



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL**



**NICOLE GONÇALVES LIMA GRACINDO**

**Influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana com  
diferentes tempos de pré-irradiação no biofilme dentário  
de crianças. Ensaio clínico randomizado.**

**VERSÃO CORRIGIDA**

**Ribeirão Preto  
2020**



**NICOLE GONÇALVES LIMA GRACINDO**

**Influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes tempos de pré-irradiação no biofilme dentário de crianças. Ensaio clínico randomizado.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências, junto ao Programa de Odontopediatria com Área de concentração em Odontopediatria

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Borsatto

**VERSÃO CORRIGIDA**

**Ribeirão Preto**

**2020**

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.

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Gracindo, Nicole Gonçalves Lima

Influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes tempos de pré-irradiação no biofilme dentário de crianças. Ensaio clínico randomizado. Ribeirão Preto, 2020.

76p.; Il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Borsatto, Maria Cristina

1. Terapia fotodinâmica. 2. Biofilme dentário. 3. Crianças. 4. Ensaio clínico.

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

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gracindo NGL. **Influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes tempos de pré-irradiação no biofilme dentário de crianças. Ensaio clínico randomizado**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Data da Defesa: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto – Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: \_\_\_\_\_



## **DADOS CURRICULARES**

### **NICOLE GONÇALVES LIMA GRACINDO**

- Nascimento** 27 de Outubro de 1987 – Manaus- AM
- Filiação** Pedro Américo Panilha Lima  
Nanete Mesquita Gonçalves
- 2009-2014** Curso de Graduação  
Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Amazonas
- 2011-2012** Iniciação Científica - projeto de pesquisa intitulado "Prevalência de Queilite Actínica em Pescadores em Manaus-AM" (Bolsa FAPEAM).  
Orientadora: Professora doutora Juliana Vianna Pereira
- 2012-2013** Iniciação Científica - projeto de pesquisa intitulado "Avaliação das lesões bucais dos drogadictos em recuperação na fazenda da esperança (Manaus-AM)" (Bolsa CNPq). Orientadora: Professora doutora Juliana Vianna Pereira
- 2014-2015** Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2014-2016** Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências  
Área de concentração: Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Orientador: Professor Doutor Alberto Consolaro
- 2016-2020** Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Odontologia  
Área de concentração: Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
Orientador: Professora Doutora Maria Cristina Borsato
- 2017 – 2020** Curso de especialização em Ortodontia  
Associação Brasileira de Odontologia (ABO- Campinas)  
Orientador: Professor Paulo Ferreira





Dedico este trabalho...

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus **pais** e **irmã**, pelo amor e apoio constantes para que eu atingisse meus objetivos e concluísse mais uma etapa da minha vida. A distância que nos separa é grande, e a saudade é maior ainda, mas o amor que sinto por vocês me dá forças para continuar trilhando meu caminho.

**AMO VOCÊS!**



## Agradecimentos Especiais

À **Deus** por renovar minhas forças, iluminar meus passos e me manter no caminho certo durante todos esses anos.

Aos meus pais, **Pedro Lima e Nanete Gonçalves**, pelo apoio incondicional em tudo e sempre acreditarem nos meus sonhos. Se hoje sou capaz de buscar meus próprios interesses, foi graças à educação recebida ao longo de minha vida e à profunda admiração que tenho por vocês! Amo vocês.

A minha irmã, **Luana Gonçalves Lima** pelo companheirismo que sempre esteve ao meu lado, compartilhou comigo uma infância maravilhosa, uma adolescência entre tapas e beijos. Amo você.

Ao meu esposo **Luiz Fernando Gracindo**, por toda paciência e apoio durante essa etapa da minha vida, sem dúvida você fez com que o caminho ficasse bem mais fácil de ser percorrido.

A todos os **familiares** e **amigos**, que mesmo longe, sempre me apoiaram e comemoram comigo minhas vitórias.

A **professora doutora Maria Cristina Borsato**, pela orientação e suporte para que esse trabalho fosse realizado, contribuindo para meu crescimento científico e pessoal. Um exemplo de professora a ser seguido, sempre disposta a ensinar a aprender. Muito Obrigada. pela dedicação e disponibilidade em me socorrer nas horas de desespero, agradeço imensamente todos os ensinamentos passados

Ao **professor doutor Evandro Watanabe**, por ter disponibilizado o laboratório e a todos os colaboradores do Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de

Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP) por tornarem possível a execução dos experimentos e por todos os ensinamentos passados.

Aos integrantes da banca examinadora, pelo tempo que dedicaram à análise deste trabalho.

Às minhas amigas, que mesmo geograficamente distante, sempre se fizeram presente no meu dia a dia tornando- os mais leves: **Carla Loureiro, Girlainny Damascena, Larissa Peixoto, Naime Said, Renata Sant`Ana**. Sinto muita saudade de todas vocês.

À minha madrinha, **Naziette Mesquita Gonçalves**, pela preocupação constante e telefonemas quase diários.

## Agradecimento

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

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, e do Vice-Diretor, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

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** e da vice-coordenadora, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

Aos demais professores do departamento de clínica infantil faculdade de odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de queiroz**, **Profª. Dra. Andiana de Rossi**, **profª. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **profª. Dra Kranya Victoria Díaz Serrano**, **prof. Dr. Fabricio Kitazono de Carvalho** pela convivência e pelos ensinamentos.

Aos **funcionários** e **pós-graduandos** do Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP) por me receberem tão bem e por toda ajuda concedida no período em que estive neste laboratório.

Aos funcionários do departamento de clínica infantil: Carolina Paes Torres Mantovani, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanella, Filomena Leli Placciti, pela disponibilidade.

Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz

(Almir Sater)





## RESUMO

Gracindo NGL. **Influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana com diferentes tempos de pré-irradiação no biofilme dentário de crianças. Ensaio clínico randomizado.** 76f. Tese (Doutorado) - Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2020.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) vem se destacando como um tratamento promissor na redução de microrganismos patogênicos na cavidade bucal, prevenindo e evitando doenças odontológicas. Objetivo: avaliar *in vivo* o tempo de pré irradiação, em diferentes tempos (1 minuto e 5 minutos) para uma diminuição efetiva da quantidade de microrganismos presente no biofilme dentário, por análise quantitativa dos microrganismos presentes na placa bacteriana (biofilme) visível, em primeiros molares permanentes inferiores de crianças, usando TFDa com o laser de diodo de baixa potência associado ao azul de metileno a 0,01%. Materiais e métodos: A amostra foi composta por 54 crianças (n=54) entre 6 e 12 anos e 108 molares inferiores permanentes homólogos com biofilme visível a olho nu, em um ensaio clínico randomizado (*split mouth*). Os dentes foram divididos em quatro grupos de acordo com tempo de aplicação. A TFDa foi feita em cada dente antes da coleta do biofilme dos grupos 2 e 4, com fotossensibilizador azul de metileno 0,01% e o laser diodo de baixa potência (InGaAIP). Resultados: O número de unidade formadoras de colônia (UFC) foi registrado, transformado em escala logarítmica e analisado por ANOVA, observou-se uma diferença significativa entre os grupos (p=0,000), tendo uma tendência de diminuição do número de bactérias nos dois grupos de tratamento, com uma redução bacteriana mais evidente no grupo tratado com o tempo de pré-irradiação de 05 minutos. Conclusões: os tempos de pré-irradiação foram capazes de reduzir as unidades formadoras de colônias do biofilme bacteriano maduro *in vivo*, no entanto o tempo de 05 minutos apresentou uma maior redução do número destas unidades formadoras de colônia. Relevância clínica: o tratamento com TFDa tem uma ação minimamente invasiva, além de ser usado para adaptação de pacientes que possuem medo de fazer procedimentos odontológicos.

**Palavras-chaves:** Terapia fotodinâmica, Biofilme, Crianças, Ensaio clinico, Doença Cárie.



## ABSTRACT

Gracindo NGL. **Influence of antimicrobial photodynamic therapy with different pre-irradiation times on children's dental biofilm. Randomized clinical trial.** 76f. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto: Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo. 2020.

