UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO - FORP
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

ANA CAROLINE FUMES

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE PRÉ-IRRADIAÇÃO EMPREGADO NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Ribeirão Preto

2017

ANA CAROLINE FUMES

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE PRÉ-IRRADIAÇÃO EMPREGADO
NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em ciências – Programa: Odontopediatria.

Área de Concentração: Odontopediatria.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA CRISTINA BORSATO

Ribeirão Preto

2017

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a 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.

ASSINATURA DO AUTOR: _____

DATA: ____/____/2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Fumes, Ana Caroline

Influência do tempo de pré-irradiação empregado na terapia fotodinâmica antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2017.

79 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP).

Orientadora: Borsato, Maria Cristina

1.Terapia fotodinâmica. 2. Biofilme dentário. 3. *Streptococcus mutans*. 4. *Candida albicans*

FUMES, A.C. **Influência do tempo de pré-irradiação empregado na terapia fotodinâmica antimicrobiana.** 2017. 79p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dra. Maria Cristina Borsato (Orientadora)

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

ANA CAROLINE FUMES

Nascimento: 04/01/1988

Filiação: **Antonio Luis Fumes**
Silvana Aparecida Agostinho Fumes

2006 – 2010: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

2011 – 2012: Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico em Pacientes Especiais
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

2011 – 2013: Curso de Especialização em Odontopediatria
Associação Odontológica de Ribeirão Preto – AORP

2011 – 2013: Mestrado em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

2013 – 2017: Doutorado em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

DEDICATÓRIA

A Deus, antes de tudo, por permitir todas as maravilhas em minha vida. Sou extremamente grata pelo que sou e o que tenho, graças a Você.

Aos meus pais, **Antônio Luis Fumes e Silvana Aparecida Agostinho Fumes**, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Vocês são a minha base, meus exemplos para tudo nessa vida. Obrigada por compartilharem e realizarem todos os meus sonhos. Eu não seria nada sem vocês.

À minha irmã, **Ana Júlia Fumes**, por estar sempre presente apesar da distância. Você sempre esteve pronta para me ouvir e me ajudar no que fosse preciso. A tata sente muito a sua falta minha pequena.

Ao meu marido, **Luis Eduardo Miquelutti Morgado**, que enfrentou várias etapas ao meu lado, me ajudou, incentivou e nunca me desanimou. Obrigada por ser meu companheiro em todos os momentos. Obrigada por seu amor.

À minha família, pela presença e apoio que sempre incentivaram meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsato**, pelos ensinamentos, pela paciência e por estar sempre pronta para me atender. Você é um exemplo de sabedoria e dedicação e um modelo de professora ao qual pretendo me espelhar. Cris, queria que todos os pós-graduandos pudessem ser seus orientados. Com certeza a pós-graduação seria muito mais prazerosa se todos os orientadores fossem como você. Obrigada, de coração, por tudo.

Às minhas amigas do doutorado: **Dani e Pri**, vocês foram o meu melhor presente no doutorado. Uma amizade que irá durar pra vida toda. Quero que saibam que vir pra Ribeirão era muito mais fácil quando eu sabia que iria encontrar vocês, seja para irmos ao cinema, ou fazer um programa de gordas, sempre com muita comida. Muito obrigada minhas lindas.

Às minhas queridas **Fer e Fran**, nossos dias na A-33 eram muito divertidos quando estávamos juntas. Sentirei muita falta da convivência diária, de todas as conversas, mas espero que continuemos juntas, apesar da distância. Contem sempre comigo.

Aos colegas de Pós Graduação, **Alessandra Parreira Menino, Ana Paula Dias Moreno, Arthur Cunha da Silva, Carolina Maschietto Pucinelli, Daniela Silva Barroso, Daniele Lucca Longo, Driely Barreiros, Elaine Machado Pinguero, Fernanda Vicioni Marques, Francine Lorencetti da Silva, Guido Artemio Marañón Vasquez, José Guilherme Neves, Juliana Arid, Karina Alessandra Pieroni, Karla Carpio, Larissa Nogueira Soares Ribeiro, Leonardo Gontijo Matos, Mariana Trevizan, Mariana Shirozaki, Mariele Andrade, Marina Mocardini Vilela, Marjorie Ayumi Omori, Nicole Gonçalves Lima, Patrícia Monteiro, Paula Regina Ávila Silvano, Priscilla Coutinho Romualdo e Silvana Aparecida Fernandes Polizeli**, pela experiência compartilhada.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil: **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Andiará de Rossi Daldegan**, **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Prof. Dr. Fabrício Kitozano de Carvalho**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profa. Dra. Mírian Aiko Nakame Matsumoto**, **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani**, **Prof. Dr. Adilson Tomasin**. Vocês me mostraram o quanto a Odontopediatria é uma especialidade difícil ao mesmo tempo em que é encantadora. Obrigada por me "ensinarem a ser dentista".

À **Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona**, pela disponibilidade em ajudar na conclusão desta tese, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e atenção.

Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe**, pela disposição em me receber no seu laboratório, Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde - NEPCISS-EERP-USP, pela confiança, paciência e tranquilidade.

À **Rachel Maciel Monteiro**, aluna de pós-graduação da Faculdade de Enfermagem de Ribeirão Preto, orientada do Prof. Dr. Evandro, por toda a ajuda durante a fase experimental.

À **Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na

pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, pelo privilégio e oportunidade de ser aluna deste programa.

À **Capes** pela bolsa concedida.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil: **Matheus Morelli Zanela, Filomena Leli Placciti, Marco Antonio do Santos, Nilza Letícia Magalhães, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Dra. Marília Pacífico Lucisano, Dr. Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva, Dra. Carolina Torres Mantovani, Rosemary Alves.**

À querida **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, pelo carinho, atenção, disposição e todas as horas de conversa. Muito obrigada Mi, você é uma pessoa muito especial.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, a minha sincera gratidão.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota."*

