



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DOENÇA CÁRIE.
ESTUDO *IN VIVO***

ALESSANDRA BAPTISTA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional em *Lasers* em
Odontologia.**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Martha Simões Ribeiro

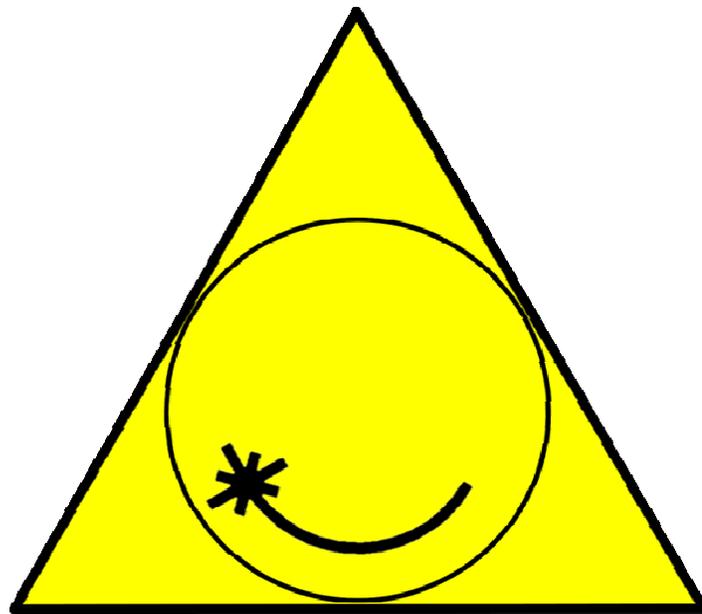
Co-orientador:

Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji

SÃO PAULO

2009





Mestrado Profissionalizante Lasers em
Odontologia

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DOENÇA CÁRIE.
ESTUDO *IN VIVO***

ALESSANDRA BAPTISTA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre Profissional em *Lasers* em
Odontologia.**

**Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Martha Simões Ribeiro
Co-orientador:
Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji**

**SÃO PAULO
2009**

Dedico este trabalho:

À Deus que sempre ilumina meu caminho.

Ao meu pai (*in memoriam*) é imenso o orgulho e gratidão.

Coragem, Confiança, Amor, Respeito, expressam meus sentimentos por você, mamãe.

Rodolfo, meu melhor amigo, cúmplice e incentivador, dedico a você não só este trabalho, mas também todo meu amor.

A minha avó, e ao meu irmão, pessoas sempre presentes e especiais em todos os momentos da minha vida.

Ao meu filho André, pela certeza de que viver vale a pena.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Martha Simões Ribeiro, que se mostrou mais do que orientadora, uma amiga, agradeço os conhecimentos transmitidos e a oportunidade da realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Edgar Yuji Tanji, agradeço pela colaboração e boa vontade.

À Prof^ª. Dr^ª. Denise Maria Zezell, à Prof^ª. Dr^ª. Sônia Baldochi e ao Prof. Dr. Wagner de Rossi, por terem aberto as portas de seus laboratórios.

Ao Renato Prates, pela paciência, amizade e principalmente por acreditar que daria certo. Sua colaboração foi essencial no nosso trabalho.

À Ilka, pela colaboração, paciência, boas idéias e estar sempre próxima e disposta a colaborar.

À Daiane por me encorajar com os ratos.

À Melissa, ao China, à Silvia, ao Aguinaldo e à Cris pela acolhida e boas idéias.

À Andréa Malavazi, por ser competente, amiga e incentivadora.

À todos os professores do CLA, pela colaboração.

À Neide e todo o pessoal do biotério do IPEN, pela colaboração e profissionalismo.

Aos funcionários do CLA, sempre tão atenciosos e prestativos.

Aos funcionários do LELO, pela imensa colaboração.

À todos os meus colegas da turma 8 do curso.

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DOENÇA CÁRIE. ESTUDO *IN VIVO*

Alessandra Baptista

RESUMO

A redução de microorganismos patogênicos da superfície dental é um dos principais fatores envolvidos na prevenção e controle das lesões de cárie. A terapia fotodinâmica é uma forma de fototerapia baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos, ativadas pela presença da luz. Células consideradas alvo da terapia fotodinâmica são coradas com o fotossensibilizador e irradiadas com luz, produzindo espécies reativas de oxigênio que resultam em morte celular. Esta terapia tem mostrado efetividade em microrganismos patogênicos. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver lesões de cárie dentária em modelo animal e avaliar a redução microbiana de microaerófilos totais, através da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana, associando como fotossensibilizador o azul de metileno, na concentração de 100 μ M e o *LED (light-emitting diode- diodo emissor de luz)* de emissão vermelha ($\lambda = 640 \pm 30$ nm), com 240mW de potência e fluência de 86J/cm², por 3 min. Os resultados obtidos sugerem que foi possível a indução de lesões de cárie *in vivo*, e que a terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana foi efetiva na redução de microaerófilos totais, nos parâmetros testados. Além disso, o número de microrganismos após a terapia fotodinâmica permaneceu significativamente abaixo do controle por 10 dias após o tratamento.

EFFECT OF THE THERAPY PHOTODYNAMIC IN THE DISEASE CARIE. ESTUDY *IN VIVO*

Alessandra Baptista

ABSTRACT

The reduction of pathogenic microorganisms in supragingival plaque is one of the principal factors in the prevention and control of caries. Photodynamic therapy (PDT) is a phototherapy based on the utilization of substances that can photosensitize biological tissues and are capable of being activated in the presence of light. The cells that are considered therapeutical targets are stained with the photosensitizing agent and irradiated with light, producing cytotoxic reactive oxygen species responsible for cellular death. In addition, this technique also shows effective destruction of pathogenic microorganisms. The purpose of this study was to develop a model of induced-dental caries *in vivo*, and evaluate the effectiveness of photodynamic therapy in total microorganisms using methylene blue, at a concentration of 100 μ M, as the photosensitizing agent and an LED (light emitting diode) device as the light source with an emission band centered at ($\lambda = 640 \pm 30\text{nm}$) and fluence of 86 J/cm², output power of 240mW, and exposure time of 3 min. Our results suggest that it was possible to induce dental caries *in vivo*, and photodynamic therapy was effective on the tested parameters. Besides, the number of microorganisms following PDT remained lower than control group until 10 days post-treatment.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	10
2. Objetivos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Cárie Dental.....	15
3.2 Microbiologia da Cárie.....	17
3.3 Cárie Experimental em Ratos.....	20
3.4 A Terapia Fotodinâmica.....	22
3.4.1 Histórico.....	22
3.4.2 Fotossensibilizadores.....	24
3.4.3 Fontes de Luz.....	26
3.4.4 Mecanismos de Ação.....	27
3.4.5 Vantagens da Terapia Fotodinâmica.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 O Fotossensibilizador.....	30
4.2 A Fonte de Luz.....	30
4.3 Animais e Bactéria.....	31
4.3.1 Bactéria.....	31
4.3.2 Animais.....	31
4.4 Procedimento Experimental.....	31
4.5 Análise Microbiológica.....	34
4.6 Análise Microscópica.....	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Indução de Cárie <i>in vivo</i>	36
5.5 Análise Microbiológica.....	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	43
ANEXO – Aprovação do comitê de ética IPEN.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

Na Odontologia, as infecções bucais caracterizam-se, em sua maioria, por lesões localizadas provocadas por microrganismos conhecidos e por serem lesões relativamente superficiais¹. A microbiota bucal dos humanos é altamente complexa e diversa, sendo caracterizada pela presença de cerca de 400 espécies bacterianas identificadas além de protozoários, fungos, micoplasmas e vírus².

As lesões de cárie mantiveram-se com uma baixa incidência até o século XIX, mas devido à revolução industrial, começaram a ser desenvolvidos produtos industrializados utilizando açúcar refinado, o que provocou grande aumento na prevalência de lesões cariosas, tornando-se em meados do século XX, na Europa, a situação mais severa já observada da doença em populações humanas³.

A cárie dentária pode ser definida como uma doença infecto-contagiosa, que determina, inicialmente, uma dissolução localizada dos componentes inorgânicos dos dentes, devido aos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis da dieta. Com a progressão do processo, ocorre a dissolução dos minerais da dentina e desnaturação do colágeno⁴.

Várias pesquisas encontraram uma forte associação entre a cárie do esmalte e os níveis de *Streptococcus mutans* no biofilme^{5,50,66}. O desenvolvimento de lesões em todas as superfícies aparenta envolver diferentes ondas de sucessão bacteriana, refletindo mudanças nos determinantes ecológicos chaves, no decorrer do tempo. *Streptococcus mutans* é o microrganismo mais implicado no início de cárie, enquanto os *Lactobacillus* aparentam estar relacionados à progressão de lesões no esmalte^{2,5,6,7}. Atualmente, no estudo da cárie dental, é importante distinguir o conceito de doença, do conceito de lesão. Para que o indivíduo seja portador da doença cárie, basta ter sido infectado por microrganismos cariogênicos, destacando-se *Streptococcus mutans*, mesmo sem a prevalência de lesões cariosas. A progressão da cárie, ou o processo de reversão da mesma, é determinada pelo balanço entre os fatores de proteção e

os fatores patológicos. Dessa forma, um indivíduo poderá ter a doença cárie e não desenvolver lesões cariosas, mas nunca poderá desenvolver lesões cariosas sem a doença cárie³.