Photodynamic therapy (PDT) is effective in reducing pathogenic microorganisms in the oral cavity and preventing dental diseases. **Objective:** to evaluate the pre-irradiation time for an effective decrease in the amount of microorganisms present in the dental biofilm by quantitative analysis of the microorganisms present in the visible plaque (biofilm), in lower permanent first molars using TFDa with the associated diode laser. to 0.01% methylene blue. **Materials and methods:** The sample consisted of 54 children (n = 54) between 6 and 12 years old and 108 homologous permanent lower molars with biofilm visible to the naked eye in a randomized clinical trial (split mouth). The teeth were divided into four groups according to time of application. PDT was performed on each tooth before the collection of the biofilm in groups 2 and 4, with 0.01% methylene blue photosensitizer and the therapeutic laser (InGaAIP). **Results:** After statistical analysis, a significant difference was observed between the groups ( $p = 0.000$ ), with a tendency to decrease the number of bacteria in both treatment groups, with a more evident bacterial reduction in the group treated with the pre-treatment time. - 05-minute radiation. **Conclusions:** the pre-irradiation times were able to reduce the colony-forming units of the mature bacterial biofilm in vivo however the time of 05 minutes showed a greater reduction in the number of these colony-forming units. **Clinical relevance:** treatment with PDT has a minimally invasive action, in addition to being used to adapt patients who are afraid of having dental procedures.

**Keywords:** Photodynamic therapy, Children, Clinical trial.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 Delineamento experimental .....	37
3.2 Seleção dos voluntários.....	37
3.2.1 Aspectos éticos .....	37
3.2.2 Cálculo amostral .....	37
3.3 Critérios de seleção dos voluntários.....	38
3.4 Protocolo Clínico.....	40
3.5 Protocolo laboratorial.....	40
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>73</b>



# 1. INTRODUÇÃO

---





## 1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um ambiente propício para o crescimento de aproximadamente 700 espécies bacterianas (Soria-Lozano et al., 2015; Larsen e Fiehn, 2017). Ao nascer os bebês tem a cavidade bucal estéril, e por meio do contato com os pais e pela alimentação a microbiota é adquirida ao longo da vida. Essa diversidade microbiana está relacionada à presença de alguns fatores, como umidade, temperatura, variações no pH, disponibilidade de nutrientes e diferentes concentrações de oxigênio (Barbieri et al., 2014; Legéňová, Bujdáková, 2015) que devem estar equilibrados para que não favoreça o desenvolvimento de doenças bucais (Do et al., 2013; Bao et al., 2015). Com um ambiente adequado para colonização, os microrganismos organizam-se sobre as diferentes superfícies presentes na cavidade bucal, como dentes, restaurações, implantes, tecidos moles, entre outros, sob a forma de biofilmes (Belibasakis et al., 2019).

O biofilme dentário, também conhecido como placa bacteriana, consiste em uma comunidade bacteriana incorporada a uma matriz de polissacarídeos extracelulares (microrganismos + saliva e/ou fluido crevicular gengival) a qual se forma nas superfícies dos dentes e tecidos moles da boca (Wei et al., 2006; Nemezio et al., 2017). Existem doenças relacionadas à presença de biofilme dentário como a cárie e a doença periodontal, as quais são exemplos de infecções crônicas que representam risco a saúde bucal e geral (Nemezio et al., 2017; Larsen e Fiehn, 2017). A formação do biofilme ocorre por meio da ligação deste à superfície do dente, seguida da multiplicação celular, maturação e formação de microcolônias bacterianas (Mang et al., 2012).

Na superfície dentária, os microrganismos responsáveis pela colonização inicial se aderem à película adquirida, uma camada de proteínas derivadas da saliva. Os colonizadores iniciais do biofilme são *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Neisseria* spp e *Actinomyces* spp (Dufour et al., 2012; Soria-Lozano et al., 2015). Os estreptococos do grupo mutans (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) se aderem de acordo com a disponibilidade de sacarose no biofilme. Posteriormente a coagregação com outras bactérias levará a um aumento de bactérias Gram-negativas, como *Eikenella*

*corrodens*, *Veilonella atypica* e *Prevotella loescheii*. A coagregação de *Fusobacterium nucleatum* normalmente é a divisão entre os colonizadores iniciais / placa precoce e os colonizadores tardios/placa madura ou comunidade clímax (Jiang et al., 2016; Willems et al., 2016).

Uma vez formados, os biofilmes são difíceis de desestabilizar e tornam-se mais tolerantes aos agentes antimicrobianos do que os microrganismos livres. A matriz polissacarídica é a principal barreira que pode dificultar a difusão e o acesso dos agentes antimicrobianos. Em particular, os exopolissacarídeos insolúveis (IEPS) favorecem a formação da placa dental, estabilidade do biofilme e integridade estrutural, e estão associados com a prevalência de cárie. Além disso, os polissacarídeos intracelulares (IPS) têm sido considerados como uma fonte interna de carboidratos para fermentação, contribuindo para a cariogenicidade de *S. mutans* (Nemezio et al., 2017). Os microrganismos quando aderidos às superfícies dos dentes, formando biofilme, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da doença cárie, por meio do metabolismo de carboidratos (predominantemente sacarose), levando à produção de grandes quantidades de ácido láctico, e, finalmente, a dissolução da superfície dos dentes (Wei et al., 2006; Fumes et al., 2018). A cárie dentária é uma doença multifatorial, sacarose-biofilme dependente, invasiva e crônica (Marsh et al., 2015; Nyvad et al., 2013). Essa doença ocorre em todo o mundo afetando 2.430 milhões de pessoas (36% da população mundial), sendo considerada uma das doenças mais frequente em crianças (Leal et al., 2017; Vohra et al., 2015).

Existem diversas técnicas disponíveis para o controle do biofilme dental, ainda assim a cárie dentária constitui um problema clínico altamente relevante, sendo considerada uma doença pandêmica (Leal et al., 2017). Este fato estimula pesquisadores a procurar novas formas prevenir e controlar a doença cárie dentária (Koo et al., 2010, Alves et al, 2019).

Como auxiliar no controle e na redução do biofilme da superfície do dente, além do controle mecânico por meio da escovação, são recomendados bochechos que contenham íon flúor agentes antimicrobianos que podem ser produtos químicos ou naturais. Estes agentes antimicrobianos, para serem considerados ideais, devem ser eficazes contra os microrganismos promovendo o desequilíbrio ecológico do

biofilme, devem ser de ação rápida e manter sua atividade antimicrobiana mesmo em baixas concentrações, a fim de que não ocorram efeitos adversos (López-Gómez et al., 2016).

Há estudos que mostram que o uso contínuo de agentes antimicrobianos, promovem uma alteração fenotípica nas bactérias, o que as tornam resistentes a alterações ambientais, tornando, desta forma, tais tratamentos ineficazes (Akran et al., 2016; Meeker et al., 2016; Nour et al., 2016; Saleen et al., 2017). A terapia fotodinâmica (TFDa) vem se destacando dentre as opções que preservam a estrutura dental e são potencialmente eficazes contra os microrganismos. Essa terapia promove a redução dos microrganismos patogênicos na cavidade bucal, prevenindo e evitando doenças odontológicas até então tratadas de maneira convencional (Cieplik et al., 2014; Ricatto et al., 2014; Diniz e al., 2015; Nemezio et al., 2017; Alves et al.; 2019; Reis et al., 2019).

Desse modo, durante a última década, tem havido um crescente interesse na possibilidade de substituição ou complementação às medidas terapêuticas convencionais para o controle do biofilme dentários, e dentre as alternativas estudadas está a terapia fotodinâmica antibacteriana (TFDa), no inglês (PDT) (Mang et al., 2012; Cieplik et al., 2014; Ricatto et al., 2014; Azizi et al., 2016; Mirzaie et al., 2016; Scherer et al, 2017; Reis et al., 2019).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa) é uma modalidade terapêutica baseada na administração de um agente fotossensibilizador (FS) não-tóxico ao paciente, com posterior irradiação de luz (laser/LED) em um comprimento de onda adequado, em presença de oxigênio, ocasionando a morte das células-alvo, via dano oxidativo. Apresenta diversas vantagens no tratamento de infecções, tais como: início de ação imediato, efeito deletério independente do estado metabólico da célula alvo, eliminação de fatores de virulência e diminuição de efeitos adversos sistêmicos, devido a sua aplicação restrita à área irradiada (Dai, Huang e Hamblin, 2009; Mroz et al., 2011; Nemezio et al., 2017; Chaves Lamarque et al., 2020 ). Neste sentido, a TFDa não causa danos aos tecidos do hospedeiro, uma vez que as células eucariotas se defendem contra o ataque de radicais de oxigênio através de enzimas, como a catalase e superoxidase dismutase (Stein et al., 2009)

Na TFDa, o fenômeno básico requer que o fotossensibilizador, compostos químicos como o azul de metileno ou o azul de toluidina, dentre outros, mantenha contato íntimo com a área afetada. Após a sua ativação pela luz o fotossensibilizador torna-se excitado, partindo do estado de singleto para o estado de duplete ou tripleto (Azarpazhooh et al., 2010; Mirzaie et al., 2016; Monzavi et al., 2016). Esta mudança de estado leva a uma transferência de elétrons que resulta na formação de espécies de oxigênio singleto e radicais livres, os quais são citotóxicos e promovem a morte bacteriana, a qual é causada principalmente por danos no DNA e na membrana citoplasmática (Soukos, Goodson, 2011; Oniszczyk et al., 2016; Hamblin 2016; Fumes et al., 2018; Misba et al., 2018).

