesso com essa terapia por utilizar amostras na forma planctônica ou modelos de biofilmes artificiais com poucos dias de maturação. Sendo assim, as chances de produzirem uma morte celular são muito mais altas devido à facilidade de penetração do fotossensibilizador e dissipação da luz na arquitetura do biofilme. Dessa forma, o presente estudo demonstra que o emprego da irradiação a laser sobre o biofilme maduro proporciona uma considerável diminuição no número de micro-organismo. Porém, verifica-se a necessidade de um tratamento individualizado, pois vezes, o mesmo protocolo pode ser efetivo em um sítio da cavidade bucal de um paciente e ser ineficaz em outro.

A aPDT é uma terapia alternativa altamente empregada no meio científico devido à sua efetividade contra micro-organismos resistentes e sua ação minimamente invasiva e ultraconservadora (41). Outras vantagens da aPDT, comparada à métodos tradicionais de desinfecção, incluem um mecanismo biocida não-específico, sua capacidade de matar as células presentes no biofilme e a realização de um tratamento localizado (41). Por seus magníficos atributos e tempo clínico reduzido, essa terapia é considerada atraumática e pode ser empregada facilmente na rotina de pacientes mais fragilizados e crianças.

Com a microbiota do biofilme sofrendo constantes mudanças em sua composição, a ação do aPDT tende a oscilar conforme sua maturação. Indivíduos com acúmulo de biofilme dificilmente apresentam uma homogeneidade em seu desenvolvimento, seja por limitações mecânicas ou questões biológicas. Dessa forma, terapias antimicrobianas podem não ser totalmente efetivas a todos os indivíduos e nem em todos os sítios microbiológicos da cavidade bucal.

Neste presente experimento, o efeito bactericida da aPDT foi testado contra um modelo de biofilme bacteriano maduro *in vivo*. No entanto, conforme o decorrer da maturação do biofilme bacteriano ocorre uma troca da microbiota residente para micro-organismos Gram-negativos. Considerando as limitações de um estudo clínico e o experimento de apenas dois protocolos laser, outras pesquisas devem ser realizadas a fim de investigar o efeito da ação bactericida de diversos protocolos de aPDT sobre o microbioma oral. Dessa forma, poderá ser estabelecido uma terapia eficaz contra o biofilme bacteriano em diferentes graus de maturação.

5. Conclusão

6. Conclusão

Com base nos resultados observados e considerando as limitações inerentes de um experimento clínico, concluiu-se que:

- Ambos os comprimentos de onda foram capazes de reduzir as unidades formadoras de colônias do biofilme bacteriano maduro *in vivo*;
- Os sistemas laser testados foram eficazes e semelhantes na redução microbiológica do biofilme maduro.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. Trends Microbiol. 2005;13(12):589–95.
2. Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. Aplicação do Laser na Odontologia. São Paulo: Santos; 2010.
3. Kellesarian SV, Qayyum F, de Freitas PC, Akram Z, Javed F. Is antimicrobial photodynamic therapy a useful therapeutic protocol for oral decontamination? A systematic review and meta-analysis. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;20:55-61.
4. Chandak S, Bhondey A, Bhardwaj A, Pimpale J, Chandwani M. Comparative evaluation of the efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide – Amorphous calcium phosphate in reducing Streptococcus mutans counts in dental plaque of children: An in vivo study. J Int Prev Community Dent. 2016;6(5):423–9.
5. Kutsch VK. Dental caries: An updated medical model of risk assessment. J Prosthet Dent. 2014;111(4):280–5.
6. Allaker RP, Douglas CW. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. Int J Antimicrob Agents. 2009;33(1):8–13.
7. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections – an update. APMIS. 2017;125(4):376–84.
8. Duque C, João MF, Camargo GA, Teixeira GS, Machado TS, Azevedo RS, et al. Microbiological, lipid and immunological profiles in children with gingivitis and type 1 diabetes mellitus. J Appl Oral Sci. 2017;25(2):217–26.
9. Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Soares Dutra de Oliveira AM, Costa FO. Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1β, Tumor Necrosis Factor-α, Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. J Periodontol. 2017;88(8):778-87.
10. Verdugo F, Laksmana T, Uribarri A. Systemic antibiotics and the risk of superinfection in peri-implantitis. Arch Oral Biol. 2016;64:39–50.