A remoção mecânica da placa por procedimentos eficientes de higiene bucal pode prevenir quase que completamente o aparecimento das lesões de cárie. Tais medidas são particularmente efetivas quando combinadas com uma redução na quantidade e frequência da ingestão de açúcar⁸. No entanto, é difícil alterar hábitos alimentares já estabelecidos e manter um alto grau de motivação para uma higiene oral efetiva. Portanto, estratégias para o controle ou prevenção de cárie dental são baseadas em reduzir os níveis de biofilme em geral, ou bactérias cariogênicas específicas em particular, por exemplo, por meio de agentes antimicrobianos, e potencializar a remineralização e fortalecer a resistência do esmalte ao ataque ácido, através da utilização de flúor⁵⁷.

A tecnologia *laser* apresenta-se, atualmente, como uma alternativa eficaz para as ações de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento da doença cárie.

A ação antimicrobiana dos *lasers* de baixa potência associado a fotossensibilizadores, só começou a ser efetivamente estudada na década de 90, quando a terapia fotodinâmica inicialmente idealizada para o tratamento de câncer foi trazida à odontologia. Enquanto que no tratamento do câncer o alvo da terapia fotodinâmica é promover a morte seletiva das células tumorais, no caso da odontologia, surge uma nova perspectiva para a utilização da terapia fotodinâmica, tendo como alvo as células bacterianas envolvidas no desenvolvimento das lesões de cárie, doenças periodontais e contaminações endodônticas⁹. A terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, tanto sua ação sobre diferentes bactérias, como sua ação antifúngica, principalmente em casos de infecções localizadas, de pouca profundidade e de microflora conhecida, como as de ocorrência mais frequentes na cavidade oral^{1,10-18}. Nesse contexto, a utilização de *lasers* associados a fotossensibilizadores são capazes de matar microrganismos patogênicos, surgindo como uma terapia auxiliar ao tratamento odontológico preventivo e restaurador.

A terapia fotodinâmica é uma forma de fototerapia, que consiste no conceito de abordagem minimamente invasiva, baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras nos tecidos biológicos, ativadas pela presença da luz. Células consideradas alvo da terapia serão coradas com o fotossensibilizador e irradiadas. A molécula do fotossensibilizador passará para um estado excitado, e voltando ao estado estável, irá transferir esta energia para o sistema, propiciando um efeito fotoquímico que normalmente leva a morte celular por dano oxidativo^{10,19-25}.

Diversos fotossensibilizadores com finalidade antimicrobiana são estudados e testados. Os mais comuns são os da família das fenotiazinas, como o azul de metileno e o azul de toluidina²⁶. As características ideais de um fotossensibilizador promissor para terapia fotodinâmica seriam a estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais. Para a identificação de um composto como agente fotoativo, uma sequência de processos deve ser estudada. Os parâmetros físico-químicos do composto devem ser avaliados. Entre as características importantes do fotossensibilizador estão a banda e intensidade de absorção, bem como sua eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio, e o tempo de vida no estado tripleto.

O desenvolvimento de uma terapia eficiente para a obtenção de efeito bactericida sobre bactérias presentes em biofilmes orais e sobre a cárie dental, utilizando *LED* (*light-emitting diode*- diodo emissor de luz) como fonte luminosa, é interessante, principalmente no que se diz respeito ao custo reduzido, quando comparada à obtenção de efeito antimicrobiano utilizando *lasers* de alta potência, o que permite uma maior popularização da técnica. O *LED* também produz irradiação num comprimento de onda específico, porém com uma faixa mais ampla no espectro eletromagnético^{9,27-29}.

A terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana vem se tornando uma ferramenta importante, conseguindo maior qualidade nas ações curativas e preventivas desenvolvidas na Saúde Bucal da criança e do adulto. Pode oferecer algumas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana é rápida, diminuindo a necessidade de manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos

períodos, como no caso do uso de agentes antimicrobianos. Em segundo lugar, é seletiva, ou seja, nem o fotossensibilizador nem a luz empregados isoladamente possuem ação bactericida, portanto a ação antimicrobiana fica restrita a região corada e irradiada simultaneamente. Finalmente, a resistência bacteriana também é improvável, porque a morte bacteriana não está ligada à mediação de radicais químicos^{10,11,15,16,18,23,30}. Outro aspecto importante é o caráter atraumático da terapia fotodinâmica, que teria grande aplicabilidade a pacientes especiais e pediátricos.

Por estas razões, a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa interessante na redução microbiana e, conseqüentemente, importante na prevenção e tratamento das lesões cariosas. Sendo assim, quaisquer contribuições teórico-práticas nesta linha de pesquisa são importantes, não só para aumentar o acervo de conhecimentos científicos, mas também para fornecer respaldo científico à democratização do acesso aos usuários da terapia com *laser*.

Neste trabalho, foi utilizado um protocolo de indução de cárie em animais para ser possível analisar mais objetivamente os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre microrganismos cariogênicos, associando como fotossensibilizador o azul de metileno e fonte luminosa um *LED* de emissão vermelha.

2. OBJETIVOS

- Desenvolver um modelo de cárie *in vivo* utilizando dieta cariogênica e inoculação de *Streptococcus mutans*;
- Investigar se o fotossensibilizador azul de metileno, associado ao *LED* de emissão vermelha ($\lambda = 640 \pm 30\text{nm}$) possui ação fotodinâmica em microrganismos, *in vivo*, através de análise microbiológica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cárie Dental

A cárie dental é uma das doenças mais antigas e de maior prevalência nos seres humanos. Existem relatos da ocorrência de lesões cariosas há mais de um milhão de anos³, entretanto, foi no final do século XIX, que se iniciaram os primeiros estudos considerados clássicos e fundamentais para o entendimento da doença na atualidade^{31,33,34}. Assim, o mistério da perda dos dentes começou a ser explicado, e o tratamento de uma possibilidade de mantê-los na boca começou a ser investigado⁴.

W. D. Miller³⁵, em 1890, estabeleceu a fundamentação do nosso entendimento atual sobre a complexidade da microbiota da cavidade bucal, em seu trabalho intitulado “*Os microrganismos da boca humana*”:

(...) carboidratos retidos em torno dos dentes eram fermentados por componentes microbianos da flora normal da cavidade oral e os ácidos resultantes determinavam a descalcificação do esmalte dentário; então, outras bactérias invadiam o dente através da lesão inicial, destruindo a dentina subjacente³⁶.

Anton van Leeuwenhoek³⁷, em 1897, observou “pequenos animais” na placa dentária, através do uso do microscópio.

G.V. Black³⁵, em 1914, definiu a cárie dentária da seguinte maneira:

“A cárie dentária, na sua mais simples expressão, consiste na dissolução química dos sais de cálcio do dente pelo ácido láctico, acompanhada pela decomposição da matriz orgânica, ou corpo gelatinoso, que, na dentina, ocorre após a dissolução dos sais de cálcio. Na cárie de esmalte, toda a substância tecidual é removida pela dissolução de sais de cálcio, havendo tão pouca matriz orgânica no esmalte que ele não irá se manter íntegro e, conseqüentemente, uma cavidade é formada pela simples dissolução dos sais de cálcio dos quais o esmalte é composto. Esta dissolução sempre se inicia na superfície, nunca no interior. A destruição do dente é, portanto, causada por um agente atuando de fora do dente, nunca dentro dele. É algo estranho ao dente,

atuando na superfície no início e penetrando pouco a pouco na sua subsuperfície.”

Stephan³⁷, em 1944, registrou graficamente as mudanças de pH na placa, após bochechos com solução de sacarose.

Gustafsson *et al.*³¹, em 1954, conduziram um estudo em Vipeholm, na Suécia, entre 1946 e 1951, que permanece como uma das mais importantes contribuições em toda a literatura odontológica no surgimento da lesão de cárie e definitivamente estabelece que, quanto maior a frequência do consumo de carboidratos fermentáveis, principalmente aqueles de consistência pegajosa, maior a incidência de lesões de cárie. Assim, foi relacionado o desenvolvimento de lesões de cárie ao consumo de uma dieta rica em carboidratos⁸.

Orland³², em 1954, submeteu ratos mantidos livres de microrganismos desde o seu nascimento a uma dieta cariogênica por 90 dias, ao final do que não verificou nenhuma lesão cariosa. Em contrapartida, animais que recebiam a mesma dieta, mas estavam contaminados, desenvolveram cárie. Portanto, a partir de seus trabalhos, comprovou a suspeita da necessidade de termos microrganismos presentes para o desenvolvimento de lesões de cárie.