A escolha do Fotossensibilizante (FS) é de fundamental importância para assegurar a efetividade da terapia. Em um aspecto geral, o FS deve ser uma molécula biologicamente estável, capaz de absorver luz preferencialmente do espectro eletromagnético visível, não exercendo citotoxicidade significativa ao hospedeiro na ausência da luz. Deve apresentar boa seletividade e baixa toxicidade sistêmica e que seja, preferencialmente, de baixo custo e fácil síntese. Diversas moléculas de FS vêm sendo utilizadas em estudos envolvendo a TFD, como os derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina) e tetrapirrólicos (porfirinas e clorinas) (Araújo et al., 2017; de Annunzio et al., 2018; Frade et al., 2018; Cadore et al., 2019). A maioria dos FS ativam-se pela luz no comprimento de onda visível entre 400 e 700 nm, o que corresponde a uma profundidade de penetração de luz de aproximadamente 0,5 a 1,5 cm. Quando há uma maior necessidade de penetração, é preciso utilizar FS que absorvam bem o infravermelho, como a indocianina verde, que absorve em 810 nm (Abrahamse, Hamblin, 2016).

Para que essa terapia possa ser efetiva é necessário que a molécula do fotossensibilizador absorva fótons de luz modificando-se do seu estado fundamental para o estado excitado (singleto) (Konan et al., 2002; Mirzaie et al., 2016). 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 intersistema envolvendo uma mudança no spin do elétron (Ochsner, 1997).

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

No que se refere às lesões cariosas, estudos mostram que essa técnica pode ser utilizada na prevenção como na Odontologia minimamente invasiva, reduzindo o número de bactérias remanescentes após preparos cavitários realizados com a TFDa, podendo ser considerada uma terapia seletiva, ou seja, nem o fotossensibilizador nem a luz mostram propriedades antimicrobianas quando usados separadamente, diante disso não há interferência na microbiota de locais distantes dos sítios de aplicação (Wilson et al., 2004; Ricatto et al., 2014; Alves et al., 2019). Outro aspecto importante, no tratamento de crianças, é a natureza atraumática da TFDa (Goulart et al., 2011; Ricatto et al., 2014).

Apesar de diversos estudos demonstrarem resultados positivos no que se refere ao uso da terapia fotodinâmica no controle e prevenção das lesões de cárie dentária e no controle de bactérias cariogênicas ainda não foi possível estabelecer um protocolo, devido a utilização de diferentes fontes de luz, sendo as mais utilizadas o laser de He/Ne (O'Neill et al., 2002; Burns et al., 1995; Zanin et al., 2005), luz LED (Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006) e laser de diodo (Burns et al., 1995; Teixeira et al., 2012; Mirzaie et al., 2016; Zoccolillo, Rogers e Mang 2016; Azizi et al., 2016; Caccianiga et al., 2016; Fumes et al., 2018). Além disso, são utilizados vários tipos de fotossensibilizadores, entre eles o azul de toluidina (Wilson et al., 1995; O'Neill et al., 2002; De Sousa Farias et al., 2016) e o azul de metileno (Wood et al., 2006; Müller et al., 2007; Nemezio et al., 2017; Fumes et al., 2018; Alves et al., 2019). Desta forma os diferentes modelos de estudo, como citados anteriormente, dificultam a comparação dos resultados, sendo necessários estudos que estabeleçam um protocolo para utilização clínica dessa terapia (Bassir et al., 2013).

O FS, azul de metileno destaca-se como um composto químico orgânico, fenotiazínico, hidrofílico, com propriedades fluorescentes e fotossensibilizadoras. A carga positiva de sua molécula e sua baixa massa molecular promove melhor interação com as bactérias, penetra na membrana externa da bactéria através da ligação às proteínas da superfície microbiana, exerce fototoxicidade tanto para o DNA quanto para a membrana externa da espécie alvo e apresenta absorção máxima de luz em 664nm (Soukos et al., 2006; Pourhajibagher et al., 2018; Chaves Lamarque et al., 2020). Nas bactérias Gram-negativas, o azul de metileno é difundido pelas porinas, e nas Gram-positivas, desprovidas de membrana externa e mais espessas, a passagem da molécula se dá pela parede celular (Nunes et al., 2013; Nemezio et al., 2017; Fumes et al., 2018; Alves et al., 2019).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser eficaz na redução do número de bactérias cariogênicas na forma de biofilme (Wood et al., 2006; Lima et al., 2009; Mang et al., 2012; Cieplik et al., 2014), no entanto a fotossensibilização letal ocorre apenas nas camadas mais superficiais do biofilme (O'Neill, Hope, Wilson 2002; Giglielmi et al., 2011). Esse fato pode ser explicado pela incapacidade do agente fotossensibilizador de se difundir nas camadas mais internas do biofilme ou porque a luz não atinge diretamente essas camadas (Giglielmi et al., 2011), diante disso o tempo de pré-irradiação é um fator fundamental para a completa difusão do fotossensibilizador por meio do biofilme cariogênico (Giglielmi et al., 2011; Fumes et al., 2018).

Em estudos realizados anteriormente os tempos de pré-irradiação foram diferentes, portanto não houve uma padronização entre os estudos (Wood et al., 2006; Muller, Guggenheim, Shimidlin 2007).

Existem na literatura científica muitos estudos que comprovaram a inativação de bactérias por meio da TFDa, utilizando diferentes tipos de fontes de luz, associados com diversos fotossensibilizadores. No entanto, nenhum estudo mostrou efetividade dessa terapia em biofilme dentário bacteriano *in vivo*, avaliando qual melhor tempo de pré-irradiação para comprovar a efetividade da técnica. Assim, há a necessidade de mais estudos que possam definir um protocolo de tratamento com a TFDa em biofilme dentário bacteriano.

## 2. PROPOSIÇÃO

---





## **2. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar qual melhor tempo de pré-irradiação para uma diminuição efetiva da quantidade de microrganismos presente no biofilme dentário, por meio da análise quantitativa dos microrganismos presentes na placa bacteriana (biofilme) visível, em primeiros molares permanentes inferiores usando a TFDa com o laser de diodo de baixa potência associado ao azul de metileno 0,01% na microbiota do biofilme dentário cariogênico.



### 3. Material e Métodos

---



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento experimental**

O fator em estudo foi a influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana no biofilme dentário em crianças. A amostra foi composta por 54 crianças (n=54) e 108 molares permanentes homólogos com biofilme visível a olho nu, em um ensaio clínico randomizado (*split mouth*). Foi analisado a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias do grupo mutans presentes no biofilme dentário cariogênico antes da TFDa e imediatamente após a aplicação do método de controle do biofilme. A análise quantitativa dos microrganismos foi expressa em unidades formadoras de colônia (UFC)..

#### **3.2 Seleção dos voluntários**

##### **3.2.1 Aspectos éticos**

Inicialmente, o presente projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) /Plataforma Brasil sendo iniciado apenas após sua aprovação pelo número de CAAE 00781718.5.0000.5419 (Anexo A) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos (N°UTN: U1111-1238-9364). Os pacientes e os responsáveis legais foram informados quanto à metodologia, riscos e benefícios da pesquisa, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento. Os responsáveis legais que concordaram com a participação dos pacientes na pesquisa assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e os pacientes que concordaram em participar assinaram o termo de assentimento, e todos estavam cientes que poderiam retirar o consentimento em qualquer fase de execução do estudo.

##### **3.2.2 Cálculo amostral**

O cálculo amostral foi baseado no número de escolares entre 6 e 12 anos, residentes no município de Ribeirão Preto- SP (36.691 crianças – censo 2010). Foi estimado um nível de confiança de 95% com 13% de erro na amostra,

representando 2,0% da população de escolares de Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brasil, que atendesse aos critérios de inclusão da pesquisa. Esta análise forneceu um número de 57 crianças. O cálculo do (n) real da amostra foi de 54 crianças. Assim, após o cálculo amostral, foi estabelecido (n=54) crianças para a presente pesquisa.