11. Lindhe J, Lang N, Karring T. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 2th ed. Guanabara Koogan: São Paulo; 2010.
12. Souza LCD, Mota VBRD, Carvalho AVDSZ, Corrêa RDGCF, Libério SA, Lopes FF. Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. Braz Oral Res. 2017;31:38.
13. Herzberg MC, Weyer MW. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. Ann Periodontol. 1998;3(1):151–60.
14. Marino PJ, Wise MP, Smith A, Marchesi JR, Riggio MP, Lewis MAO, et al. Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. J Crit Care. 2017;39:149–55.
15. Fasula K, Evans CA, Boyd L, Giblin L, Belavsky BZ, Hetzel S, et al. Randomized trial of Plaque identifying Toothpaste: Dental Plaque and Inflammation. Am J Med. 2017;130(6):746–9.
16. Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. J Crit Care. 2017;37:30–7.
17. Sawhney A, Venugopal S, Babu GR, Garg A, Mathew M, Yadav M, et al. Aerosols how dangerous they are in clinical practice. J Clin Diagn Res. 2015;9(4):52–7.
18. Saleem HG, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. BMC Microbiol. 2016;16(1):214.
19. Peedikayil FC, Remy V, John S, Chandru TP, Sreenivasan P, Bijapur GA. Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on Streptococcus mutans: An in vivo study. J Int Soc Prev Community Dent. 2016;6(5):447–52.
20. Chandra Shekar B, Nagarajappa R, Singh R, Thaku R. Antimicrobial efficacy of the combinations of Acacia nilotica, Murraya koenigii L. sprengel, Eucalyptus hybrid and Psidium guajava on primary plaque colonizers. J Basic Clin Pharm. 2014;5(4):115-9.

21. de Sousa NT, Guirro RR, Santana HF, Silva CC. In Vitro Analysis of Bacterial Morphology by Atomic Force Microscopy of Low Level Laser Therapy 660, 830 and 904 nm. Photomed Laser Surg. 2012;30(5):281–5.
22. Cooper D, Doucet L, Pratt M. Understanding in multinational organizations. J Organ Behav. 2007;28(3):303–25.
23. Staffoli S, Romeo U, Amorim RNS, Migliau G, Palaia G, Resende L, et al. Review The effects of low level laser irradiation on proliferation of human dental pulp: a narrative review. Clin Ter. 2017;168(5):320–6.
24. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. Laser Phys. 2016;26(12):pii123001.
25. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, Azaripour A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy using diode laser activated indocyanine green as an adjunct in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016;14:93–7.
26. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D, et al. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. Int J Lab Hematol. 2016;38(1):42–9.
27. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN, Miessi DMJ, Ferro-Alves ML, Ervolino E, et al. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. Support Care Cancer; 2017;25(10):3261–71.
28. Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Mariela M, Cordeiro R, Grando LJ. Case Report Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. Case Rep Dent. 2016.
29. Santinoni CD, Oliveira HF, Batista VE, Lemos CA, Verri FR. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. J Photochem Photobiol B. 2017;169:83–9.
30. Eshghpour M, Ahrari F, Takallu M. Is Low-Level Laser Therapy Effective in the Management of Pain and Swelling After Mandibular Third Molar Surgery? J Oral Maxillofac Surg. 2016;74(7):1322.e1-8.