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

RESUMO

Fumes, A.C. **Influência do tempo de pré-irradiação empregado na terapia fotodinâmica antimicrobiana.** Ribeirão Preto, 2017. 79p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2017.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito de diferentes tempos de pré-irradiação do fotossensibilizador na terapia fotodinâmica em biofilmes formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, por meio da avaliação da carga microbiana. Os fatores em estudo foram: tempos de pré-irradiação do fotossensibilizador em 3 níveis (1, 2 ou 5 minutos). Para o controle do biofilme dentário cariogênico com aPDT foi utilizado o azul de metileno (0,01%) associado ao laser de diodo ($\lambda=660$ nm). O digluconato de clorexidina (CHX a 0,12%) e a solução salina foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O delineamento do estudo foi realizado em blocos completos e casualizados, sendo a amostra composta por 15 culturas de biofilmes de *S. mutans*, divididas aleatoriamente em 5 grupos e 15 culturas de *C. albicans*, também divididas em 5 grupos. O experimento foi realizado em triplicata ($n=3$) e as variáveis de resposta foram obtidas por meio de análise quantitativa da viabilidade bacteriana, expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mm^2 da área do espécime. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Todas as análises foram efetuadas por meio do programa Graph Pad Prism 4.0, com nível de significância de 5%. Para o grupo de *S. mutans*, apenas a solução salina apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada aos demais tratamentos ($p<0.05$), ou seja, o tratamento com aPDT, independentemente do tempo de irradiação aplicado, foi semelhante ao tratamento com CHX e ambos foram mais eficazes na redução do biofilme cariogênico, em comparação à solução salina. Para o grupo de *C. albicans* não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0.05$). Portanto, pode-se concluir que o tratamento com aPDT diminuiu o número de UFCs de *S. Mutans* de forma semelhante à CHX, independentemente do tempo de pré-irradiação aplicado. Não foi possível constatar nenhum efeito desta terapia e dos diferentes tempos de pré-irradiação sobre o biofilme de *C. albicans*. Desta forma, o tempo de pré-irradiação de 1 minuto pode ser utilizado com o objetivo de reduzir a carga microbiana de *S. Mutans*.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, biofilme dentário, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

ABSTRACT

Fumes, A.C. **Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy.** Ribeirão Preto, 2017. 79p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2017.

The aim of the present study was to evaluate, *in vitro*, the effect of different pre-irradiation times of the photosensitizer in photodynamic therapy in biofilms formed by on by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, through the evaluation of the microbial load. The factors under study were: times of pre-irradiation of the photosensitizer in 3 levels (1, 2 or 5 minutes). For the control of the cariogenic dental biofilm with aPDT, methylene blue (0.01%) was used in association with the diode laser ($\lambda=660$ nm). Chlorhexidine digluconate (0.12% CHX) and saline were used as positive and negative controls, respectively. The study design was carried out in complete and randomized blocks. The sample consisted of 15 *S. mutans* biofilms cultures, randomly divided into 5 groups and 15 *C. albicans* cultures, also divided into 5 groups. The experiment was performed in triplicate ($n = 3$) and the response variables were obtained through quantitative analysis of bacterial viability, expressed in colony forming units (CFU) per mm² of the specimen area. The data were analyzed with the aid of the ANOVA one-way test and Tukey's post-test. All analyzes were performed using the Graph Pad Prism 4.0 program, with a significance level of 5%. For the *S. mutans* group, only the saline solution presented a statistically significant difference when compared to the other treatments ($p < 0.05$), that is, the treatment with aPDT, irrespective of the irradiation time applied, was similar to the treatment with CHX and both were more effective in reducing cariogenic biofilm compared to saline. For the group of *C. albicans* there was no statistical difference between the groups ($p > 0.05$). Therefore, it can be concluded that the treatment with aPDT reduced the number of CFUs of *S. Mutans* in a similar way to CHX, independently of the pre-irradiation time applied. No effect of this therapy or of the different pre-irradiation times on the *C. albicans* biofilm could be observed. In this way, the pre-irradiation time of 1 minute can be used to reduce the microbial load of *S. mutans*.

Key words: Photodynamic therapy, dental biofilm, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	35
2. PROPOSIÇÃO	41
3. MATERIAL E MÉTODO	45
3.1 Delineamento experimental	47
3.2 Preparação dos espécimes	47
3.4 Formação do Biofilme.....	49
3.5 Tratamentos do biofilme	50
3.6 Coleta do biofilme.....	51
3.7 Viabilidade dos micro-organismos	51
3.8 Análise estatística	52
4. RESULTADOS	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por mais de 1.000 espécies de micro-organismos (Wilson, 2004; Zanin *et al.*, 2006), incluindo vírus, protozoários, fungos e bactérias que se interagem homeostaticamente. Quando o equilíbrio biológico é rompido, as doenças podem se manifestar (Socransky *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2009; Wade, 2013). Na presença de carboidratos fermentáveis ocorre a diminuição do pH, com aumento do acúmulo e maturação do biofilme microbiano, gerando um ambiente favorável para a formação de lesões de cárie (Anhoury *et al.*, 2002; Iwano *et al.*, 2010).

A lesão de cárie é causada principalmente pelas bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus* spp. (Iwano *et al.*, 2010; Nelson-Filho *et al.*, 2011; Saravia *et al.*, 2013). *Candida* spp. também interagem com *S. mutans* e *Lactobacillus*, favorecendo a criação de um microambiente com pH ácido (Metwalli *et al.*, 2013; Falsetta *et al.*, 2014). Alguns estudos suportam a hipótese de que há uma significativa associação entre a presença de *Candida albicans* e cárie precoce em crianças (De Carvalho *et al.*, 2006; Fragkou *et al.*, 2016).

As leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade bucal de indivíduos saudáveis e a *C. albicans* é a espécie mais prevalente, totalizando 60-70%, seguida por *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (Stenderup, 1990). Estes micro-organismos são, geralmente, comensais, mas entre certos indivíduos e em situações específicas, podem se tornar parasitas, causando candidoses bucais (Samaranayake e Macfarlane, 1981; Farah *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, a candidose se tornou importante devido ao elevado número de indivíduos imunocomprometidos como pacientes associados ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), uso de imunossupressores após transplantes de órgãos e terapias antineoplásicas (Allen, 1994).

A maioria das infecções bucais causadas por *C. albicans* são tratadas pela aplicação tópica de antifúngicos da classe dos polienos, tais como nistatina e anfotericina B. Entretanto, nas candidoses bucais associadas ao HIV, estes agentes podem não ser eficazes e a administração de cetoconazol, fluconazol ou itraconazol pode ser necessária (Allen, 1994). O uso generalizado de antifúngicos tópicos e sistêmicos entre os pacientes infectados pelo HIV resultou em um aumento do número de micro-organismos isolados resistentes à esta terapia. Esta resistência

está associada principalmente à imunossupressão grave, reincidência de infecções e tratamentos prolongados (Teichert *et al.*, 2002).