Keyes⁴, em 1960, comprovou os dados de Orland, acrescentando o conhecimento de que os microrganismos cariogênicos são transmissíveis, concluindo o princípio de que a cárie é uma doença infecto-contagiosa.

Keyes³³, em 1968, em estudos com cobaias, concluiu que para o desenvolvimento da lesão de cárie, três fatores eram determinantes. O hospedeiro (dente), a microbiota local e o substrato (dieta), conhecido como a “Tríade de Keyes”.

Von der Fehr *et al.*³⁴, em 1970, demonstrou o desenvolvimento e a paralisação de lesões iniciais de mancha branca em humanos.

Newbrun³⁸, em 1978, completou a “Tríade de Keyes”, incluindo no diagrama o quarto fator, o tempo, que deve agir simultaneamente com os outros

três fatores para que as condições de desmineralização predominem sobre as de remineralização e as lesões progridam.

A cárie dentária, portanto, pode ser definida como uma doença infecto-contagiosa degenerativa de origem multifatorial, que resulta na destruição localizada dos tecidos dentários. É fortemente influenciada pelos carboidratos da dieta e pela ação dos componentes salivares, que resulta em uma perda localizada de miligramas de minerais dos dentes afetados, causada por ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta. No seu processo, vários fatores secundários também estão envolvidos, sendo esta característica importante no momento da sua prevenção ou tratamento. Como fatores secundários, podemos citar: os fatores sócio econômicos, comportamentais e culturais que influenciam na compreensão da importância da dieta não cariogênica, na higiene oral, no uso de flúor, dentre outros³⁹.

Uma série de fatores intrínsecos ao hospedeiro determina a severidade da doença, como a composição e o fluxo da saliva, a natureza físico-química do dente, a sua forma e seu alinhamento na arcada⁴⁰.

Após a desmineralização do esmalte, a lesão progride lentamente em direção à dentina, sendo que raramente é autolimitante e, na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária.

3.2 Microbiologia da Cárie

A partir do conhecimento produzido por Miller, de que os microrganismos presentes na placa seriam os responsáveis pela cárie, os trabalhos voltaram-se para maior conhecimento destes microrganismos, no intuito de prevenir a doença, e reduzir as lesões provocadas pelos mesmos⁴. Assim, a existência de uma microbiota residente na boca é natural, e tem uma contribuição significativa para a saúde do hospedeiro^{41,42}. Entretanto, em doenças como a cárie, um desafio para o cirurgião dentista, é usar estratégias de tratamento que atinjam os microrganismos causadores, sem prejudicar as propriedades benéficas da microbiota oral residente⁴³.

A boca é, ao mesmo tempo, um ambiente amigável e hostil para o crescimento bacteriano. Os microrganismos que habitam a cavidade oral

proliferam num ambiente quente e úmido. Alguns são aeróbios, o que quer dizer que necessitam de oxigênio para se desenvolverem e multiplicarem, outros são anaeróbios, ou anaeróbios facultativos, proliferam onde não há oxigênio, na profundidade de biofilmes, sobre as diferentes superfícies, e correspondem ao maior número⁴⁴. A coloração de Gram, assim designada em memória de Hans Christian Joachim Gram, que desenvolveu o procedimento em 1884, classifica os microrganismos em Gram+ ou Gram-, e continua a ser um dos métodos mais empregados para a classificação dos mesmos. Tal classificação se baseia na diferente constituição da parede celular dos microrganismos. Os dois tipos celulares possuem uma parede composta por peptidoglicanos, sendo que nos Gram+, essa parede possui aproximadamente de 15 a 80nm, enquanto que nos Gram-, essa parede é menor que 10nm. No entanto, as camadas de peptidoglicanos são relativamente porosas, permitindo a passagem de diversas macromoléculas. Além da fina camada de peptidoglicanos, os Gram- possuem, externamente a esta, uma membrana funcional altamente eficaz, que constitui uma barreira adicional à entrada de alguns antibióticos e muitos corantes⁴⁵.

A boca é a única área normalmente acessível no corpo que possui superfícies duras não escamativas para colonização microbiana. Estes tecidos únicos possibilitam que grandes massas de microrganismos (predominantemente bactérias) e seus produtos extracelulares se acumulem formando biofilmes como a placa dentária⁴⁶. Dentes possuem superfícies distintas para colonização microbiana; cada superfície (por exemplo, fissuras, superfícies lisas, proximal, sulco gengival), irá amparar uma microflora distinta em razão de suas propriedades biológicas intrínsecas. A grande variação da microflora mostra que cada fissura é um sistema ecológico separado, onde geralmente predominam cocos Gram+ (70 a 90% da flora), anaeróbios facultativos, especialmente *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, enquanto que fusiformes, espiralares e espiroquetas estão ausentes. *Streptococcus mutans* tem sido frequentemente isolado em grande número de placas de superfícies lisas e lesões de fissura⁴⁷.

Os microrganismos não colonizam diretamente a superfície mineralizada do dente. Os dentes são sempre cobertos por uma camada protéica acelular denominada película adquirida. Os constituintes principais da película são glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e, em menor extensão,

componentes do fluido gengival⁴⁸. A composição da película tem recebido considerável interesse devido ao seu papel potencial de determinar a composição da microbiota inicial. Essa colonização inicial caracteriza-se por interações bioquímicas específicas. Espécies bucais do gênero *Streptococcus* constituem cerca de 60 a 80% dessas bactérias pioneiras. O predomínio dos *Streptococcus* é explicado pelos seus altos graus de adesão ao dente e à glicoproteína salivar que o recobre e, também, à facilidade com que suas células se co-agregam, fatores que favorecem muito as suas colonizações⁴⁹. Estas populações pioneiras se multiplicam, formando microcolônias, as quais ficam mergulhadas em muco bacteriano extracelular e polissacarídeos, juntamente com camadas adicionais de proteínas salivares adsorvidas e glicoproteínas. A placa se transforma em um biofilme, de forma que o metabolismo das espécies pioneiras crie condições apropriadas para a colonização por bactérias com maior nível de exigências atmosféricas.

O biofilme funciona como uma verdadeira comunidade microbiana e ocorrem inter-relações metabólicas sinérgicas, capacitando algumas bactérias delicadas sobreviverem e crescerem sob condições que não tolerariam em uma cultura pura. A formação do biofilme envolve uma colonização ordenada, ou seja, uma sucessão microbiana⁴⁶.

As bactérias cariogênicas podem ser encontradas naturalmente no biofilme dental, porém em pH neutro, esses microrganismos são fracamente competitivos e estão presentes apenas em pequenas proporções da comunidade total da placa. Nesta situação, com uma alimentação convencional, os níveis de tais bactérias potencialmente cariogênicas são clinicamente insignificantes, e os processos de desmineralização e remineralização estão em equilíbrio. Se a frequência da ingestão de carboidratos fermentáveis aumenta, o pH torna-se baixo, favorecendo a proliferação de *Streptococcus mutans* que resultam na produção exacerbada de ácidos, favorecendo a desmineralização dental⁴⁶.

Streptococcus mutans é capaz de sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, responsáveis pelo mecanismo de adesão que garante a fixação dos microrganismos às estruturas dentárias. Possui também a capacidade de produzir polissacarídeos intra-celulares, que servem como substrato de reserva para continuar a produção de ácidos, mesmo em períodos

em que não há nutriente disponível no meio. Aos microrganismos que possuem esta habilidade, garante-se uma vantagem seletiva no ecossistema. *Streptococcus mutans* possui ainda, a capacidade de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, tais como em pH baixo. Poucas bactérias orais são capazes de tolerar condições ácidas por longos períodos; entretanto, *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus* não só permanecem viáveis em pHs baixos, mas preferencialmente crescem e metabolizam produtos, isto é, são acidogênicos e acidúricos⁴.

Os *Lactobacillus* foram os primeiros microrganismos a serem responsabilizados pelo início das lesões de cárie, já que são acidogênicos, acidúricos² e estavam presentes em maior número sobre sítios cariados do que em sítios não cariados. Entretanto, estudos posteriores mostraram que esses microrganismos não possuem capacidade de aderir à superfície dental e estavam presentes em maior número em lesões avançadas, já cavitadas, desempenhando, portanto, papel mais importante no desenvolvimento do processo cariioso^{4,6,7}.

Streptococcus mutans foi originalmente isolado do dente humano cariado por Clarke em 1924⁵⁷. Pouca atenção foi dada a esta espécie até 1960, quando foi demonstrado que *Streptococcus mutans* poderia causar cáries em superfícies lisas, assim como em fóssulas e fissuras, em hamsters e ratos alimentados com dietas cariogênicas, infectados com cepas semelhantes ao *Streptococcus mutans*³³.