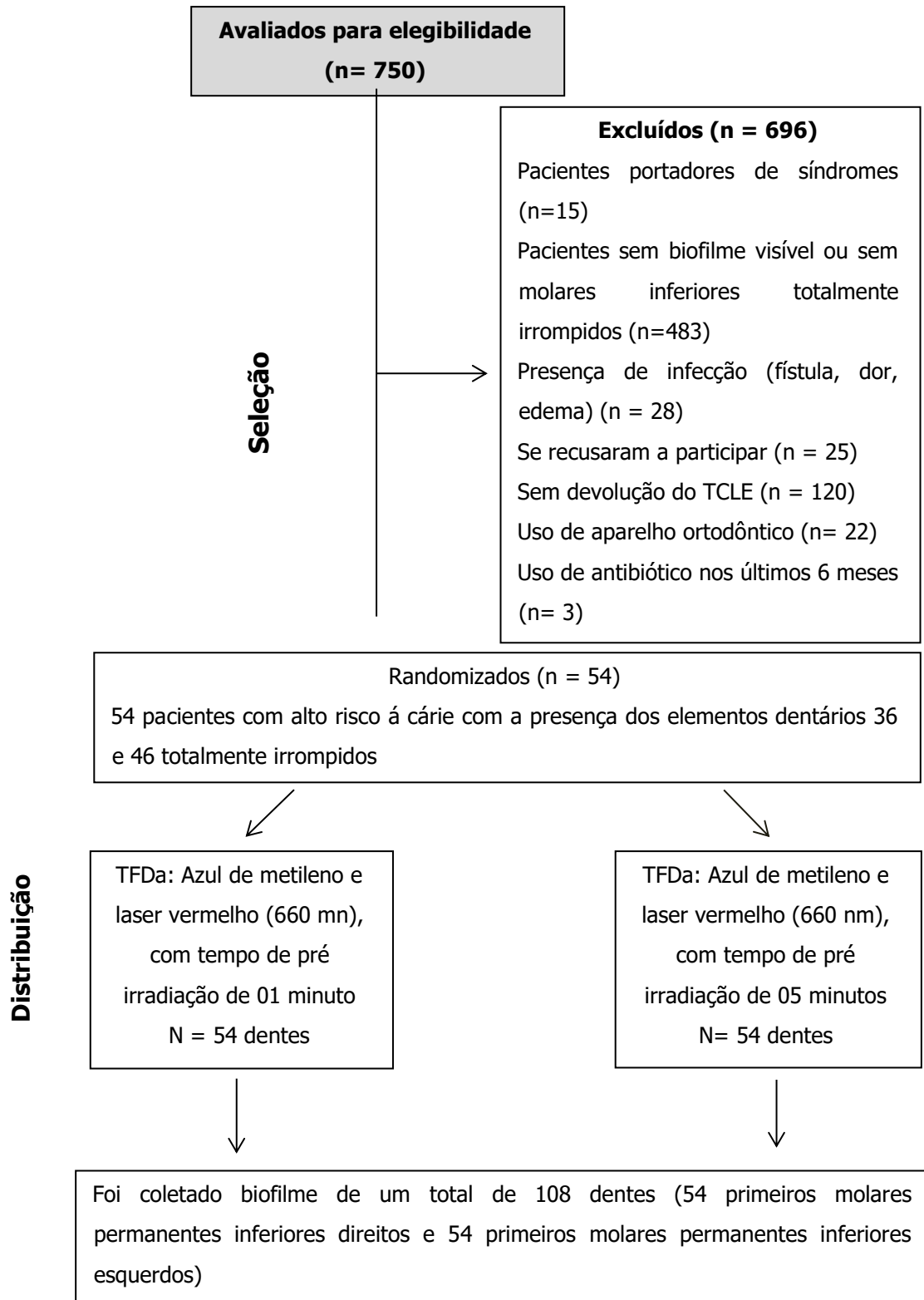
### **3.3 Critérios de seleção dos voluntários**

Foram examinadas 750 crianças, de ambos os sexos com faixa etária de 06 a 12 anos, que estavam ou não recebendo tratamento odontológico. Essas crianças foram selecionadas na Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na ONG Lar da Criança e na creche Vinde Meninos, localizada no bairro Jardim Jandáia em Ribeirão Preto. Os exames clínicos foram realizados segundo as normas de biossegurança, sob luz natural.

Os critérios de inclusão dos pacientes foram crianças com alto risco a doença cárie, por meio de uma avaliação adotada pela disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, a presença dos dentes 36 e 46 completamente irrompidos e com as faces vestibular e lingual íntegras com presença de biofilme visível na face lingual. Foram excluídos do estudo pacientes que apresentaram baixo ou médio risco a doença cárie, dor espontânea, fístula, lesão de cárie envolvendo dentina e doenças sistêmicas, além de pacientes que fizeram uso de antibiótico nos últimos seis meses anteriores à pesquisa. Assim como, os que fizeram uso de bochechos com substâncias químicas auxiliares no controle do biofilme e/ou cárie, uso de aparelhos ortodônticos ou próteses e pacientes que apresentassem sensibilidade ao fotossensibilizador.

Foram preenchidas as fichas de anamnese e odontograma para a obtenção de dados pessoais, saúde geral e bucal das crianças que participaram da pesquisa. O guia CONSORT para ensaios clínicos randomizados (Schulz et al., 2010) foi seguido para o desenho do estudo. A figura 01 representa o diagrama CONSORT, que discrimina detalhadamente a forma de seleção, alocação e análise dos voluntários da pesquisa.

**Figura 1:** Diagrama CONSORT, forma de recrutamento, alocação e análise dos sujeitos da pesquisa



### 3.4 Protocolo Clínico

Todos os pacientes selecionados foram submetidos ao exame clínico, em ambiente escolar na cidade de Ribeirão Preto - SP, segundo as normas de biossegurança. Após o exame clínico foi feito a coleta do biofilme e aplicação do método de controle da mesma.

A coleta do material foi realizada por um Cirurgião-Dentista preparado, calibrado e capacitado para a execução. Foram coletados apenas biofilme visível a olho nu devido a presença de uma camada fina e/ou moderada na região gengival (escore 02), segundo critérios de Silness e Løe (1964). Todos os critérios de biossegurança foram respeitados como uso de óculos de proteção no paciente e cirurgião dentista, proteção da ponteira do laser com barreira física e uso de curetas esterilizadas.

### 3.5 Protocolo laboratorial

Após o exame clínico, os dentes foram divididos em 4 grupos:

- **Grupo 01:** suspensão de microrganismos do biofilme do elemento dentário 36 antes da aplicação do composto químico fotossensibilizador e laser.
- **Grupo 02:** suspensão de microrganismos do biofilme do elemento dentário 36 após TFDa (Azul de metileno e laser vermelho), com tempo de pré irradiação de 01 minuto.
- **Grupo 03:** suspensão de microrganismos do biofilme do elemento dentário 46 antes da aplicação do composto químico fotossensibilizador e laser.
- **Grupo 04:** suspensão de microrganismos do biofilme do elemento dentário 46 após TFDa (Azul de metileno e laser vermelho), com tempo de pré irradiação de 05 minutos.

Foi realizada a coleta do biofilme presente na margem cervical da face lingual dos dentes 36 e 46 de cada voluntário (Figura 02), conforme divisão dos grupos. Nos grupos 1 e 3 a coleta foi feita na face lingual do meio do dente para a distal, nos grupos 2 e 4 a coleta foi feita na face lingual do meio do dente para



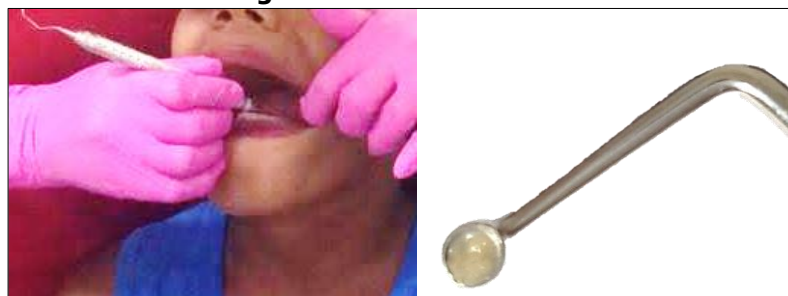
mesial, com o auxílio de uma cureta de Lucas argola (Figura 03) esterilizada e transferido imediatamente para microtubos (1,5mL) contendo 1mL de Letheen caldo. A TFDa foi feita em cada dente antes da coleta do biofilme dos grupos 2 e 4, para isso foi aplicado fotossensibilizador azul de metileno 0,01% e, em seguida, o laser diodo de baixa potência (InGaAIP) (TF Premier – MMO, São Carlos - SP), comprimento de onda de 660 nm, e energia de 18J (Tabela 01). Durante a coleta, os microtubos estavam marcados de acordo com cada grupo.