Na Odontopediatria, o digluconato de clorexidina tem sido indicado por períodos limitados e para casos específicos como gengivite, alta atividade de cárie, contagem elevada de *S. mutans* na saliva e para pacientes com incapacidade de exercer uma adequada higiene bucal (Lang *et al.*, 1982; Spets-Happonen *et al.*, 1991; Ullbro *et al.*, 2005; Venkatesh Babu *et al.*, 2011). Apresenta amplo espectro de ação (Matthijs e Adriaens, 2002), capacidade de interação com a película adquirida do biofilme, as superfícies dentais, a mucosa bucal e a parede celular bacteriana, alterando o equilíbrio osmótico e levando a perda da integridade da membrana celular, acarretando na morte da bactéria (Ccahuana-Vasquez e Cury, 2010). O digluconato de clorexidina é considerado o padrão ouro, no entanto, seu uso por períodos prolongados é contraindicado devido seus efeitos adversos relacionados ao manchamento de língua e restaurações, alteração do paladar e formação de cálculo supragengival (Ciancio, 1989; Addy *et al.*, 1991).

Devido aos efeitos adversos do digluconato de clorexidina novos métodos para o controle do biofilme estão sendo preconizados, dentre eles a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). Esta terapia é baseada na interação de uma fonte de luz com um fotossensibilizador que, na presença de oxigênio, leva à formação de oxigênio singleto e radicais livres que são citotóxicos aos micro-organismos. Desta forma, a morte das bactérias ocorre, principalmente, por danos no DNA e na membrana citoplasmática (Soukos e Goodson, 2011).

Para que a aPDT possa ser efetiva é necessário que a molécula do fotossensibilizador absorva fótons de luz saindo do seu estado fundamental para o estado excitado (singleto) (Dougherty *et al.*, 1998; Konan *et al.*, 2002). A molécula no estado singleto pode voltar ao estado fundamental, emitindo um fóton de energia luminosa (fluorescência) ou ser convertido a um estado excitado tripleto por cruzamento intersistemas envolvendo uma mudança no spin do elétron (Ochsner, 1997).

Na aPDT são utilizadas diferentes fontes de luz, como luz branca, (Wood *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2006), laser de He/Ne (Burns *et al.*, 1993; 1995; Wilson *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 2002; Zanin *et al.*, 2005), luz LED (Zanin *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2006) e laser de diodo (Burns *et al.*, 1994; Guglielmi Cde *et al.*, 2011). Os lasers de baixa potência apresentam vantagens em relação aos demais tipos de fonte de luz,

por apresentarem um espectro estreito de ação que permite uma interação mais específica com os fotossensibilizadores (Bevilacqua *et al.*, 2007; Prates *et al.*, 2007). Dentre esses tipos de lasers, o laser diodo vem sendo estudado tanto em estudos *in vitro* (Burns *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012) como *in vivo* (Guglielmi Cde *et al.*, 2011; Longo *et al.*, 2012), sendo que alguns desses estudos associam esse laser ao azul de metileno (Muller *et al.*, 2007; Guglielmi Cde *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012)

A aPDT vem sendo estudada em diferentes áreas, como a Periodontia, em que foi demonstrado a eficácia dessa terapia para a redução do número de bactérias periodontopatogênicas em estudos *in vitro* (Wilson *et al.*, 1993; Soukos *et al.*, 2003; Goulart Rde *et al.*, 2010; Street *et al.*, 2010) e *in vivo* (Komerik *et al.*, 2003). Foram observados resultados promissores com a utilização do laser de diodo associado ao azul de metileno como terapia auxiliar aos tratamentos básicos de raspagem e alisamento radicular (Sigusch *et al.*, 2010; Cappuyns *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2015). Na Dentística, no que se refere às lesões cariosas parece que essa técnica poderia ser utilizada tanto na prevenção, interferindo no biofilme cariogênico, como na Odontologia minimamente invasiva reduzindo o número de bactérias remanescentes após preparos cavitários (Wilson, 2004). Na Endodontia, a eficácia da aPDT tem sido avaliada *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Soukos *et al.*, 2006; Foschi *et al.*, 2007; Fimple *et al.*, 2008; Garcez *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2011; Borsatto *et al.*, 2016), como também em revisões sistemáticas da literatura (Chrepa *et al.*, 2014; Trindade *et al.*, 2015), demonstrando resultados satisfatórios.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana exibe diversas vantagens em relação aos antimicrobianos de uso tópico e antibióticos usados na Odontologia como delimitação do efeito local pela aplicação do fotossensibilizador, morte bacteriana obtida em um curto período de tempo, evita o processo de resistência bacteriana e ausência de reações sistêmicas ou mutagênicas (Wilson, 2004; Konopka e Goslinski, 2007; Soukos e Goodson, 2011).

Estudos realizados demonstraram que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva na redução do número de bactérias cariogênicas, sob a forma de modelos de biofilmes (Wilson *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1999; Zanin *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2006; Zanin *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2011; Guglielmi Cde *et al.*, 2011; Mang *et al.*, 2012). No entanto, a fotossensibilização letal ocorre nas camadas mais superficiais do biofilme (O'Neill *et al.*, 2002). Esse fato pode ser devido à

incapacidade do fotossensibilizador se difundir para camadas mais internas ou da fonte de luz não ser completamente transmitida para essas camadas (O'Neill *et al.*, 2002; Guglielmi Cde *et al.*, 2011). O tempo de pré-irradiação é um fator importante para a difusão do fotossensibilizador através do biofilme cariogênico (Guglielmi Cde *et al.*, 2011). Embora haja inúmeros trabalhos em que a aPDT age no biofilme dentário (Wood *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2011), estes utilizam tempos de pré-irradiação distintos. Assim, faz-se necessário à implementação de estudos que avaliem o tempo de pré-irradiação para que seja definido um protocolo de utilização para a aPDT.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito do tempo de pré-irradiação do fotossensibilizador na terapia fotodinâmica em biofilmes formados por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, por meio da avaliação da carga microbiana.

3. MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram: tempos de pré-irradiação do fotossensibilizador em 3 níveis (1 min, 2 min, 5 min). Para o controle dos biofilmes dentários cariogênicos *in vitro* com aPDT foram utilizados o azul de metileno a 0,01% associado ao laser de diodo ($\lambda = 660$ nm) (Guglielmi et al., 2011). Para o controle positivo foi utilizado digluconato de clorexidina – CHX a 0,12% e para o grupo controle negativo, solução fisiológica. O delineamento do estudo foi realizado em blocos completos e casualizados, sendo a amostra composta por 15 culturas de biofilmes de *Streptococcus mutans*, divididas aleatoriamente em 5 grupos e 15 culturas de *Candida albicans*, também divididas em 5 grupos. A amostra do experimento foi realizada em triplicata ($n=3$) e as variáveis de resposta foram obtidas por meio de análise quantitativa da viabilidade bacteriana expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mm^2 da área do espécime.