Outro estudo realizado em 1986, considerou evidente que *Streptococcus mutans* e o *Lactobacillus* estão ligados ao processo de inibição e progressão das lesões de cárie⁵².

3.3 Cárie Experimental em Ratos

Em condições naturais, é raro encontrarmos lesões de cáries em roedores, devido a combinação do pH elevado, ausência de bactérias cariogênicas e uma dieta com baixo teor de sacarose. Experimentalmente, o rato vem sendo utilizado como modelo de estudo para verificar a cariogenicidade de vários componentes nutricionais e diferentes tipos de dietas, para verificar os

microrganismos relacionados à cárie e a eficácia de diversos agentes cariogênicos⁵³⁻⁵⁵.

Nas décadas de 20 e 30, muitos estudos nutricionais foram realizados em roedores. Coincidentemente, nestes estudos descobriu-se que o rato de laboratório poderia desenvolver cárie dentária. Ratos e hamsters desenvolveram cáries extensas quando submetidos a uma dieta rica em sacarose, porém, em camundongos o mesmo não ocorria. Estes resultados colaboraram muito no campo da pesquisa da cárie dentária, uma vez que estes animais poderiam ser produzidos e mantidos a baixo custo⁵⁶.

Na década de 40, Mc Clure e Hewitt³⁷ observaram inibição de cárie em ratos que receberam penicilina, mesmo submetidos à dieta cariogênica.

Em 1954, ratos mantidos livres de microrganismos desde o nascimento, e submetidos a uma dieta cariogênica por 90 dias, não desenvolveram nenhuma lesão de cárie, enquanto que animais que receberam a mesma dieta, mas estavam contaminados, desenvolveram lesões de cárie³².

Em 1960, hamsters livres de microrganismos foram isolados e mantiveram-se sem lesões de cárie, mesmo recebendo dieta cariogênica. Um outro grupo de animais contaminados, foi isolado (em separado), recebendo a mesma dieta. Em um segundo momento, os grupos foram misturados e foram encontradas lesões cariosas em animais que anteriormente não apresentavam esse tipo de lesão³³.

A morfologia dos molares de um rato ou hamster é diferente da morfologia humana. Os molares dos ratos são atravessados por fissuras profundas e tem uma camada fina de esmalte, que não cobre as pontas das cúspides. No momento da erupção dentária, esta camada de esmalte ainda está hipomineralizada, especialmente na base e nas laterais das fissuras. Este fenômeno, associado com a propensão das fissuras mais profundas de acumular mais resíduos alimentares, predispõe o rato ao desenvolvimento da cárie de fissura⁵⁶.

Streptococcus mutans pode causar cárie de superfícies lisas, assim como em fossas e fissuras em hamsters, *gerbils*, ratos e macacos alimentados com dieta cariogênica, sendo o grupo de bactérias mais cariogênicas encontradas. Outras bactérias, como *S. mitis*, *S. anginosus* e *S. salivarius*,

Enterococcus faecalis, *Actinomyces naeslundii*, *A. viscosus* e *Lactobacillus*, podem também produzir cárie sob condições orientadas, em alguns animais, apesar das lesões serem normalmente restritas às fissuras. O papel chave do *S. mutans* em cáries dentais tem sido demonstrado durante estudos de vacinação. A imunização de roedores ou primatas com células inteiras ou antígenos específicos de *S. mutans* e *S. sobrinus* reduziu o número destes microrganismos na placa e diminuiu o número de lesões cáries quando comparado com animais controle⁵⁷. Uma dieta rica em sacarose transforma a microbiota oral indígena do animal, aumentando particularmente *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus rattus*, ocasionando um aumento do índice de cárie dental em rato⁵⁸.

3.4 A Terapia Fotodinâmica

3.4.1 Histórico

A terapia baseada em luz não é nova. O uso de fotossensibilizadores exógenos para melhorar a eficácia da fototerapia foi descrito no *Atharva Veda*, um livro indiano sagrado datado de 1400 a.C. Civilizações antigas como a Índia, Egito e China, usavam a ação fotodinâmica através da ingestão de plantas contendo psoralenos, associadas à exposição da luz solar, para tratamento de doenças de pele, como vitiligo e psoríase, o que o filósofo grego Heródoto chamava de Helioterapia⁵⁹.

A terapia fotodinâmica contemporânea começou em 1900, quando Oscar Raab observou, acidentalmente, que um meio de cultura contendo baixas concentrações de corante de acridina, exposto a uma luz intensa (neste experimento foi utilizado os raios de uma tempestade) apresentava como consequência a morte do paramécio cultivado, o protozoário causador da malária⁶².

Em 1903, Von Tappeiner e Albert Jesionek, realizaram o tratamento de carcinomas de células basais com a aplicação de solução 5% de eosina, por via tópica e posterior exposição à luz branca ou à luz solar. O termo *Photodynamische Wirkung* (Efeito Fotodinâmico), foi então cunhado por Tappeiner e Jodlbauer, para

todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotossensibilizador, que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de células⁶².

Os efeitos biomédicos desta terapia passaram a interessar ainda mais a comunidade científica, desde o desenvolvimento do primeiro *laser* comercial em 1960. A utilização do *laser* e outras fontes de luz nas ciências da vida baseiam-se em uma grande variedade de fenômenos associados à interação da luz com os tecidos biológicos⁶².

O grande avanço da terapia fotodinâmica teve início com a descoberta da primeira geração de fotossensibilizadores, os derivados da hematoporfirina, começando com Schwartz no início da década de 60. Na década de 70, os estudos se voltaram para a utilização da terapia fotodinâmica em microrganismos⁶².

Em 1976, Weishaupt e colaboradores postularam que o oxigênio singleto gerado por sensibilização, a partir da transferência da energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela morte celular⁶².

Na busca por novos fotossensibilizadores mais específicos, fotoativos e com menos efeitos colaterais, surgiu, na década de 90, a chamada segunda geração de fármacos (ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas) e a terceira geração (compostos fotossensíveis de segunda geração modificados: Visudyne® e outros)⁶².

Estudos da década de 1990, utilizando principalmente o azul de ortotoluidina (TBO) como agente fotossensibilizador, evidenciaram que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se periodontopatogênicas e as cariogênicas, eram susceptíveis a esta terapia^{10,11,15,16,18,23,30}. Assim sendo, adaptou-se a utilização de uma técnica empregada a pacientes oncológicos para combater bactérias orais, surgindo daí o interesse em desenvolver um método de descontaminação da dentina cariada, baseado na terapia fotodinâmica⁶³.

A ação bactericida da associação dos fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina, e o *laser* de HeNe ($\lambda = 632,8\text{nm}$) em bactérias cariogênicas, tanto *in vitro*, como *in vivo*, em tempos de irradiação que variavam de 30s a 5min foi comprovada¹. Inicialmente, o efeito bactericida da terapia fotodinâmica foi estudado sobre microrganismos em suspensão^{11,13,15,16,18}.

Recentemente, novos estudos começaram a avaliar a efetividade dessa terapia em microrganismos presentes em biofilmes, aderidos à dentina e à matriz de colágeno. A mudança no perfil das pesquisas ocorreu devido ao conhecimento da importância do efeito da interação da luz com o tecido alvo, uma vez que a terapia fotodinâmica antimicrobiana tem se mostrado menos efetiva na redução de bactérias presentes em dentina e em matriz de colágeno, do que em suspensão^{9,10,64,65}.

Em 2002, estudo demonstrou que em um *pool* de saliva humana submetido à terapia fotodinâmica antimicrobiana, ocorria um efeito bactericida total sobre *Streptococcus mutans*, e efeito bactericida parcial sobre *Streptococcus* totais presentes na saliva humana. A relevância deste estudo está na eliminação das espécies mais patogênicas, com preservação de parte da microbiota residente, já que a esterilização da cavidade oral não é recomendada por tornar o hospedeiro mais susceptível ao aparecimento de infecções oportunistas⁶⁶.

Em 2005, estudo *in vitro*, comparando a efetividade da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana, utilizando duas diferentes fontes luminosas, o *laser* de HeNe e o *LED*, em *Streptococcus mutans* crescidos em biofilme, similar ao que ocorre *in vivo*, demonstrou resultados iguais na ação bactericida das duas fontes de luz⁹.

3.4.2 Fotossensibilizadores

Ushoa *et al.*⁶⁷ colocam que uma das linhas de pesquisas fundamentais para a evolução da terapia fotodinâmica é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. Buscam-se compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes, contribuindo para uma maior atividade, menor custo e maior popularização da terapia fotodinâmica. Os estudos *in vitro* e *in vivo* destes compostos tem apresentado grandes contribuições, não só na busca de fotossensibilizadores mais eficazes, mas também no entendimento dos mecanismos de ação e da relação entre a estrutura e a atividade, contribuindo para o avanço e popularização da terapia fotodinâmica⁵⁹.