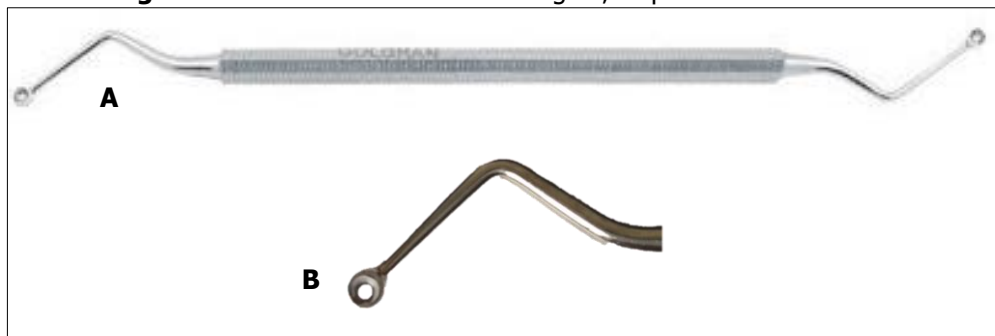
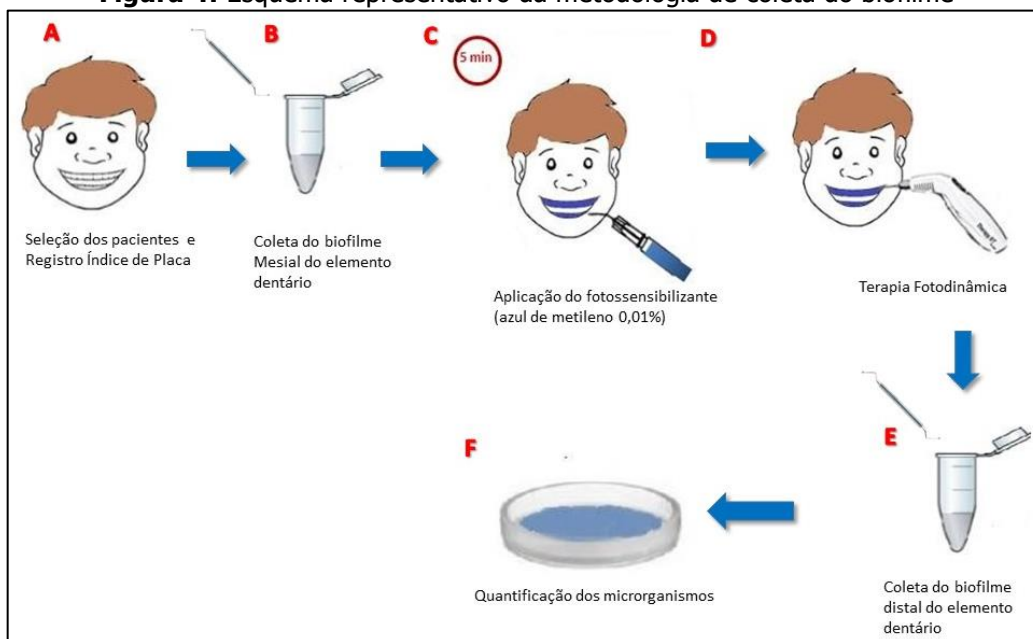
Tabela 01: padrão seguido durante o uso do laser

Laser	Diodo de baixa potência (InGaAIP)
Comprimento de onda vermelho	660 nm
Energia	18 J
Modo de ação	Pontual com afastamento de aproximadamente 2mm do dente

Em seguida, as amostras foram levadas para o Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (EERP-USP). Foram acrescentadas 3 pérolas de vidro no interior do microtubo e as amostras foram homogeneizadas por meio de um agitador de tubos AP-56 (Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil) por 2 minutos. Em seguida, alíquotas de 50µL *in natura* e diluídas (diluição decimal seriada até  $10^{-5}$ ) foram semeadas por gota em placas de Petri (90x15mm) com meio de cultura SB20.

**Figura 2:** Coleta do biofilme

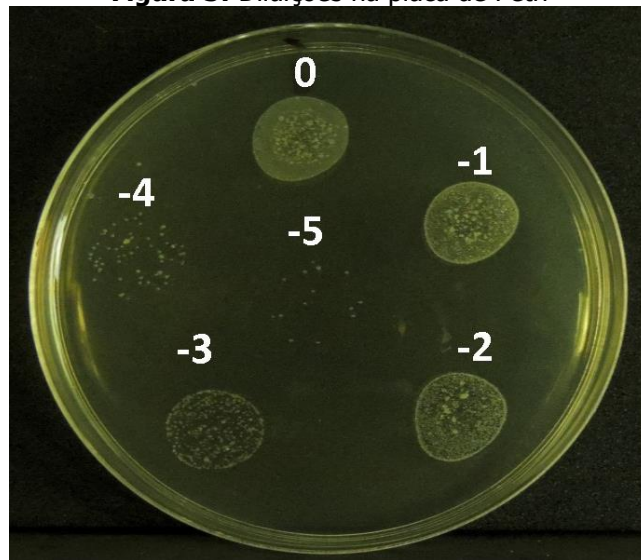


**Figura 3:** A. Cureta de Lucas com argola; B. ponta ativa da cureta**Figura 4:** Esquema representativo da metodologia de coleta do biofilme

Após esse processo as amostras foram secas ao natural (dentro do fluxo laminar), armazenadas em jarra de anaerobiose e incubadas em estufa (Quimis, Diadema, SP, Brasil) a 37°C por 48 horas. Decorrido o período de incubação, foi realizada a leitura das placas com auxílio estereomicroscópio trinocular – modelo AQZ-DS4-TRI70 (Tecnival), e os números de unidades formadoras de colônia foram expressas por mg de peso úmido de placa dentária (UFC).

A análise da efetividade do tratamento com TFDa foi feita por meio da comparação da contagem em escala logarítmica de microrganismos (UFC/mg) antes e após o tratamento.

**Figura 5:** Diluições na placa de Petri





## 4. Resultados

---



## 4. RESULTADOS

Como os dados não apresentaram esfericidade (avaliada pelo teste de Mauchly) optou-se por utilizar as correções de Greenhouse-Geisser para interpretar os resultados da ANOVA de medidas repetidas. Com esse teste verificou-se diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,000$ ).

Os resultados mostraram a média dos valores do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) onde letras iguais não apresentam diferença estatística (a)

**Tabela 2:** Viabilidade bacteriana do biofilme de acordo com o tratamento.

<b>Tratamentos (grupos)</b>	<b>Média (UFC)</b>	<b>Desvio padrão</b>
Grupo 01: Biofilme dente 36 sem tratamento (n=54)	4,61 (a)	2,15
Grupo 02: Biofilme dente 36 após TFDa, com tempo de pré irradiação de 01 minuto (n=54)	3,81 (b)	2,20
Grupo 03: Biofilme dente 46 sem tratamento (n=54)	4,33 (a)	2,22
Grupo 04: Biofilme dente 46 após TFDa, com tempo de pré irradiação de 05 minuto (n=54)	2,56 (c)	2,06

\*Letras iguais representam semelhança estatística





## 5. Discussão

---



## 5. Discussão

A doença cárie e a doença periodontal estão diretamente ligadas à presença de biofilme dentário (Diniz, et al., 2015; Nemezio et al., 2017), e sabe-se que bactérias organizadas em biofilme são mais resistentes a ação dos agentes antimicrobianos se comparadas a bactérias planctônicas (Fumes et al., 2018). Isso se dá pela presença de substâncias poliméricas extracelulares, presença de parede celular, taxa de crescimento bacteriano, atividade metabólica e expressão genética do biofilme (Reis et al., 2019).

O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o maior colonizador do biofilme bacteriano, compreendendo cerca de 70% das bactérias. Suas características cariogênicas estão relacionadas à presença de vários genes envolvidos nas vias metabólicas, como a adesão microbiana, síntese de polissacarídeos extracelulares, formação de biofilme, carboidratos de absorção e tolerância ao ácido lático (Leal et al., 2017; Misba, Zaidi e Khan 2018). É comum encontrar *S. mutans* em biofilmes complexos, onde há grande produção de polissacarídeos, principalmente na presença de glicose, o que facilita o processo de adesão (Misba, Zaidi e Khan 2018). Sendo assim, a alimentação é um fator de grande colaboração na formação do biofilme, junto à microbiota residente e o meio em que estão inseridas. Além disto, o *S. mutans* é responsável por infecções de saúde geral, como a endocardite bacteriana, que pode levar a morbidade em até 50% dos casos (Misba, Zaidi e Khan 2018).