3.2 Preparação dos espécimes

Foram confeccionados, a partir de uma matriz de teflon circular com um orifício central, 30 discos em resina acrílica de 3 mm de diâmetro por 2 mm de espessura, conforme ilustra a figura 1. A manipulação da resina acrílica autopolimerizável (pó e líquido) (JET – Artigos Odontológicos Clássico Ltda., Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Previamente, o orifício da matriz foi isolado com líquido isolante (Cel – Lac, S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para que a resina acrílica não fosse aderida à matriz. A resina manipulada foi inserida no orifício e prensada com uma placa de vidro por 10 minutos. Após o tempo de presa, o disco em resina acrílica foi removido da matriz para realizar o acabamento, removendo-se os excessos da resina com lâmina de bisturi nº15.

A análise dos discos de resina acrílica foi realizada com lupa estereoscópica (Leica S6D Stereosom, Leica Microsystems Argóvia, Suíça) com aumento de 40x. Aqueles que apresentaram bolhas de ar ou falhas foram removidos do estudo. Os discos de resina acrílica selecionados foram envoltos por um dispositivo de fio ortodôntico para amarrilho CrNi redondo diâmetro 0,20 mm (.008”) (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil). O fio foi trançado com porta-agulha Mathieu

(Ortho-pli, Filadélfia, Pensilvânia, EUA) até atingir 1,5 cm de comprimento. Outro fio ortodôntico Morest Standart CrNi retangular 0,48 mm x 0,63 mm (.019" x 0.25") (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) de 2,5 cm foi colado perpendicularmente ao fio de amarrilho com cola instantânea (Super bonder, Locitite, Henkel Ltda., Itapevi, SP, Brasil), conforme ilustra a figura 2. Esse dispositivo foi confeccionado com a finalidade de facilitar a manipulação do espécime e de mantê-lo imerso no meio de cultura líquido.

Figura 1 - Matriz de teflon com espaçador e resina acrílica para confecção do espécime.

Figura 2 - Dispositivo elaborado para facilitar a manipulação antes (a) e depois (b) da colagem.

3.3 Esterilização dos espécimes

Os espécimes (dispositivo em aço + disco de resina acrílica) foram embalados em papel grau cirúrgico e submetidos ao processo de esterilização no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A esterilização foi feita por meio de um equipamento de Raios-X (Rad Source; Modelo RS-2000). Os

parâmetros utilizados incluíram potencial de energia de 160 KVp, corrente de 25 mAs e filtro de 0,3 mmCu. A dose aplicada foi de 100 Gray por 760 segundos.

3.4 Formação do Biofilme

O protocolo de produção de biofilme monoespécie foi empregado para a formação do biofilme dentário por meio da cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175) e meio de cultura CaSaB - Caldo Sacarose Bacitracina a 20% (Barbosa *et al.*, 2009). Os espécimes foram mantidos em placa de 24 poços (figura 3), que foi incubada em estufa sob agitação orbital por 80 rpm (Q816M22 – Quimis Aparelhos Científicos LTDA – Rua Gema 278/292 – Jd. São Judas Tadeu – Diadema – SP) a 37°C por 48h. Por outro lado, o meio de cultura *Sabouraud Dextrose Broth* (BD, EUA) foi usado para a formação do biofilme dentário com a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) seguindo o mesmo protocolo de incubação do *S. mutans*. A padronização dos inóculos bacteriano (10^8 UFC/mL) e fúngico (10^6 UFC/mL) foram realizados com auxílio do Multiskan®Go® (Thermo Electron Corporation, Alemanha), em comprimento de onda de 625 nm e absorbâncias entre 0,08 a 0,100. Os inóculos bacteriano e fúngico foram diluídos (1:10) nos respectivos meios de cultura para obtenção de cargas microbianas de 10^7 e 10^5 UFC/mL, respectivamente.

Figura 3 - placa de 24 poços com os espécimes e biofilme formado

3.5 Tratamentos do biofilme

Os biofilmes formados na superfície dos espécimes foram submetidos a um dos 5 tratamentos (n=3): Digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX, controle positivo); Solução fisiológica (NaCl a 0,85%, controle negativo); Terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno e laser de baixa potência com tempo de pré-irradiação de 1 min (aPDT 1 min); 2 min (aPDT 2 min) e 5 min (aPDT 5 min).

Para o grupo controle positivo (Grupo CHX), os espécimes foram imersos em 2 mL dessa solução durante 1 minuto. Os espécimes do grupo NaCl foram imersos em 2 mL de solução fisiológica (Grupo NaCl) durante 1 minuto.

Nos grupos que foram empregados a terapia fotodinâmica antimicrobiana (grupos aPDT 1 min, aPDT 2 min e aPDT 5 min), os espécimes com biofilme foram imersos em 2 mL do corante azul de metileno por períodos de 1 minuto, 2 minutos e 5 minutos, respectivamente. O laser de baixa potência utilizado foi um laser de diodo, fosfato de alumínio índio gálio (InGaAlP) (Whitening Lase II – DMC, São Carlos, SP, Brasil) com um comprimento de onda de 660 nm, diâmetro da fibra de 600 μm e potência de 100 mW, densidade de energia de 640 J/cm^2 , tempo de irradiação de 180 segundos em cada área circular do espécime e energia total de 18 J. A figura 4 ilustra a aplicação do laser e um dos espécimes.

Após os tratamentos, os espécimes de todos os grupos foram lavados três vezes com solução fisiológica para remoção do excesso das soluções utilizadas nos tratamentos (Ccahuana-Vásquez; Cury 2010). O experimento foi realizado em Cabine de Segurança Biológica Classe II tipo A1 (VECO, Campinas, SP, BR) e todos os procedimentos que envolveram o corante azul de metileno e o digluconato de clorexidina foram realizados no escuro ou sob luz extremamente suave para evitar a ocorrência de fototoxicidade não intencional.

Figura 4 - Aplicação do laser durante a terapia fotodinâmica antimicrobiana.

3.6 Coleta do biofilme

Após a aplicação dos métodos de controle do biofilme e lavagem em solução fisiológica, os espécimes foram transferidos individualmente para microtubos *Eppendorf* (1,5 mL) contendo 1 mL de *Letheen Broth* (BD, EUA) e pérolas de vidro, previamente identificados. As amostras (Eppendorf + espécime + biofilme) foram homogeneizadas em agitador de tubos AP-56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, São Paulo, Brasil) por 3 minutos. A suspensão resultante foi submetida às diluições decimais seriadas (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000;) em microtubos *Eppendorf* com 450 µL de solução fisiológica. Alíquotas das amostras *in natura* e diluídas foram utilizadas para determinar a viabilidade do biofilme microbiano.