31. Preethee T, Kandaswamy D, Arathi G, Hannah R. Bactericidal effect of the 908 nm diode laser on Enterococcus faecalis in infected root canals. J Conserv Dent. 2012;15(1):46-50.
32. Chung YL, Pui NNM. Confounding factors associated with oral mucositis assessment in patients receiving chemoradiotherapy for head and neck cancer. Support Care Cancer. 2017;25(9):2743–51.
33. Xiao J, Hara AT, Kim D, Zero DT, Koo H, Hwang G. Biofilm three-dimensional architecture influences in situ pH distribution pattern on the human enamel surface. Int J Oral Sci. 2017;9(2):74–9.
34. de Oliveira Guaré R, Costa SC, Baeder F, de Souza Merli LA, Dos Santos MT. Drug-induced gingival enlargement: Biofilm control and surgical therapy with gallium-aluminum-arsenide (GaAlAs) diode laser - A 2-year follow-up. Spec Care Dentist. 2010;30(2):46–52.
35. Vignesh R, Rekha V, Annamalai S, Norouzi-Baghkomeh P, Sharmin D. A case report on dental management of a toddler with Pachygyria. J Clin Exp Dent. 2017;9(5):726-8.
36. Fekrazad R, Seraj B, Chiniforush N, Rokouei M, Mousavi N, Ghadimi S. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on the counts of salivary Streptococcus mutans in children with severe early childhood caries. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;18:319–22.
37. Syed SA, Loesche WJ. Survival of Human Dental Plaque Flora in Various Transport Medial. Appl Microbiol. 1972;24(4):638-44.
38. Syed SA, Loesche WJ. Efficiency of Various Growth Media in Recovering Oral Bacterial Flora from Human Dental Plaque. Appl Microbiol. 1973;26(4);459-65.
39. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol 2000. 2006;42:47-9.
40. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. Mol Oral Microbiol. 2013;28(2):83-101.
41. Esteban Florez FL, Mendonça de Oliveira MR, de Oliveira Júnior OB, Hiers RD, Khajotia SS, Pretel H. Bioluminescence Analysis of Antibacterial Photodynamic Therapy Using Methylene Blue Mediated by

Low-Intensity Level Laser Against Cariogenic Biofilms. Photomed Laser Surg. 2018;36(5):258-65.

42. Misba L, Zaidi S, Khan AU. Efficacy of photodynamic therapy against Streptococcus mutans biofilm: Role of singlet oxygen. J Photochem Photobiol B. 2018;183:16-21.
43. Azizi A, Shademan S, Rezami M, Rahimi A, Lawaf S. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on Streptococcus mutants: In vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016;16:66-71.
44. Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on Streptococcus mutans is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017;19:1-4.
45. Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. Lasers Med Sci. 2018;33(3):479-87.
46. Tokubo LM, Rosalen PL, de Cássia Orlandi Sardi J, Freires IA, Fujimaki M, Umeda JE, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on Streptococcus mutans biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018;23:94-8.
47. Sellera FP, Sabino CP, Ribeiro MS, Gargano RG, Benites NR, Melville PA, et al. In Vitro antimicrobial photoinactivation with methylene blue in different microorganisms. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016;13(276-81.
48. Nagai Y, Suzuki A, Katsuragi H, Shinkai K. Effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on the sterilization of infected dentin in vitro. Odontology. 2018;106(2):154-61.
49. Borges CC, Estrela C, Lopes FC, Palma-Dibb RG, Pecora JD, de Araújo Estrela CR, et al. Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with Enterococcus faecalis. J Photochem Photobiol B. 2017;176:1-8.

Anexo

Anexo 1

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental.

Pesquisador: Isabela Barbosa Quero

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 90731518.9.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.820.736

Apresentação do Projeto:

Submissão do Projeto intitulado "Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental".