Para o controle de diversas infecções, terapias antimicrobianas vêm sendo estudadas a fim de erradicar ou reduzir atividade de tais microrganismos, sendo que os tratamentos mais comuns são realizados com antibióticos e agentes químicos. Porém, a efetividade dessa abordagem tem sido cada vez mais discutida, devido a resistência das bactérias a tais tratamentos, ocasionando uma situação emergencial de infecções crônicas (Meeker et al., 2016; Saleen et al., 2017; Misba, Zaidi e Khan 2018). Um dos agentes antimicrobianos mais utilizados na Odontologia é a Clorexidina, contudo seu uso contínuo pode causar efeitos adversos como perda da

sensibilidade gustativa, xerostomia, alteração da coloração dos dentes, restaurações e língua (Azizi et al., 2016)

Atualmente, uma nova possibilidade de tratamento é a terapia fotodinâmica, que tem sido amplamente estudada e está sendo implementada em diversas áreas médicas e odontológicas, por ser um método conservador e com poucos efeitos adversos (Nemezio et al., 2017; Alves et al., 2019; Reis et al., 2019). Na área odontológica a terapia fotodinâmica antibacteriana é vista como um tratamento moderno para desinfecção, apresentando resultados satisfatórios no combate a resistência medicamentosa (Misba, Zaidi e Khan 2018). Consiste em um tratamento local, minimamente invasivo, que combina um agente fotossensibilizante apropriado e uma fonte de luz com comprimento de onda específico (Nemezio et al., 2017). Tem ampla aplicabilidade dentro do campo odontológico, podendo ser usado para tratamento de lesão de cárie, inativação de infecções causadas por microrganismos como bactérias, vírus e fungos, doenças periodontais, desinfecção do canal radicular e inativação dos microrganismos presentes no biofilme dentário (Martins et al., 2017; Pourhajibaghera et al., 2018; Alves et al., 2019; Cadore et al., 2019; Soares et al., 2019; Ghorbanzadeh et al., 2020).

Há trabalhos que demonstram a limitação dessa terapia na redução de estreptococos presentes em biofilmes de múltiplas espécies *in situ* (Teixeira et al., 2012), e que a fotossensibilização letal ocorre predominantemente na camada mais externa do biofilme (O'Neill et al., 2002). No entanto, não existe um padrão entre os tratamentos realizados nos estudos, e muitas vezes, o tempo de pré irradiação do laser não está bem definido. Neste estudo, foram avaliados *in vivo*, dois tempos de pré irradiação usando como fotossensibilizador azul de metileno 0,01% e o laser diodo de baixa potência (TF Premier – MMO, São Carlos - SP), comprimento de onda de 660 nm, e energia de 18J.

O fotossensibilizador azul de metileno tem ação efetiva contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, apresentando bons resultados na redução da viabilidade dos microrganismos presentes no biofilme bacteriano (Alves et al., 2019). Para ser considerado efetivo, o fotossensibilizador deve apresentar 3 características básicas em relação ao microrganismo: deve ser capaz de se ligar à célula, penetrá-la

e agir em seu interior, e produzir oxigênio singleto ( Misba et al., 2018; Mendez et al., 2018; Chaves Lamarque et al., 2020).

O princípio de ação da TFDa se dá essencialmente pela associação de uma fonte de luz a um agente fotossensibilizador tendo como objetivo provocar a necrose celular e morte microbiana (Ishikawa et al., 2009). O efeito antimicrobiano é alcançado quando a fonte de luz de baixa intensidade promove o surgimento de substâncias que podem gerar danos e matar as células-alvo ao promover a excitação da substância fotossensibilizadora. Tal substância é administrada ao paciente e, por si só, não causa dano algum aos tecidos saudáveis ou doentes. A partir do momento que ocorre a aplicação da fonte de luz de baixa intensidade nos tecidos e nos microrganismos que contêm a substância fotossensibilizadora, esta é ativada e as células-alvo são rapidamente destruídas, precisamente nos locais para onde a irradiação foi direcionada (Takasaki et al., 2009; Carrera et al., 2016).

Estudos laboratoriais demonstraram que a terapia fotodinâmica pode ser efetiva na redução do número de bactérias cariogênicas na fase planctônica (Burns et al., 1995; Bevilacqua et al., 2007; Costa et al., 2010; Leal et al., 2017; Pourhajibaghara et al., 2018), sob a forma de modelos de biofilmes *in vitro* (Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006; Wood et al., 2006; Basso et al., 2011; Silva et al., 2012; Mang et al., 2012; Nemezio et al., 2017; Esteban Flores et al., 2018; Gong et al., 2019) e na redução do número de microrganismos de amostras de placa bacteriana supragengival de humanos (Wilson et al., 1995; O'Neill et al., 2002 ; Cadore et al., 2019), *in situ* ( Lima et al., 2009; Teixeira et al., 2012) e clínicos para redução de bactérias nas lesões de cárie (Goulart et al., 2011; Longo et al., 2012; Azizi et al., 2016; Alves et al., 2019; Gong et al., 2019).

Há comprovação de que a TFDa demonstra melhores resultados quando os microrganismos se apresentam na forma planctônica, promovendo uma fotoativação completa (Goulart et al., 2010; Barbieri et al., 2014; Cieplik et al., 2014). Porém quando os microrganismos estão organizados em biofilme, ocorre apenas uma redução no número de microrganismos (Muller, Guggenheim, Shimidlin 2007; Chaves Lamarque et al., 2020), esses resultados estão de acordo com os dados encontrados no presente estudo, onde foi observada uma diminuição na UFC nos

dois grupos, após 01 e 05 minutos de pré-irradiação, porém o grupo onde o tempo de pré irradiação foi de 05 minutos apresentou resultados mais satisfatórios, seguida da utilização do laser de baixa potência no biofilme dentário.

A ação antimicrobiana da TFDa é bem estabelecida pela literatura, sugerindo um efeito de resposta dose-dependente do tempo de pré irradiação e da energia do laser diodo usado, em relação a morte celular. Esses resultados corroboram com o estudo de Sousa Farias (2016) e Fumes (2018) os quais compararam diferentes densidades de energia e tempo de pré irradiação, respectivamente, em estudos *in vitro*.

Neste sentido, O'Neill et al. (2002) revelaram por meio de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM), que a inativação fotodinâmica ocorre predominantemente nas camadas mais externas do biofilme deixando algumas bactérias mais internas vivas, devido à incapacidade do composto químico fotossensibilizador se difundir para regiões mais profundas, à incapacidade da luz penetrar, ou a combinação de ambos. O presente estudo mostrou que com o tempo de pré irradiação de 05 minutos houve a maior diminuição no número de UFC, sugerindo que bactérias mais internas possam ter sido atingidas com o tratamento.

Evidenciando mais uma vez os efeitos positivos e a importância da TFDa, Gong et al. (2019) estudaram, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica em biofilme cariogênico multi espécies composta por *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* que são os principais microrganismos causadores da doença cárie, e puderam concluir que a TFDa apresentou efeito antimicrobiano significativo contra biofilme dental, sugerindo sua aplicação em clínica infantil, principalmente em pacientes acometidos com cárie da primeira infância.

Um trabalho recente de Soares et al., (2019) mostrou em estudo *in vivo* que a TFDa com tempo de pré irradiação de 05 minutos foi eficiente no controle de microrganismos presentes em biofilme de pacientes ortodônticos, corroborando com o presente estudo onde os resultados mostraram uma redução significativa na quantidade de microrganismos formadores do biofilme dentário após um tempo de pré irradiação de 05 minutos. Isto comprova que a TFDa é uma técnica viável para redução de microrganismos cariogênicos da superfície dentária, aumentando as chances de prevenção da doença cárie em pacientes submetidos a essa técnica.

Furtado et al., em 2020 realizaram um estudo *in vitro* com tempos de pré-irradiação de 1 e 5 minutos e concluíram que ambos os tempos foram eficazes para diminuir o número de *S. mutans* planctônicos quando comparados ao grupo controle do estudo que não recebeu intervenção da TFDa

Outro aspecto importante do tratamento com TFDa é sua ação minimamente invasiva, podendo ser usado para adaptação de pacientes crianças, jovens e adultos que possuem medo de fazer procedimentos odontológicos (Alves et al., 2019).

Levando em consideração que muitos pacientes como crianças e pacientes especiais tem dificuldade de colaboração com um atendimento clínico demorado, o uso de TFDa na área de Odontopediatria e pacientes com necessidades especiais é muito promissor. Por ser um tratamento indolor e sem sabor desagradável, possibilita ao cirurgião dentista desenvolver consultas regulares com objetivo de prevenir o surgimento de lesões de cárie a fim de evitar um tratamento invasivo.