3.7 Viabilidade dos micro-organismos

Para avaliação da viabilidade dos micro-organismos, alíquotas de 50 µL de cada amostra *in natura* e diluída foram semeadas na superfície de placas de Petri (90x15 mm) com SB20 - Ágar Sacarose Bacitracina a 20% (Paranhos *et al.*, 2009) para o *S. mutans* e placas de Petri (60x15 mm) com *Sabouraud Dextrose Agar* (BD, EUA) para *C. albicans* (Figura 5) e incubação a 37°C por 48 horas em microaerofilia (jarra com vela) e aerobiose, respectivamente. A contagem dos micro-organismos viáveis foram determinada com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon, Japão) sob luz refletida e expressa em UFC por mm² de área do espécime.

Figura 5 - Aliquotas da suspensão sendo plaqueada na placa com SB20.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a testes específicos para verificação da normalidade. Os resultados foram analisados com o auxílio do teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Todas as análises foram efetuadas por meio do programa Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA), com nível de significância de 5%.

4. *RESULTADOS*

4. RESULTADOS

Os resultados, descritos na Tabela 1, mostram a média e o desvio padrão de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por mm^2 do espécime, para o grupo de *S. mutans*.

Tabela 1 - Média e desvio padrão de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por mm^2 , para o grupo de *S. mutans*. Os resultados estão expressos em log.

Tratamentos	NaCl	CHX	aPDT 1min	aPDT 2min	aPDT 5min
Média	5,033	2,325	1,083	1,067	1,450
Desvio Padrão	0,1155	0,7932	1,227	1,209	1,224

Pode-se observar por meio da Figura 6 que apenas a solução fisiológica apresentou diferença estatisticamente significante quando comparada aos demais tratamentos ($p < 0.05$), ou seja, o tratamento com aPDT, independentemente do tempo de irradiação aplicado, foi semelhante ao tratamento com CHX e ambos foram mais eficazes na redução do biofilme cariogênico, em comparação à solução salina.

Figura 6 - Gráfico da relação entre os tratamentos realizados e as UFCs para o grupo *S. mutans*. Letras diferentes indicam diferença estatística.

A Tabela 2 mostra a média e o desvio padrão de UFCs por mm² do espécime, para o grupo de *C. albicans*.

Tabela 2 - Média e desvio padrão de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) por mm², para o grupo de *C. albicans*. Os resultados estão expressos em log.

Tratamentos	NaCl	CHX	aPDT 1 min	aPDT 2 min	aPDT 5 min
Média	3,500	3,000	3,622	3,067	3,478
Desvio Padrão	0,4637	0,3969	0,4024	0,5523	0,7328

Ao analisarmos a Figura 7, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0.05$), ou seja, nenhum tratamento foi eficaz na redução do biofilme composto por *C. albicans*.

Figura 7 - Gráfico da relação entre os tratamentos realizados e as UFCs para o grupo *C. albicans*. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística.

5. *DISCUSSÃO*

5. DISCUSSÃO

O uso da aPDT para inativar micro-organismos tem sido amplamente pesquisado (Zanin *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2014) e os resultados sugerem que essa terapia é eficiente (Guglielmi Cde *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2015). No entanto, algumas dúvidas e simplificações do método de aplicação podem e devem ser implementadas. Este trabalho teve como hipótese de que se a diminuição do tempo de pré-irradiação poderia ser proposta uma vez que na clínica, por meio de um estudo piloto, ficou constatada a dificuldade da criança manter sua boca aberta durante 5 minutos para ação do corante, antes da irradiação com laser. Assim, os resultados deste estudo mostraram que a aPDT foi tão eficiente quanto a clorexidina para diminuir o número de *S. mutans*, independente do tempo de pré-irradiação (1 min, 2 min ou 5 min). Este resultado traz benefícios para os pacientes, uma vez que a aPDT não causa efeitos colaterais como a clorexidina. Por outro lado, para a *C. albicans*, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Este resultado está de acordo com o estudo de (Coimbra *et al.*, 2016), em que um dos agentes antimicrobianos avaliado foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de *S. mutans*, mas não apresentou efeito sobre a *C. albicans*. É importante ressaltar que Coimbra *et al.* (2016), não utilizaram a terapia fotodinâmica, mas apenas agentes antimicrobianos.

A boca é colonizada por uma comunidade diversa e numerosa de bactérias. Elas estão presentes na forma de biofilme em superfícies dentais, materiais restauradores, aparatos ortodônticos, implantes dentais, dentre outros (Wilson, 2001). Diferentes espécies de *Streptococcus* (*sobrinus*, *mutans* e *sanguinis*) representam as bactérias mais comumente encontradas no ambiente bucal (Wainwright, 1998). As diferentes espécies de *Candida* são distribuídas de modo uniforme pela boca. A área mais comum de isolamento é o dorso da língua, particularmente na área posterior perto da papila circunvalada. O isolamento de *Candida* é exacerbado por meio de dispositivos intrabuciais, como dentaduras de resina ou aparelhos ortodônticos. Foi demonstrado que a *C. albicans* é encontrada na boca de aproximadamente metade da população. Neste sentido, atualmente, como pacientes infantis têm sido diagnosticados com diferentes maloclusões e, desta forma, a necessidade de serem instalados aparelhos ortodônticos removíveis

nestas crianças, torna-se de fundamental importância a avaliação de uma técnica que seja eficaz na eliminação destes micro-organismos.