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o emprego da irradiação do laser de Diodo de baixa potência com protocolos distintos associado a um fotossensibilizador com finalidade de inativar os microrganismos presentes no biofilme bacteriano acumulado sobre a superfície dental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apresentam como risco o possível desconforto com o dispositivo para afastar os lábios e bochechas e ainda o laser pode ferir os olhos caso a luz entre em contato diretamente com o mesmo. Como benefícios com a aplicação do protocolo laser ocorrerá uma possível inativação dos microrganismos presentes no biofilme dentário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cumpre com o preconizado pelo CEP da FORP/USP.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.820.736

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 218ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 09/08/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1089000.pdf	24/07/2018 11:32:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NSF3_menor_pdf.pdf	24/07/2018 11:31:53	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FORP_menor_pdf.pdf	24/07/2018 11:30:47	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	24/07/2018 11:30:22	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	21/05/2018 08:47:56	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Isabela_Quero.pdf	21/05/2018 08:47:41	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CAPP.pdf	21/05/2018 08:43:43	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NSF3.pdf	21/05/2018 08:42:31	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FORP.pdf	21/05/2018 08:41:46	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	FORP.pdf	21/05/2018 08:37:58	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Declaração de	NSF3.pdf	21/05/2018	Isabela Barbosa	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.820.736

Instituição e Infraestrutura	NSF3.pdf	08:37:41	Quero	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Micro.pdf	21/05/2018 08:37:24	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	21/05/2018 08:24:26	Isabela Barbosa Quero	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 14 de Agosto de 2018

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

Anexo 2

USP - CENTRO DE SAÚDE
ESCOLA DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Emprego da Terapia Fotodinâmica na Remissão Microbiológica de Biofilme Supragengival Aderido à Superfície Dental.

Pesquisador: Isabela Barbosa Quero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 90731518.9.3001.5414

Instituição Proponente: Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.833.228

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser desenvolvido por pesquisador da FORP/USP envolvendo o Núcleo de Saúde da Família 3. O projeto já foi aprovado pelo CEP da FOR/USP em 14/08/2018.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o emprego da irradiação do laser de Diodo de baixa potência com protocolos distintos associado a um fotossensibilizador com finalidade de inativar os microrganismos presentes no biofilme bacteriano acumulado sobre a superfície dental.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores apresentam como risco o possível desconforto com o dispositivo para afastar os lábios e bochechas e ainda o laser pode ferir os olhos caso a luz entre em contato diretamente com o mesmo. Como benefícios com a aplicação do protocolo laser ocorrerá uma possível inativação dos microrganismos presentes no biofilme dentário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP. Os pesquisadores são habilitados para execução do mesmo. Relevante para a área da saúde. Bem embasado cientificamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cumpre com o preconizado pelo CEP da FORP/USP. Apresenta TCLE tanto para o participante como

Endereço: TERESINA 690
Bairro: SUMAREZINHO **CEP:** 14.055-380
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0009 **E-mail:** csecuiaba@fmrp.usp.br

USP - CENTRO DE SAÚDE ESCOLA DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.833.228

para o responsável por menor de idade participante com o respectivo termo de assentimento.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovar o projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado "ad referendum" do colegiado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NSF3_menor_pdf.pdf	24/07/2018 11:31:53	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FORP_menor_pdf.pdf	24/07/2018 11:30:47	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	24/07/2018 11:30:22	Isabela Barbosa Quero	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Isabela_Quero.pdf	21/05/2018 08:47:41	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NSF3.pdf	21/05/2018 08:42:31	Isabela Barbosa Quero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_FORP.pdf	21/05/2018 08:41:46	Isabela Barbosa Quero	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: TERESINA 690
Bairro: SUMAREZINHO **CEP:** 14.055-380
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0009 **E-mail:** csecuiaba@fmrp.usp.br

USP - CENTRO DE SAÚDE
ESCOLA DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.833.228

RIBEIRAO PRETO, 21 de Agosto de 2018

Assinado por:
LAÉRCIO JOEL FRANCO
(Coordenador)

Endereço: TERESINA 690
Bairro: SUMAREZINHO **CEP:** 14.055-380
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0009 **E-mail:** csecuiaba@fmrp.usp.br