Para otimizar os resultados da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana, deve-se observar uma estreita relação entre a absorção do

fotossensibilizador e o comprimento de onda utilizado, pois a ação fotoquímica só ocorre quando uma série de parâmetros são estabelecidos. A presença do fotossensibilizador, ativado por uma fonte de luz ressonante, promovendo boa absorção do comprimento de onda emitido, gera o efeito desencadeador da terapia fotodinâmica⁶⁸.

Para que um composto venha a atuar como um bom fotossensibilizante é importante que este apresente as seguintes características:

- 1) Banda de absorção, e eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio;
- 2) Baixa citotoxicidade no escuro;
- 3) Facilidade de obtenção em escala industrial, com boa reprodutividade e custos reduzidos;
- 4) Permeabilidade em tecido e seletividade.

Diversos fotossensibilizadores com finalidade antimicrobiana são estudados e testados para odontologia. Os mais comuns para utilização tópica são os da família das fenotiazinas, como o azul de metileno e o azul de toluidina²⁶.

O azul de metileno é um composto fenotiazínico de cor azul, solúvel em água, com absorção máxima na região do vermelho visível ($\lambda = 660\text{nm}$), como mostra a Fig.1⁶⁹. Apresenta baixa toxicidade, uma vez que estes compostos são utilizados na área médica para uma série de finalidades terapêuticas, como tratamento de metahemoglobinemia⁷⁰, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto⁷¹ e como marcador cirúrgico de ressecção de tumores⁷², em concentrações muito superiores àquelas utilizadas na terapia fotodinâmica.

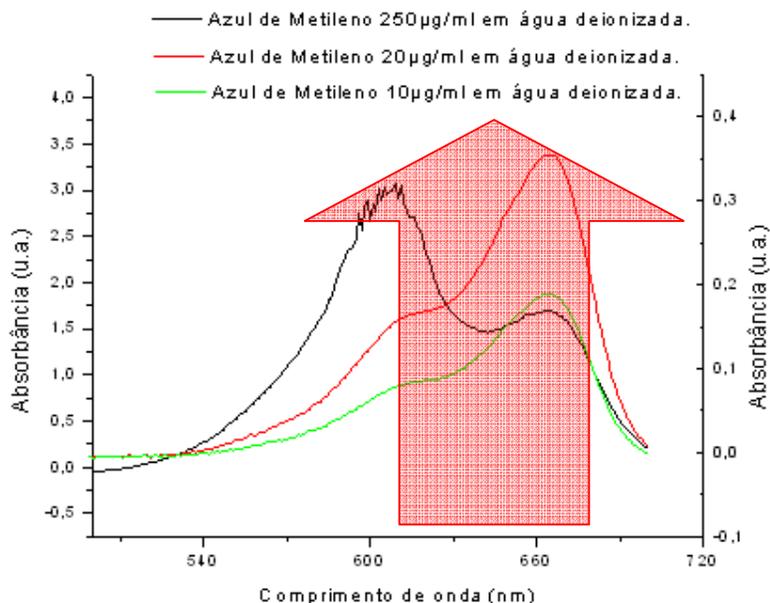


Figura 1. Espectros de absorção de solução de azul de metileno (AM) em água deionizada nas concentrações de 250 µg/mL (eixo da esquerda), 20 e 10 µg/mL (eixo direito) ⁶⁹.

3.4.3 Fontes de Luz

Atualmente, o *laser* é a fonte de luz mais empregada para ativar os fotossensibilizadores devido às propriedades que o mesmo apresenta: concentração elevada de energia, baixa divergência, coerência e monocromaticidade. É possível iluminar um meio composto por materiais diversos e só interagir com um determinado componente. A essa característica do laser damos o nome de seletividade e ela ocorre devido à propriedade da monocromaticidade, que nos permite selecionar o λ da luz *laser* de tal forma que a luz só interaja com uma determinada molécula, dentro de um universo de várias moléculas.

O uso do *LED* como fonte luminosa na terapia fotodinâmica tem sido discutido em estudos recentes ^{10,27-29,63}, pois comparados ao *laser* de baixa potência, também produzem irradiação num comprimento de onda específico,

porém em uma faixa mais ampla no espectro eletromagnético, e apresentam custo menor, o que permite uma maior popularização dessa técnica.

3.4.4 Mecanismos de Ação

No tratamento por terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador incorporado nas células é irradiado através de um laser ou de outra fonte luminosa que emite na região de absorção do fotossensibilizador, promovendo a excitação eletrônica. Atingido o estado excitado, diversos processos podem ocasionar a desativação de uma molécula⁶²:

- a energia pode ser devolvida ao ambiente na forma de calor;
- pode ser liberada na forma luminosa (fluorescência);
- fazer cruzamento intersistemas, atingindo o estado tripleto, que pode ser desativado por fosforescência.

Os danos causados pelos fotossensibilizadores em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais. No primeiro (mecanismo TIPO I), a energia das moléculas excitadas em estado tripleto é transferida para o oxigênio ou outras biomoléculas através da transferência de elétron (mecanismo radicalar) que culmina em danos diretos às biomoléculas através da formação de espécies ativas de oxigênio, por exemplo, o radical superóxido⁶².

No mecanismo TIPO II, o tempo de vida do estado tripleto é grande o suficiente para permitir que a energia de excitação seja transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto, que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar danos em membranas, proteínas e DNA, tanto por ação direta quanto por formação de radicais a partir do oxigênio singleto. O oxigênio singleto pode ser detectado por emissão luminosa no infravermelho próximo ou pelo calor liberado⁶².

Ambos os processos são de particular interesse para a terapia fotodinâmica, uma vez que conduzem à formação de moléculas muito reativas, mas estudos mostram que geralmente o efeito fotodinâmico ocorre pelo mecanismo tipo II²⁵.

O tempo de vida do oxigênio singleto em água é de aproximadamente 2 μ s. Em sistemas biológicos esse tempo pode ser reduzido em aproximadamente

100 vezes. O oxigênio singleto pode efetuar várias reações com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, levando ao dano em biomoléculas e induzindo à morte celular⁶².

Como ilustra o diagrama de Jablonski⁶² (FIG.2), os processos de desativação das moléculas são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar a contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada processo. Assim, espera-se que um bom fotossensibilizador faça cruzamento intersistemas, apresentando um alto rendimento quântico do estado tripleto e de geração de oxigênio singleto.

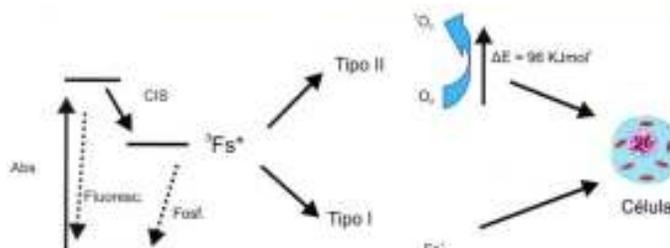


FIG.2: Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismo de ação da PDT⁶².

Abs: absorção; Fluoresc: fluorescência; CIS: cruzamento intersistemas; Fosf: fosforescência; Fs: fotossensibilizador.

As diferenças estruturais entre os diferentes tipos de bactérias devem ser levadas em consideração na efetividade da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana. De forma geral, as bactérias Gram+ são mais susceptíveis a ação da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana do que as bactérias Gram-^{25,26}. Para ocorrer a inativação, o fotossensibilizante deve ser absorvido pela parede celular, unir-se à membrana interna da célula e ainda ocorrer a possível translocação deste para o citoplasma celular, ocasionando a inibição da síntese de DNA e posteriormente de RNA e proteínas⁶².

3.4.5 Vantagens da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica pode oferecer algumas vantagens em relação a agentes antimicrobianos tradicionais. Primeiramente, a morte bacteriana é rápida, diminuindo a necessidade de manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de agentes antimicrobianos. Em segundo lugar, é seletiva, ou seja, nem o fotossensibilizador nem a luz empregados isoladamente possuem ação bactericida, portanto a ação antimicrobiana fica restrita à região corada e irradiada simultaneamente. Finalmente, a resistência bacteriana também é improvável, porque a morte bacteriana não está ligada à mediação de radicais químicos^{10,11,15,16,18,23,30}. Outro aspecto importante é o caráter atraumático da terapia fotodinâmica, que teria grande aplicabilidade a pacientes especiais e pediátricos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. O Fotossensibilizador

Foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 100 μ M diluído em água destilada, baseado nos trabalhos de Prates *et al*⁷³.

4.2. A fonte de Luz

A fonte de luz utilizada neste estudo foi um *LED* de emissão vermelha ($\lambda = 640 \pm 30$ nm). Os parâmetros utilizados estão descritos no quadro 1. Tais parâmetros foram adaptados do trabalho de Núñez⁶⁹.