Estruturalmente, fungos e bactérias apresentam-se de modo diferente, sendo que o *S. mutans* é constituído de parede celular com antígenos de carboidratos, ácido lipoteicóico, lipoproteínas e proteínas (Marsh e Martin, 2005). Tem-se observado que a *C. albicans* e outros fungos apresentam maior resistência quando comparados com as bactérias gram-positivas. Este fato pode estar relacionado à presença de uma membrana nuclear na estrutura dos fungos, ao tamanho celular e ao número reduzido de alvos de oxigênio singlete (Pereira *et al.*, 2011). Outro aspecto relacionado à resistência aos antifúngicos e a recorrência da infecção é a elevada capacidade da *Candida* spp. em formar biofilme sobre superfícies rígidas (Chandra *et al.*, 2001). O principal fungo capaz de formar biofilme é a *C. albicans*. Além disso, esse fenótipo é menos susceptível aos agentes antimicrobianos em comparação com a forma planctônica (Ramage, Wickes, *et al.*, 2001)

Na etiologia da cárie dentária estão envolvidos os biofilmes bucais (Marsh, 2010). Sabe-se que micro-organismos de biofilmes são menos susceptíveis à terapias antimicrobianas quando comparados aos planctônicos (Davey e O'toole G, 2000) devido a presença de substâncias poliméricas extracelulares, a composição da parede celular, a taxa de crescimento, a atividade metabólica e de expressão de genes (Costerton *et al.*, 1999). Na literatura, pode-se encontrar estudos que demonstrem que a aPDT age em culturas planctônicas (Williams *et al.*, 2003; Bevilacqua *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010) e quando estão na forma de biofilme (Zanin *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2011). Em geral, os estudos que avaliaram a aPDT têm relatado que sua maior eficácia ocorre quando o micro-organismo está na forma planctônica, promovendo uma fotoinativação completa (Dovigo, Pavarina, Carmello, *et al.*, 2011; Dovigo, Pavarina, Mima, *et al.*, 2011). No entanto, quando micro-organismos são organizados em biofilme, apenas uma redução no número de micro-organismos é observada (Dovigo, Pavarina, Carmello, *et al.*, 2011; Dovigo, Pavarina, Mima, *et al.*, 2011; Quishida *et al.*, 2015). Na boca, as bactérias e os fungos apresentam-se na forma de biofilme. Quando as células são organizadas em biofilme estas apresentam propriedades fenotípicas distintas em relação à planctônica e se tornam menos susceptíveis aos antimicrobianos (Sousa *et al.*, 2016). No presente estudo foi utilizado biofilme de *S. mutans* e de *C. albicans* separadamente e não micro-organismos planctônicos. Desta forma, encontramos

uma maior resistência na eficácia da aPDT, uma vez que todos os tratamentos dos grupos experimentais foram incapazes de inibir completamente a viabilidade microbiana. De acordo com (Ramage, Vandewalle, *et al.*, 2001), há uma relação proporcional entre o aumento da densidade celular, resultante do tempo de desenvolvimento do biofilme e o aumento da sua atividade metabólica. Esses autores também observaram um aumento na resistência de biofilmes maduros ao tratamento antifúngico convencional quando comparados com as culturas planctônicas.

Em relação as candidoses, a aPDT pode compensar algumas limitações dos antifúngicos, uma vez que as células fotossensibilizadas não sofrem mutação. Além disso, os mecanismos antimicrobianos da aPDT não dependem especificamente de um alvo e causam danos a diversos componentes celulares. Dessa maneira, parece pouco provável que os micro-organismos desenvolvam alguma resistência a essa terapia (Pereira Gonzales e Maisch, 2012). Desta forma, torna-se de fundamental importância o estudo de técnicas que inativem este tipo de micro-organismo sem causar efeitos colaterais como a clorexidina e também não selecionar micro-organismos resistentes como muitos antifúngicos. Foram demonstrados em estudos *in vitro* que a terapia fotodinâmica foi eficaz em eliminar *Candida* spp. em culturas planctônicas (Wilson e Mia, 1993; Munin *et al.*, 2007; Giroldo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010), e reduzi-las em biofilme (Chabrier-Rosello *et al.*, 2005; Donnelly *et al.*, 2007) utilizando azul de metileno (Wilson e Mia, 1993; Munin *et al.*, 2007; Giroldo *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010), azul de toluidina (Wilson e Mia, 1993; Donnelly *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2010), photofrin (Chabrier-Rosello *et al.*, 2005), tioninas (Wilson e Mia, 1993), porfirinas (Cormick *et al.*, 2009), ftalocianina (Wilson e Mia, 1993; So *et al.*, 2010) e verde de malaquita (Souza *et al.*, 2010).

O digluconato de clorexidina é o antimicrobiano mais utilizado na Odontologia e auxilia no controle mecânico do biofilme (Varoni *et al.*, 2012), porém, causa inúmeros efeitos colaterais como manchamento de restaurações, alteração do paladar, dentre outros (Ciancio, 1989; Addy *et al.*, 1991). Em altas concentrações, a clorexidina é bactericida e age como um detergente por causar danos à membrana celular. É independente e, conseqüentemente, se liga às superfícies bucais de onde é liberada gradualmente na saliva durante muitas horas em concentrações bacteriostáticas (Marsh e Martin, 2005), característica essa, conhecida como substantividade. Embora seja considerado o “padrão ouro” para o controle do

biofilme, o estudo por outros métodos de controle vem sendo realizada. Neste estudo, para o *S. mutans*, a clorexidina apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com a solução fisiológica, mas não eliminou todas as bactérias. Provavelmente, isto ocorreu devido ao fato de que as amostras ficavam em contato com a solução por apenas 1 minuto e, logo em seguida, eram lavadas em solução fisiológica, impossibilitando que o efeito de substantividade fosse alcançado. Além disso, o *Letheen Broth* utilizado no processamento do biofilme neutraliza compostos que apresentam atividade antimicrobiana. Diferentemente, o estudo de (De Sousa Farias *et al.*, 2016) utilizou o protocolo de produção de biofilme monoespécie em modelo de “Miséria e Fartura” descrito por (Ccahuana-Vasquez e Cury, 2010), com duração de 5 dias e foi observado que a clorexidina foi capaz de inativar o biofilme de *S. mutans*.

O laser é diferente das outras fontes de luz como a luz branca ou LED (diodo emissor de luz) por ser monocromático (todos os fótons de luz emitidos apresentam o mesmo comprimento de onda) e o laser é passível de ser colimado, ou seja, focalizado em um ponto. Inicialmente, os lasers mais utilizados na Odontologia eram de hélio-neônio (633 nm) (O'Neill *et al.*, 2002; Zanin *et al.*, 2005). Atualmente, o laser de diodo (630-690, 830 ou 906 nm) (Wilson *et al.*, 1996; Guglielmi Cde *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012; Ricatto *et al.*, 2014) representa um dos lasers mais utilizados em estudos de aPDT na Odontologia. Neste estudo, o laser utilizado foi o diodo AsGaAl ($\lambda = 660\text{nm}$; 640 J/cm^2 ; 100 mW; 180 s; 18 J). Este laser foi escolhido por ser de fácil utilização, portátil e de baixo custo, por isso é um laser que pode ser indicado para aPDT. Além disso, apresenta um espectro estreito que permite uma interação mais específica com o fotossensibilizador (Soukos e Goodson, 2011). Os parâmetros do laser utilizados nesse trabalho foram os mesmos utilizados por Guglielmi Cde *et al.* (2011) e De Sousa Farias *et al.* (2016), que observaram uma redução significativa da viabilidade dos estreptococos do grupo *mutans*, *Lactobacillus* spp. e bactérias totais (De Sousa Farias *et al.*, 2016), e avaliaram, ainda, a diferença entre a densidade de energia de 320 J/cm^2 e 640 J/cm^2 , demonstrando uma maior eficiência na morte celular de bactérias com 640 J/cm^2 . Portanto, utilizamos a mesma densidade e o mesmo tempo, uma vez que foram obtidos resultados favoráveis utilizando estes parâmetros.