O delineamento experimental (*Split mouth*) empregado no presente estudo permitiu eliminar as diferenças existentes entre os indivíduos, uma vez que as condições da cavidade bucal, como força mastigatória, fluxo salivar e pH são iguais para os dois grupos (01 minuto e 5 minutos de pré-irradiação). Dessa maneira, pôde-se evitar interferência entre os participantes, com vantagem de reduzir os fatores de confusão, fornecendo evidência científica de alta qualidade, considerada o padrão ouro na avaliação da eficácia das intervenções (Mills, et al., 2009)

Considerando as dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de estudos *in vivo* e a escassez de trabalhos científicos que proporcionem uma maior discussão entre os resultados obtidos, podemos afirmar que houve uma redução significativa com os dois tempos de pré-irradiação, no entanto com o tempo de pré-irradiação de 05 minutos apresentou melhores efeitos antimicrobianos sobre o biofilme dentário.





## 6. Conclusão

---



## **6. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos é lícito concluir que ambos os tempos de pré-irradiação foram capazes de reduzir as unidades formadoras de colônias do biofilme bacteriano maduro *in vivo*, no entanto o tempo de 05 minutos apresentou uma maior redução do número destas unidades formadoras de colônia.



## Referências

---



## REFERÊNCIAS

1. Abrahamse H, Hamblin, MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
2. Akram FE, El-Tayeb T, Abou-Aisha K, El-Azizi M. A combination of silver nanoparticles and visible blue light enhances the antibacterial efficacy of ineffective antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016;15:48.
3. Alves LVGL, Curylofo-Zotti FA, Borsatto MC, Salvador SLS, Valério RA, Souza-Gabriel AE, Corona SAM. Influence of antimicrobial photodynamic therapy in carious lesion. Randomized split-mouth clinical trial in primary molars. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Jun;26:124-130
4. Araújo NC, De Menezes RF, Carneiro VSM, Santos-Neto AP Dos, Fontana CR, Bagnato VS, Harvey CM, Gerbi MEM. Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 35, n. 5, p. 259-263, 2017.
5. Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The effect of photodynamic therapy for periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010; 81: 4-14.
6. Azizi A, Shademan S, Rezai 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.
7. Bao X, De Soet JJ, Tong H, Gao X, He L, Van Loveren C, et al. *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* in biofilms at both neutral pH and cariogenic conditions. *PLoS One*. 2015;10(6):1-11
8. Barbieri DSV, Tonial F, Lopez PVA, Maia BHLNS, Santos GD, Ribas MO et al. Antiadherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(9): 887-96
9. Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, Mashmouly S, Fekrazad R, Chiniforush N, Shamshiri AR, Nowzari H. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2013; 40: 65- 72.
10. Basso FG, Oliveira CF, Fontana A, Kurachi C, Bagnato VS, Spolidório DM, Hebling J, de Souza Costa CA. In Vitro effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J*. 2011; 22: 502-10.
11. Belibasakis GN, Bostanci N, Marsh PD, Zaura E. Applications of the oral microbiome in personalized dentistry. *Arch Oral Biol*. 2019 Aug;104:7-12

12. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A Jr, Teodoro GR, Zângaro RA, Pacheco MT. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25: 513-8.
13. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1995; 29: 192-7.
14. Caccianiga G, Baldoni M, Ghisalberti CA, Paiusco A. A Preliminary In Vitro Study on the Efficacy of High-Power Photodynamic Therapy (HLLT): Comparison between Pulsed Diode Lasers and Superpulsed Diode Lasers and Impact of Hydrogen Peroxide with Controlled Stabilization. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:1386158.
15. Cadore UB, Reis MBL, Martins SHL, Invernici MM, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, Messora MR, Souza SLS. Multiple sessions of antimicrobial photodynamic therapy associated with surgical periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2019 Apr;90(4):339-349.
16. 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: 979-86.
17. 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. *HHS Public Access.* 2016;26(5):1011-4
18. Chaves Lamarque GC, Cusicanqui Méndez DA, Arruda Matos A, Dionísio TJ, Moreira Machado MA, Magalhães AC, Cardoso Oliveira R, Cruvinel T. Cytotoxic effect and apoptosis pathways activated by methylene blue-mediated photodynamic therapy in fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020 Jan 7:101654
19. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014 Aug 12;5:405.
20. Costa AC, Chibebe Junior J, Pereira CA, Machado AK, Beltrame Junior M, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of planktonic cultures of *Streptococcus mutans* to photodynamic therapy with a lightemitting diode. *Braz Oral Res.* 2010; 24: 413-8.



21. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections- State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009; 6(617):170–188,
22. De Annunzio SR, Freitas LM, Blanco AL, Da Costa MM, Carmona-Vargas CC, De Oliveira KT, Fontana CR. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2018;178:545-550.
23. 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 Jul;31(5):1011-6.
24. Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Sep;12(3):511-8.
25. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012;22:2–16.
26. 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 May;36(5):258-265.
27. Frade ML, De Annunzio SR, Calixto G, Victorelli F, Chorilli M, Fontana CR. Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. *Molecules*. 2018;23(2):473.
28. Fumes AC, da Silva Telles PD, Corona SAM, Borsatto MC. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Mar;21:363-366
29. Furtado GS, Paschoal MAB, Santos Grenho LDC, Lago ADN. Does pre-irradiation time influence the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Sep;31:101884.
30. Ghorbanzadeh A, Bahador A, Sarraf P, Ayar R, Fekrazad R, Asefi S. Ex Vivo Comparison of Antibacterial Efficacy of Conventional Chemomechanical Debridement Alone and in Combination with Light-Activated Disinfection and Laser Irradiation Against *Enterococcus Faecalis* Biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Jan 2:101648.

31. Gong J, Park H, Lee J, Seo H, Lee S. Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019 May;37(5):282-287.
32. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P, Guglielmi C de 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.
33. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, Ciancaglini P. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28: 53–60.
34. 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.
35. Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:67-73.
36. Ichinose-Tsuno A, Aoki A, Takeuchi Y, Kirikae T, Shimbo T, Lee MC, Yoshino F, Maruoka Y, Itoh T, Ishikawa I, Izumi Y. Antimicrobial photodynamic therapy suppresses dental plaque formation in healthy adults: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*. 2014;14:152.
37. Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA, Mizutani K, Sasaki KM, Izumi Y. Application of lasers in periodontics: true innovation or myth? *Periodontol* 2009;50:90-126.
38. Jiang Q, Stamatova I, Kainulainen V, Korpela R, Meurman JH. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):149.
39. 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 Dec;20:55-61.
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: 89–106.
41. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007; 86: 694-707.
42. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res*. 2010;44(2):116–26.

43. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother. 2010; 52: 782-9.
44. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. APMIS. 2017 Apr;125(4):376-384.
45. 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
46. Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, Ribeiro MS, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017 Sep;19:1-4.
47. Legéňová K, Bujdáková H. The role of *Streptococcus mutans* in the oral biofilm. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2015; 64(4): 179-87.
48. Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges FM, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre Dos Santos M, Rodrigues LK, Zanin IC. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. Eur J Oral Sci. 2009; 117: 568-74.
49. Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fátima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB, Ochsner M. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloridephthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. Lasers Med Sci. 2012; 27:575-84.
50. López-Gómez SA, Villalobos-Rodelo JJ, Ávila-Burgos L, Casanova-Rosado JF, Vallejos-Sánchez AA, Lucas-Rincón SE, et al. Relationship between premature loss of primary teeth with oral hygiene, consumption of soft drinks, dental care, and previous caries experience. Sci Rep. 2016; 6:21147
51. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. Lasers Surg Med. 2012; 44: 588-96.
52. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial 64 community - Implications for treatment. J Oral Biosci. 2015;57(4):185–91.

53. Martins SHL, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, Messoria MR, Reino DM, Souza SLS. Effect of surgical periodontal treatment associated to antimicrobial photodynamic therapy on chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2017 Jul;44(7):717-728.
54. Meeker DG, Jenkins SV, Miller EK, Beenken KE, Loughran AJ, Powless A, Muldoon TJ, Galanzha EI, Zharov VP, Smeltzer MS, Chen J. Synergistic Photothermal and Antibiotic Killing of Biofilm-Associated *Staphylococcus aureus* Using Targeted Antibiotic-Loaded Gold Nanoconstructs. *ACS Infect Dis*. 2016;2(4):241-250.
55. Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, Machado MAAM, Cruvinel T. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci*. 2018 Apr;33(3):479-487.
56. Mills EJ, Chan AW, Wu P, Vail A, Guyatt GH, Altman DG. Design, analysis, and presentation of crossover trials. *Trials*. 2009 Apr 30;10:27.
57. Mirzaie M, Yassini E, Ashnagar S, Hadadi A, Chiniforush N. Evaluation of temperature change during antimicrobial photodynamic therapy with two different photosensitizers in dental caries. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016;14:115-8.
58. Misba L, Zaidi S, Khan AU. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: Role of singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Jun;183:16-21.
59. Monzavi A, Chinipardaz Z, Mousavi M, Fekrazad R, Moslemi N, Azaripour A, Bagherpasand O, Chiniforush N. 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.
60. Mroz P. et al. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2011;7(1):75-91.
61. Müller 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: 77-80.
62. Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Dec;20:234-237.
63. Nour El Din S, El-Tayeb TA, Abou-Aisha K, El-Azizi M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of combined therapy of silver nanoparticles and visible blue light against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1749-58.