Quadro 1: Parâmetros utilizados no procedimento experimental

Diâmetro do feixe (cm)	0,8
Área (cm ²)	0,5
Tempo de pré-irradiação-PIT (s)	300
Tempo de irradiação (s)	180
Potência (mW)	240
Irradiância (mW/cm ²)	480
Fluência (J/cm ²)	86
Energia (J)	43

4.3. Animais e Bactéria

4.3.1 Bactéria

Streptococcus mutans (ATCC 25175) foi cultivado na quantidade de 10^8 UFC/mL em caldo infuso de cérebro coração (BHI) a 37°C , por 48h, e inoculado nos animais por três dias consecutivos⁵³.

4.3.2 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 26 ratos machos, fornecidos e mantidos no biotério do IPEN – CNEN/SP. Os animais foram desmamados 20 dias após o nascimento e começaram a ser alimentados com uma dieta cariogênica⁵³ (50g/dia), constituída de:

- 56% de sacarose;
- 28% de leite em pó;
- 16% de ração de roedores triturada.

Para aumentar o desafio cariogênico, os animais receberam água enriquecida com 10% de sacarose *ad libitum*⁵⁴. Tanto a dieta, quanto a água enriquecida com sacarose, foram ministradas durante todo o experimento.

4.4 Procedimento Experimental

Os animais foram anestesiados com uma associação de Rompum (Xilazina-0,025mL/50g) e (Ketamina 10% - 0,04mL/50g) no 20° dia do experimento, assim que desmamados e, então, foram inoculados com 0,2mL de suspensão de *S. mutans* (10^8 UFC/mL) diretamente na cavidade oral. Após a primeira inoculação, passaram a ser alimentados com a dieta cariogênica e receberam nos dois dias seguintes, inoculação de 0,2 mL de suspensão de *S. mutans* (10^8 UFC/mL) na alimentação. Quarenta e oito horas após a última inoculação, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle e grupo tratamento (PDT).

Os animais foram novamente submetidos à anestesia. O grupo controle (GC: n=12) não recebeu nenhum tratamento, apenas irrigação com 200µL de solução tamponada. Este grupo foi avaliado imediatamente após a irrigação, no dia 25 (n=3), e nos dias 28 (n=3), 32 (n=3) e 35 (n=3), consecutivamente.

No grupo tratamento (GPDT: n= 12), os animais foram inoculados com 200µL de azul de metileno que permaneceu em contato no molar dos animais por 5min. (tempo de pré-irradiação-TPI). Depois, os dentes foram irrigados com solução salina para remoção do excesso de fotossensibilizador e então irradiados com o LED. Os animais foram avaliados imediatamente após o tratamento, no dia 25 (n=3), e nos dias 28 (n=3), 32 (n=3) e 35 (n=3) pós-tratamento. O quadro 2 mostra o cronograma experimental.

Quadro 2: Cronograma do procedimento experimental

	Dia
Nascimento do animal	0
Desmame	20
Início da dieta e inoculação de <i>S. mutans</i>	20
2ª. Inoculação de <i>S. mutans</i>	21
3ª. Inoculação de <i>S. mutans</i>	22
Tratamento e 1ª. avaliação	25
2ª. avaliação	28
3ª. avaliação	32
4ª. avaliação	35

Neste trabalho, dois animais não foram submetidos ao protocolo de indução de cárie para que fosse possível a comparação microbiológica entre dentes sadios e dentes cariados.

Cada subgrupo de três animais foi sacrificado em câmara de CO₂. A maxila foi assepticamente removida e dissecada, os molares foram extraídos e preparados para análise microbiológica.

4.5 Análise Microbiológica:

Os molares extraídos receberam um preparo para a contagem de UFC/mL. Os espécimes foram colocados em *ependorfs*, contendo 1mL de solução salina 0,85% estéril e submetidos à agitação mecânica (Vortex) de 200rpm por 30s, e mantidos em repouso por 30min⁷⁴.

Em uma placa de microtitulação, foi colocado em cada poço, 20µL de solução salina 0,85%, na qual os dentes extraídos ficaram submersos, e foi acrescido 180µL de solução salina 0,85% estéril. Foram realizadas diluições seriadas na ordem de 1/10, com finalidade de diminuir a concentração de UFC/mL, facilitando a contagem final⁷³. Com uma pipeta apropriada, quatro gotas de 10µL por diluição, foram inoculadas em placas de Petri, contendo como meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA). As placas foram feitas em triplicata para cada amostra⁷³.

As placas foram então colocadas em estufa bacteriológica a 37°C, em atmosfera de 5 a 10% de CO₂, através da técnica de chama de vela, para crescimento de microaerófilos totais. A coleta de dados foi realizada 24h após a incubação⁷⁴.

As UFC encontradas na placa de Petri foram multiplicadas pelo fator de diluição e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por *t-test*. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

Este trabalho teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN, parecer no. 28 (anexo 1).

4.6 Análise Microscópica

Após o preparo das amostras para contagem de UFC/mL, os molares extraídos foram colocados em *ependorfs* contendo 0,64g/mL de solução de timol diluído em água destilada, com finalidade bacteriostática⁷⁶.

Com o auxílio de uma placa de cera 7, as amostras foram então fixadas para ser possível a visualização através da microscopia óptica.

Através do microscópio óptico, Quimis Aparelhos Científicos LTDA, Diadema / São Paulo, com aumento de 40X, foram obtidas imagens para avaliação de sinais clínicos de desmineralização.

5. RESULTADOS

5.1 Indução de Cárie *in vivo*:

As figuras 3A,3B e 3C, mostram o aspecto do 2° molar superior do rato, imediatamente após o desmame, antes da inoculação do *Streptococcus mutans*, após 3 dias consecutivos da inoculação do microrganismo e início da dieta cariogênica, e decorridos 13 dias da inoculação e início da dieta, respectivamente. Observe que no primeiro instante (FIG.3A), os sulcos apresentam-se com restos alimentares, mas o esmalte adjacente não apresenta sinais clínicos de desmineralização, enquanto que na FIG.3B e FIG.3C, além dos restos alimentares nos sulcos, é nítido a presença de manchas brancas no esmalte adjacente, indicando sinais clínicos de desmineralização.

As imagens foram obtidas através do microscópio óptico, Quimis Aparelhos Científicos LTDA, Diadema / São Paulo, com aumento de 40X.

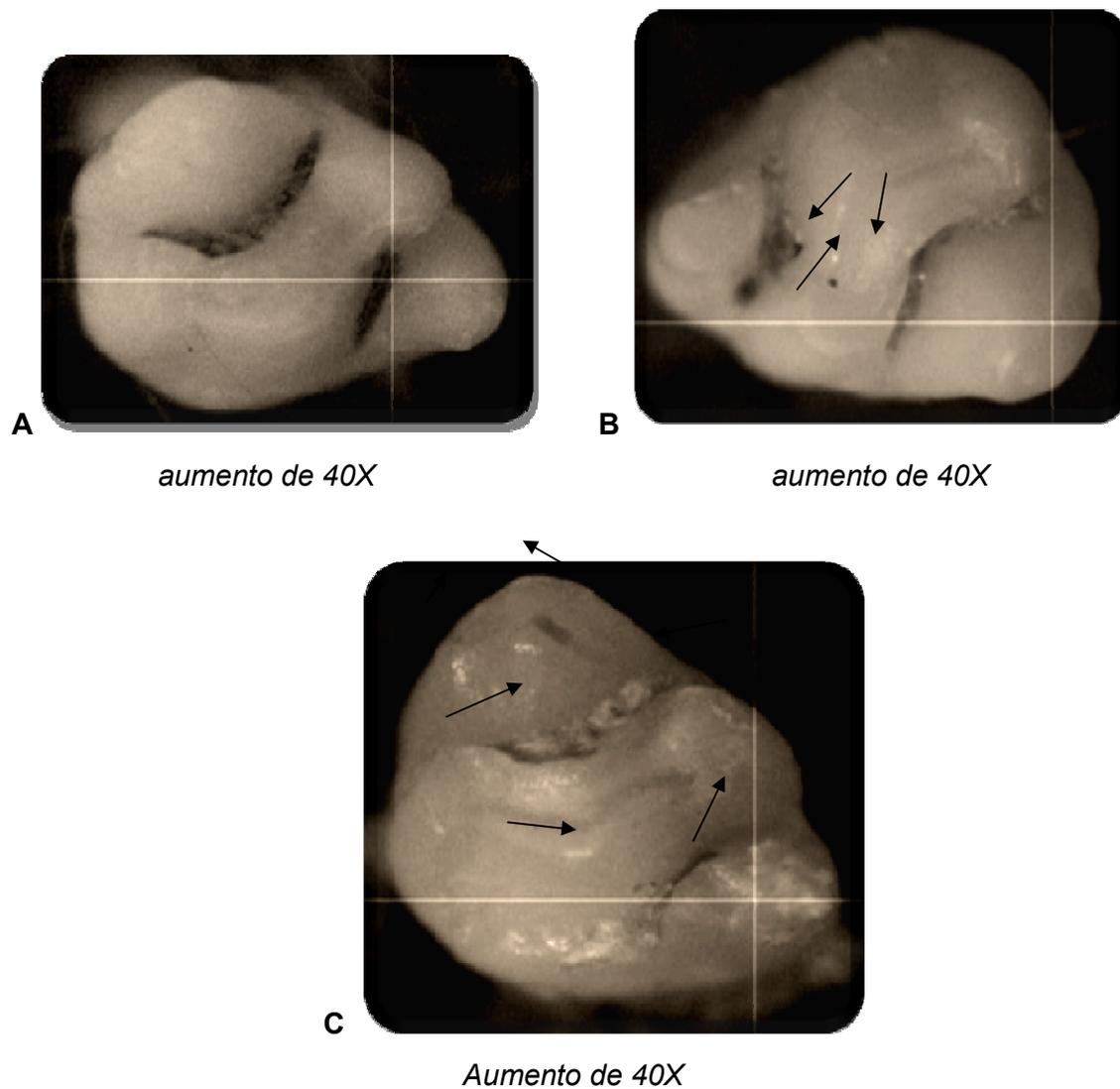


FIGURA 3: As FIG. 3A,2B e 3C, mostram o aspecto do 2° molar superior do rato, imediatamente após o desmame, antes da inoculação do *Streptococcus mutans*, após 3 dias consecutivos da inoculação do microrganismo e início da dieta cariogênica, e decorridos 13 dias da inoculação e início da dieta, respectivamente.