Em relação aos corantes, existe uma variedade de fotossensibilizadores e dentre eles, os corantes azuis são os mais frequentemente utilizados (O'Neill *et al.*,

2002; Zanin *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2006; Bevilacqua *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009). O azul de metileno e o azul de toluidina são conhecidos como sais fenotiazínicos e são capazes de absorver eficientemente a luz vermelha, sendo o azul de metileno um dos corantes mais utilizados em trabalhos experimentais e aplicações clínicas em Odontologia (Cieplik *et al.*, 2014). A aPDT deve ser utilizada selecionando-se corretamente a fonte de luz cujo comprimento de onda coincida com o espectro de ativação do corante (Prates *et al.*, 2007; Gursoy *et al.*, 2013). O azul de metileno foi utilizado como fotossensibilizador neste estudo por apresentar propriedades satisfatórias, tais como, baixa toxicidade às células humanas, alta taxa de absorção no seu comprimento de onda e geração de espécies de oxigênio reativo que são citotóxicas para as bactérias (Usacheva *et al.*, 2003; Wainwright, 2005). Além disso, devido à sua carga positiva, o azul de metileno é capaz de penetrar de forma mais eficiente nas paredes celulares de micro-organismos carregados negativamente, melhorando a ação da aPDT.

O processo fotodinâmico requer o uso de um fotossensibilizador associado à uma luz que seja ativada pelo comprimento de onda da luz utilizada (Allison *et al.*, 2008). A interação da luz com o corante resulta em espécies de oxigênio reativas capazes de induzir a morte microbiana (Konopka e Goslinski, 2007; Cieplik *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado que os lasers de diodo combinados com azul de metileno são capazes de promover a fotossensibilização letal de bactérias cariogênicas (Ricatto *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2015). Além disso, foram observadas imagens de microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *Enterococcus faecalis*, após a exposição à aPDT com a utilização do azul de metileno combinado ao laser de diodo, e reportaram a ocorrência de um grande dano na estrutura do biofilme (Kishen *et al.*, 2010; Garcez *et al.*, 2013).

O tempo de pré-irradiação é um fator importante para que o corante penetre no biofilme (Guglielmi Cde *et al.*, 2011). Neste estudo foi avaliada a aPDT com três tempos de pré-irradiação, 1 min, 2 min e 5 min e foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa na redução do número de micro-organismos entre os diferentes tempos, nos dois grupos estudados (*S. mutans* e *C. albicans*). Desta forma, quando for realizado tratamento com a aPDT utilizando este protocolo, ou seja, laser de diodo, fosfato de alumínio índio gálio (InGaAlP) com um comprimento de onda de 660nm, diâmetro da fibra de 600 µm, potência de 100mW, densidade de energia de 640 J/cm², tempo de irradiação de 180 segundos e energia

total de 18J associado ao azul de metileno, pode ser indicado 1 minuto de pré irradiação. Este tempo será suficiente para reduzir o número *S. mutans* do biofilme.

Apesar de este trabalho ser um estudo *in vitro* e não poder ser extrapolado para a clínica, nossos resultados contribuem para futuros estudos aplicando a aPDT em crianças, uma vez que foi observado que o tempo de pré-irradiação pode ser diminuído. O atendimento infantil muitas vezes é dificultado pelo comportamento das crianças e requer muita agilidade. Pode ser que com um tempo de trabalho menor a criança colabore mais com o tratamento. Além disso, a aPDT não apresenta sabor desagradável, não causa dor ou nenhum outro desconforto para o paciente, sendo vantajosa em comparação às técnicas convencionais de controle do biofilme.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo *in vitro*, pode-se concluir que o tratamento com aPDT, utilizando azul de metileno associado ao laser de diodo, reduziu o número de UFCs de *S. Mutans* independentemente do tempo de pré-irradiação aplicado. Não foi possível constatar nenhum efeito desta terapia e dos diferentes tempos de pré-irradiação sobre o biofilme de *C. albicans*. Desta forma, durante este tipo de tratamento o tempo de pré-irradiação de 1 minuto pode ser utilizado com o objetivo de reduzir o número de UFCs de *S. Mutans*.

REFERÊNCIAS

- Addy M, Wade W, Goodfield S. Staining and antimicrobial properties in vitro of some chlorhexidine formulations. *Clin Prev Dent*. 1991;13(1):13-7.
- Allen CM. Animal models of oral candidiasis. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(2):216-21.
- Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2008;5(1):19-28.
- Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod*. 2002;72(4):338-43.
- Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci*. 2014;29(2):629-35.
- Barbosa RE, do Nascimento C, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, de Albuquerque RF, Jr. Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants. *J Prosthodont*. 2009;18(5):376-81.
- Basso FG, Oliveira CF, Fontana A, Kurachi C, Bagnato VS, Spolidorio DM, et al. In Vitro effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J*. 2011;22(6):502-10.
- Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A, Jr., Teodoro GR, Zangaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(6):513-8.
- Borsatto MC, Correa-Afonso AM, Lucisano MP, Bezerra da Silva RA, Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, et al. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. *Int Endod J*. 2016;49(6):511-8.
- Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 1995;29(3):192-7.
- Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent*. 1994;22(5):273-8.
- Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol*. 1993;38(6):401-5.
- Cappuyns I, Cionca N, Wick P, Giannopoulou C, Mombelli A. Treatment of residual pockets with photodynamic therapy, diode laser, or deep scaling. A randomized, split-mouth controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2012;27(5):979-86.

Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz Oral Res. 2010;24(2):135-41.

Chabrier-Rosello Y, Foster TH, Perez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of Candida albicans germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4288-95.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001;80(3):903-8.

Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. J Endod. 2014;40(7):891-8.

Ciancio SG. Adjunctive uses of topical antimicrobial mouthrinses. Am J Dent. 1989;2 Spec No:299-302.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. Front Microbiol. 2014;5:405.