64. Nunez SC. PDT- Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia/ Silvia Cristina Nunez, Martha Simões Ribeiro, Aguinaldo Silva Garcez – Rio de Janeiro: Elsevier. 2013. Capt4; p. 39.
65. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res.* 2013;47(2):89–102.
66. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997; 39: 1-18.
67. 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: 86-90
68. Oniszczyk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczyk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:912-929.
69. Pourhajibaghara M, Kazemian H, Chiniforush N, Hosseini N, Pourakbari B, Azizollahi A, Rezaei F, Bahador A. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2018;24:206–211.
70. Queiroz AC, Suaid FA, de Andrade PF, Oliveira FS, Novaes AB Jr, Taba M Jr, Palioto DB, Grisi MF, Souza SL. Adjunctive effect of antimicrobial photodynamic therapy to nonsurgical periodontal treatment in smokers: a randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2015;30(2):617-25.
71. Reis ACM, Regis WFM, Rodrigues LKA. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Jun;26:179-189.
72. Ricatto LG, Conrado LA, Turssi CP, França 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 Oct;8(4):509-14.
73. Saleem HG, Seers CA, Sabri AN, Reynolds EC. Dental plaque bacteria with reduced susceptibility to chlorhexidine are multidrug resistant. *BMC Microbiol.* 2017 Sep 15;16:214
74. Scherer KM, Bisby RH, Botchway SW, Parker AW. New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2017; 17:171-189.
75. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Grupo CONSORT. CONSORT declaração de 2010: diretrizes atualizadas para relatar estudos randomizados de grupos paralelos. *Ann. Estagiário Med,* 152 (2010), pp. 726-732.

76. Sigusch BW, Engelbrecht M, Völpel A, Holletschke A, Pfister W, Schütze J. Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*-infected periodontitis patients. *J Periodontol*. 2010; 81: 975-81.
77. Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964; 22:121-35.
78. Silva TC, Pereira AF, Exterkate RA, Bagnato VS, Buzalaf MA, Machado MA, Ten Cate JM, Crielaard W, Deng DM. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. *J Dent*. 2012;40:41-7.
79. Soares LGP, Crueira PJJ, Nunes IPF, Santos AS, Cangussú MCT, de Almeida PF, Pinheiro ALB, Habib FAL. Oral Microbiological Control by Photodynamic Action in Orthodontic Patients. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Aug 5. pii: S1572-1000(19)30264-9.
80. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal M, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. In vitro effenourct photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):187.
81. 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; 33:161-8.
82. Soukos NS; Goodson MJ. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol*. 2011;55:143-166.
83. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. *Journal of Endodontics*. 2006;32(10):760-774.
84. Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(1):71-7.
85. 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: 61-6.
86. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, Koshy G, Romanos G, Ishikawa I, Izumi Y. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol*. 2009;51:109-40.
87. Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res*. 2012; 46:549-54.

88. Vohra F, Al-Kheraif AA, Qadri T, Hassan MIA, Ahmed A, Warnakulasuriya S, et al. Efficacy of photodynamic therapy in the management of oral premalignant lesions. A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(1):150-9.
89. Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(6):1100-9.
90. Willems HM, Xu Z, Peters BM. Polymicrobial Biofilm Studies: From Basic Science to Biofilm Control. *Curr Oral Health Rep.* 2016;3(1):36-44.
91. Wilson M, Burns T, Pratten J Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37: 377-81.
92. 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;78:569-74.
93. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412-8.
94. 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;57:680-4.
95. Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:324-30.
96. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:64-9.
97. Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med.* 2016;48(10):995-1005.





Anexo

---



## ANEXO

## QUESTIONÁRIO - CAAE

**1. FATORES RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO**

- Dentição ( ) Decídua ( ) Mista ( ) Permanente
- Arco Dental ( ) Tipo I de Baume ( ) Tipo II de Baume
- Padrão das fossas e fissuras ( ) Profundas ( ) Rasas
- Apinhamento Dental ( ) Presente ( ) Ausente
- Selantes de fossas e fissuras ( ) Ausentes ( ) Presentes - Satisfatórios ( ) Não ( ) Sim
- Hábitos de higiene bucal: Número de escovações/dia \_\_\_\_\_  
 Períodos \_\_\_\_\_  
 Uso de fio dental ( ) Sim ( ) Não  
 Quem escova ( ) Criança ( ) Responsável ( ) Ambos
- Fluxo e capacidade tampão salivar \* solicitar avaliação quando necessária
- Exposição aos Fluoretos
  - Fluoreto pré-natal ( ) Não ( ) Sim - Posologia \_\_\_\_\_
  - Fluoreto na água de abastecimento público ( ) Sim ( ) Não
- Aplicações tópicas de fluoretos ( ) Não ( ) Sim- Data \_\_\_\_\_
  - Bochechos com soluções fluoretadas ( ) Não ( ) Sim- Concentração \_\_\_\_\_
  - Dentifícios fluoretados ( ) Não ( ) Sim- Concentração \_\_\_\_\_
- Uso de Agentes Antimicrobianos
  - Clorexidina ( ) Não ( ) Sim- Frequência \_\_\_\_\_
  - Outros \_\_\_\_\_
- Doenças Sistêmicas ( ) Não ( ) Sim- Qual \_\_\_\_\_
- Uso crônico de Medicamento que reduz o fluxo salivar ou que contém açúcar (xaropes)  
 ( ) Não ( ) Sim - Qual \_\_\_\_\_

**2. FATORES RELACIONADOS À DIETA** \*associar com dados do diário alimentar

- Frequência de ingestão de alimentos açucarados ( ) Às refeições ( ) Entre as refeições
- Amamentação noturna no seio materno? ( ) Não ( ) Sim- Frequência \_\_\_\_\_
- Dorme na cama com a mãe? ( ) Não ( ) Sim
- Faz uso de mamadeira noturna? ( ) Não ( ) Sim- Frequência \_\_\_\_\_  
 Composição da mamadeira \_\_\_\_\_
- Realiza higiene bucal após as mamadas noturnas? ( ) Não ( ) Sim
- Consome, em alta frequência
 

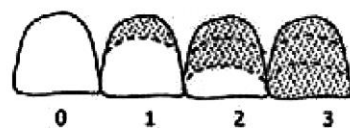
( ) chicletes	( ) refrigerantes	( ) catchup
( ) balas	( ) sucos de frutas	( ) chips
( ) chocolates	( ) bolachas	( ) todinho
( ) outros _____		

#### 4. EXAME CLÍNICO

- Número de manchas brancas ativas \_\_\_\_\_ ( ) superfícies lisas ( ) superfícies oclusais
- Número de lesões de cárie com cavitação \_\_\_\_\_ ( ) superfícies lisas ( ) superfícies oclusais
- Cor e consistência das lesões de cárie \_\_\_\_\_
- Número de superfícies dentais restauradas \_\_\_\_\_

##### 4.1. ÍNDICE DE HIGIENE ORAL SIMPLIFICADO (IHO-S)

###### Índice de Greene e Vermillion Simplificado (1964)



- 0: ausência de biofilme
- 1: até 1/3 da superfície dental
- 2: até 2/3 da superfície dental
- 3: mais de 2/3 da superfície dental

1- Atribuir escores de 0 a 3 para biofilme e cálculo dental nas faces dos dentes indicados na tabela

Dente* /Face	Biofilme Dental (0-3)	Cálculo Dental (0-3)
16 V (ou 55)		
11 V (ou 51)		
26 V (ou 65)		
36 L (ou 75)		
31 V (ou 71)		
46 L (ou 85)		
IHO= Soma + 6		

\* Apenas dentes totalmente irrompidos. Na ausência substituir pelo dente adjacente

2- IHO= Soma dos escores + número de dentes avaliados (6)

3- Resultados: 0-1: Satisfatório    1,1-2: Regular    2,1-3: Deficiente    >3,1: Muito ruim

###### Reavaliação

Data	IHO-S Biofilme Dental	IHO-S Cálculo Dental