5.2 Análise Microbiológica:

Foi possível observar a redução significativa no número de microaerófilos totais através da terapia fotodinâmica, associando como fotossensibilizador o azul de metileno na concentração de 100 μ M diluído em 200 μ L de água destilada e o LED ($\lambda= 640\text{nm}\pm 30\text{nm}$) nos parâmetros testados, e verificar que esta redução permaneceu estatisticamente significativa durante 10 dias consecutivos após o tratamento, mesmo com a continuidade da dieta cariogênica.

Antes da inoculação de *S. mutans* e do início da dieta cariogênica, os animais já apresentavam em sua microflora natural uma grande quantidade de microaerófilos totais. Feita a inoculação de *S. mutans* por 3 dias consecutivos associada à dieta cariogênica, observou-se que a quantidade de microaerófilos totais manteve-se igual à inicial, porém, como mostra a FIG.4, o aspecto das colônias obtidas após a inoculação indicava grande presença de *S. mutans*, diferentemente do aspecto das colônias obtidas inicialmente.

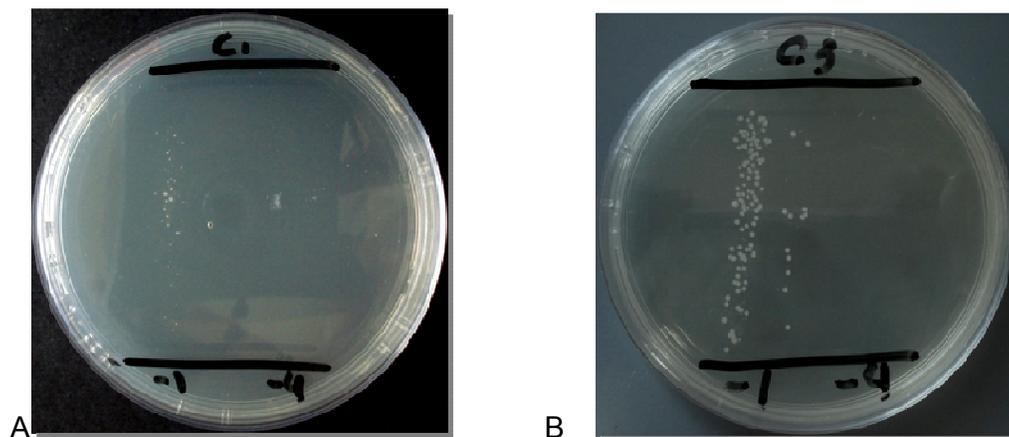


FIG.4 : Aspecto da microflora natural, obtida imediatamente após o desmame (A), comparada após a inoculação de três dias consecutivos de *S. mutans* e início da dieta cariogênica (B).

A FIG.5 mostra os valores médios (em log) recuperados no GC (grupo controle) e no GPDT (grupo terapia fotodinâmica) após tratamento. Observa-se que o GC mantém o número de microrganismos totais igual aos de antes do início do procedimento experimental, durante todo o período analisado. Além disso, em todos os momentos investigados, a viabilidade celular no GPDT é significativamente menor que no GC e mantiveram-se aproximadamente constante até 10 dias pós-tratamento.

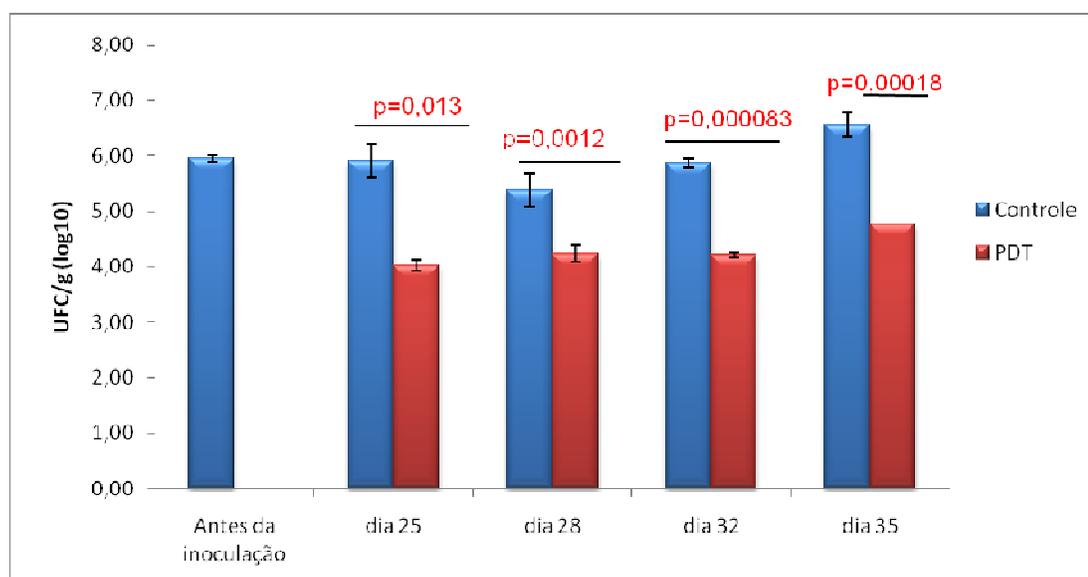


FIG.5: Valores médios \pm desvio padrão da viabilidade de microrganismos aerófilos totais durante todo o período experimental. Três animais foram avaliados em cada momento.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizado um fotossensibilizador que pertence à família das fenotiazinas, o azul de metileno, na concentração de 100µM, diluído em água destilada, cujas bandas de absorção encontram-se entre 610 e 660nm, associado a um diodo emissor de luz (*LED*) com largura de banda entre 610nm e 670nm, potência de 240mW e irradiância de 480mW/cm², por 3 min. Os animais foram submetidos ao protocolo de indução de cárie através da inoculação de *Streptococcus mutans* e dieta cariogênica. Antes da inoculação do *Streptococcus mutans* e do início da dieta cariogênica, os animais já apresentavam em sua microflora natural uma grande quantidade de microaerófilos totais. Para que fosse possível a comparação microbiológica entre dentes sadios e dentes cariados, 2 animais não foram submetidos ao protocolo de indução de cárie. Os resultados obtidos confirmaram a efetividade da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana em microaerófilos totais, nos parâmetros testados neste trabalho. A redução de microaerófilos totais mostrou-se estatisticamente significativa imediatamente após a realização da terapia fotodinâmica e, mesmo com a continuidade da dieta cariogênica e administração da água enriquecida com 10% de sacarose, esta redução manteve-se significativa após 10 dias do tratamento.

O azul de metileno (100µM) associado ao *LED* de emissão vermelha ($\lambda = 640 \pm 30\text{nm}$), apresentou melhor efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana devido a ativação de dímeros e monômeros, promovendo a participação direta de espécies agregadas no processo fotodinâmico⁶⁹.

Diferente de outras doenças infecciosas clássicas causadas por microrganismos patogênicos que contaminam o hospedeiro e a doença se torna fruto da contaminação, a cárie é causada pela microbiota oral residente patogênica que necessita de condições especiais para promover o desenvolvimento da doença. Essa microbiota tem uma função que é benéfica ao hospedeiro. Então, o objetivo deve ser reduzir a microbiota mantendo o seu controle a níveis compatíveis com a saúde oral.