Coimbra FC, Salles MM, De Oliveira VC, Macedo AP, Da Silva CH, Pagnano VO, et al. Antimicrobial efficacy of complete denture cleansers. Am J Dent. 2016;29(3):149-53.

Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M, Durantini EN. Photodynamic inactivation of Candida albicans sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. Eur J Med Chem. 2009;44(4):1592-9.

Costa AC, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AK, Beltrame Junior M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of planktonic cultures of Streptococcus mutans to photodynamic therapy with a light-emitting diode. Braz Oral Res. 2010;24(4):413-8.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999;284(5418):1318-22.

Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(4):847-67.

de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and Candida spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Arch Oral Biol. 2006;51(11):1024-8.

de Sousa Farias SS, Nemezio MA, Corona SA, Aires CP, Borsatto MC. Effects of low-level laser therapy combined with toluidine blue on polysaccharides and biofilm of Streptococcus mutans. Lasers Med Sci. 2016;31(5):1011-6.

Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3):511-8.

Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1):59-69.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbélik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(12):889-905.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med*. 2011;43(9):927-34.

Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*. 2011;54(2):123-30.

Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81.

Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000;18(5):553-62.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008;34(6):728-34.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):782-7.

Fragkou S, Balasouli C, Tsuzukibashi O, Argyropoulou A, Menexes G, Kotsanos N, et al. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Candida albicans* in oral samples from caries-free and caries-active children. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2016;17(5):367-75.

Garcez AS, Nunez SC, Azambuja N, Jr., Fregnani ER, Rodriguez HM, Hamblin MR, et al. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(11):519-25.

Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*. 2008;34(2):138-42.

Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009;24(1):109-12.

Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G, Jr., Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S53-60.

Guglielmi Cde A, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt*. 2011;16(8):088003.

Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig*. 2013;17(4):1113-25.

Iwano Y, Sugano N, Matsumoto K, Nishihara R, Iizuka T, Yoshinuma N, et al. Salivary microbial levels in relation to periodontal status and caries development. *J Periodontal Res*. 2010;45(2):165-9.

Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol*. 2010;86(6):1343-9.

Komerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):932-40.

Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002;66(2):89-106.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007;86(8):694-707.

Lang NP, Hotz P, Graf H, Geering AH, Saxer UP, Sturzenberger OP, et al. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *J Periodontal Res*. 1982;17(1):101-11.

Lang NP, Schatzle MA, Loe H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2009;36 Suppl 10:3-8.

Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges FM, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre Dos Santos M, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(5):568-74.

- Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fatima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(3):575-84.
- Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med.* 2012;44(7):588-96.
- Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):441-54.
- Marsh P, Martin MV. *Microbiologia Oral*, 4ª ed. São Paulo: Santos Livraria Editora; 2005.
- Matthijs S, Adriaens PA. Chlorhexidine varnishes: a review. *J Clin Periodontol.* 2002;29(1):1-8.
- Melo MA, Rolim JP, Passos VF, Lima RA, Zanin IC, Codes BM, Rocha SS, Rodrigues LK. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Dec;12(4):581-6.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003616.
- Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(1):77-80.
- Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 2007;88(1):16-20.
- Nelson-Filho P, Olmedo LY, Andruccioli MC, Saraiva Mda C, Matsumoto MA, de Queiroz AM, et al. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridisation technique for in vivo detection of cariogenic microorganisms on metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent. *J Dent.* 2011;39(7):513-7.
- Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod.* 2011;37(2):217-22.
- Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39(1):1-18.
- O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 2002;31(2):86-90.

Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, et al. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. *J Prosthodont*. 2009;18(5):427-31.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):341-8.

Pereira Gonzales F, Maisch T. Photodynamic inactivation for controlling *Candida albicans* infections. *Fungal Biol*. 2012;116(1):1-10.

Prates RA, Yamada AM, Jr., Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(1):70-6.

Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, Oliveira FS, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr., et al. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):617-25.

Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine(R). *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):685-94.

Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18(4):163-70.

Ramage G, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilms of *Candida albicans* and their associated resistance to antifungal agents. *Am Clin Lab*. 2001;20(7):42-4.

Ricatto LG, Conrado LA, Turssi CP, Franca FM, Basting RT, Amaral FL. Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. *Eur J Dent*. 2014;8(4):509-14.

Samaranayake LP, MacFarlane TW. A retrospective study of patients with recurrent chronic atrophic candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981;52(2):150-3.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, De Rossi A, Faria G, Silva LA, et al. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Arch Oral Biol*. 2013;58(3):311-6.

Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):615-20.

- Sigusch BW, Engelbrecht M, Volpel A, Holletschke A, Pfister W, Schutze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010;81(7):975-81.
- So CW, Tsang PW, Lo PC, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Fong WP. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by BAM-SiPc. *Mycoses*. 2010;53(3):215-20.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
- Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006;32(10):979-84.
- Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011;55(1):143-66.
- Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med*. 2003;33(3):161-8.
- Sousa AS, Prates RA, de Santi ME, Lopes RG, Bussadori SK, Ferreira LR, et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;14:111-4.
- Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(3):385-9.
- Spets-Happonen S, Luoma H, Forss H, Kentala J, Alaluusua S, Luoma AR, et al. Effects of a chlorhexidine-fluoride-strontium rinsing program on caries, gingivitis and some salivary bacteria among Finnish schoolchildren. *Scand J Dent Res*. 1991;99(2):130-8.
- Stenderup A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):3-10.
- Street CN, Pedigo LA, Loebel NG. Energy dose parameters affect antimicrobial photodynamic therapy-mediated eradication of periopathogenic biofilm and planktonic cultures. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S61-6.
- Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(2):155-60.

- Trindade AC, De Figueiredo JA, Steier L, Weber JB. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(3):175-82.
- Ullbro C, Brown A, Twetman S. Preventive periodontal regimen in Papillon-Lefevre syndrome. *Pediatr Dent.* 2005;27(3):226-32.
- Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):311-9.
- Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 2012;61(9):399-419.
- Venkatesh Babu NS, Vivek DK, Ambika G. Comparative evaluation of chlorhexidine mouthrinse versus cacao bean husk extract mouthrinse as antimicrobial agents in children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011;12(5):245-9.
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):137-43.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(1):13-28.
- Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(4):263-72.
- Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus Mutans*. *Caries Res.* 2003;37(3):190-3.
- Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995;78(5):569-74.
- Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother.* 1996;37(2):377-81.
- Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(3):182-7.
- Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(8):354-7.
- Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog.* 2001;84(Pt 3):235-54.
- Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):412-8.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):680-4.

Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1999;50(1):1-7.

Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(2):324-30.

Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Goncalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64-9.