A remoção mecânica da placa por procedimentos eficientes de higiene bucal pode prevenir quase que completamente o aparecimento das lesões de

cárie. Tais medidas são particularmente efetivas quando combinadas com uma redução na quantidade e frequência da ingestão de açúcar⁸. No entanto, é difícil alterar hábitos alimentares já estabelecidos e manter um alto grau de motivação para uma higiene oral efetiva⁵⁰. Portanto, estratégias para o controle ou prevenção de cárie dental são baseadas em reduzir os níveis de biofilme em geral, ou bactérias cariogênicas específicas em particular, por exemplo, por meio de agentes antimicrobianos, que podem ocasionar ruptura da ecologia da microflora oral por meio de perturbação do equilíbrio entre microrganismos residentes e levar a resistência bacteriana⁵⁷, e potencializar a remineralização e fortalecer a resistência do esmalte ao ataque ácido através da utilização de flúor.

A terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, tanto sua ação sobre diferentes bactérias, como sua ação antifúngica, principalmente em casos de infecções localizadas de pouca profundidade e de microflora conhecida, como as de ocorrência mais frequentes na cavidade oral^{1,10-18}. Uma boa indicação na odontologia é a resistência bacteriana pouco provável.

Os primeiros estudos da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana em bactérias cariogênicas mostraram grande eficiência desta técnica, quando realizada em microrganismos em suspensão^{10,11,13,15,16,18,30}. Entretanto, os microrganismos da placa dentária são organizados em um biofilme, o que consiste em um agregado de microrganismos embebidos em uma matriz complexa de biopolímeros. A importância desse fato é que os microrganismos organizados em um biofilme são muito menos susceptíveis à ação da terapia fotodinâmica ou de qualquer outro agente antimicrobiano.

Em estudos mais recentes, comprovou-se a eficiência da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana na eliminação de microrganismos na presença de biofilme em uma matriz de colágeno e de dentina cariada^{9,26,76,63,64,75}. Em 2004, Williams *et al*⁷⁵ utilizou um *laser* de diodo de $\lambda = 633 \pm 2 \text{nm}$, com energia variando entre 1,8 e 14,4J, associado ao azul de toluidina (TBO) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, e obteve redução de *Streptococcus mutans* em matriz de colágeno e dentina humana cariada, embora na dentina a redução microbiana tenha sido mais efetiva do que em matriz de colágeno. Outro estudo realizado em 2008, por Giusti *et al*⁶³., confirmou estes mesmos dados obtidos anteriormente,

pois o sucesso da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana depende da difusão do fotossensibilizador através da dentina e da penetração e espalhamento da luz no tecido, portanto, concluíram que o tempo de contato do microrganismo e do fotossensibilizador pode ser um fator crítico.

Nos primeiros estudos da terapia fotodinâmica, a entrega de luz utilizada na ativação do fotossensibilizador foram com os sistemas *lasers*, principalmente os *lasers de diodo* e de HeNe^{10-16,18,23,26,30,65,75}. Em 2005, Zanin *et al*⁹. avaliou o efeito antimicrobiano do azul de toluidina (TBO) associado ao *laser* de HeNe e ao *LED* na viabilidade de *Streptococcus mutans* organizados em biofilme. A redução de 99,9% dos microrganismos foi conseguida tanto na associação do *laser* de HeNe, quanto do *LED*. Outros estudos também demonstraram a eficiência do *LED*^{27-29,63} na terapia fotodinâmica. A principal vantagem do uso do *LED* é o custo reduzido em relação às fontes *laser*, o que torna a técnica mais acessível.

Na terapia fotodinâmica é importante a presença de um fotossensibilizador ressonante com a fonte de luz, promovendo absorção do comprimento de onda emitido, resultando em reações fotoquímicas, garantindo o sucesso da terapia antimicrobiana⁶⁸. Muitos estudos tem demonstrado a efetividade dos derivados das fenotiazinas como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica em microrganismos cariogênicos^{9,10,11,13,26,63,75}.

Os resultados deste estudo sugerem que a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa promissora na redução de microrganismos cariogênicos, como método de controle e tratamento da cárie dentária, já que um dos grandes problemas atuais dos agentes químicos tem sido a ruptura da ecologia da microflora oral por meio de perturbação do equilíbrio entre microrganismos residentes, o que pode levar a um super crescimento de espécies potencialmente mais patogênicas, ou o desenvolvimento de resistência bacteriana⁵⁷. Entretanto, mais estudos devem ser realizados antes de tornar a terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana aplicável na clínica diária.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Através da metodologia empregada neste estudo foi possível estabelecer um modelo de indução de cárie *in vivo*;
- O azul de metileno na concentração de 100µM associado ao *LED* de emissão vermelha, nos parâmetros utilizados neste estudo, é capaz de reduzir significativamente a quantidade de microaerófilos totais *in vivo* e manter este número por 10 dias após tratamento.



Parecer - Projeto Nº 28/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA DOENÇA CÁRIE: ESTUDO IN VIVO”** de responsabilidade do pesquisador **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 09 de outubro de 2008



Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcez, A.S.; Souza, F.R.; Núñez, S.C.; Kather, J.M.; Ribeiro, M.S. Terapia fotodinâmica em odontologia – Laser de Baixa Potência para redução bacteriana. Rev. da Associação Paulista de Cirurgiões Dentista, v.57, n.3, p. 223-26, 2003.
2. Marcotte, H.; Lavoie, M.C.. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiol Mol Biol Rev, Washington, v.62, n.1, p.71-109, Mar 1998.
3. Porto, Celso Luiz De Angelis; Pereira, José Carlos; Netto, Camillo Anauate e Colaboradores. Cariologia. Artes Médicas / Divisão Odontológica, cap.1, Cárie Dental – Conceitos e teorias, p.1-14, 2008.
4. Porto, Celso Luiz De Angelis; Pereira, José Carlos; Netto, Camillo Anauate e Colaboradores. Cariologia. Artes Médicas / Divisão Odontológica, cap.2, Conceitos Preventivos Da Doença Cárie, p.15-66, 2008.
5. Loeshe et al., Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. Infect Immun, v. 46, p.765-72, 1984.
6. Hamada, S.; Slade, H.D. Biology, Immunology and Cariogenicity *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev, v.44, n.2, p. 331-84, June 1980.
7. Nyad, B. Microbial colonization of human tooth surfaces. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl, v. 32, n.1, p.1-45, 1993.
8. Grahnén, H., Bonow, B.E., Krasse, B. The Vipeholm dental caries study: the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for Five years. Acta Odontol Scand, v.11, p. 332-364, 1954.
9. Zanin, I.C.J.; Gonçalves, R.B.; Jr, A.B.; Hope, C.K.; Pratten, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 56, p. 324-330, 2005.
10. Dobson, J.; Wilson, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. Arch Oral Biol, Oxford, v. 37, n. 11, p. 883-887, Nov. 1992.
11. Okamoto, H.; Iwase, T.; Morioka, T. Dye – mediated bactericidal effect of He – Ne laser irradiation on oral microorganisms. Lasers Surg Med., New York, v.12, n.4, p. 450-458, 1992.

12. Spratt, D.A.; Pratten, J.; Wilson, M.; Gulabivala, K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int End J.*, v. 34, n. 4, p. 300-07, Jun. 2001.
13. Williams, J.A.; Pearson, G.J.; Colles, M.J.; 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.*, Basel, v. 37, n.3, p. 190-93, May/June 2003.
14. Wilson, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem, Photobiol Sci.*, n.3, p. 412-18, 2004.
15. Wilson, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol*, Oxford, v. 75, n.4, p. 299-306, Oct. 1993.
16. Wilson, M.; Burns T.; Pratten, J.; Pearson, G.J. Bacteria in supra gingival plaque samples can be killed by low – power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacterio.*, Oxford, v.78, n.5, p. 569-574, may 1995.
17. Konopka, K. *et al.* Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal Dent Res*, v. 86(8), p.694-707, 2007.
18. Burns, T.; Wilson, M.; Pearson, G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium- neon laser. *J Med Microbiol*, Edinburgh, v. 38, n.6, p. 401-405, June 1993.
19. Bhatti, M., *et al.* effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Photochem Photobiol*, Lawrence, v. 65, n. 6, p. 1026-31, Mar. 1997.
20. MacRobert, A.J.; Bown, S.G.; Phillips, D. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*. Chichester: Wiley, p. 4-16, 1989.
21. Malik, Z. *et al.* Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*, Lausanne, v. 5, n. 3 – 4, p. 281-93, May 1990.
22. Spikes, J.D.; Jori, G. Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Lasers Med Sci*, Sidcup Kent, v. 2, p. 3-15, 1987.
23. Wilson, M.; Dobson, J.; Harvey, W. Sensitization of *Streptococcus sanguinis* to killing by low – power laser light. *Lasers Med Sci*, Sidcup Kent, v. 8, p. 69-73, 1993.
24. Ackroyd, R. *et al.* The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v.74(5), p.656-669, 2001.

25. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.42, p. 13-28, 1998.
26. Usacheva, M.N. *et al.* Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.29, p.165-173, 2001.
27. Giusti, J.S.M.; Santos-Pinto, L.; Pizzolitto, A.C.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S. Effectiveness of Photogem® activated by LED on the decontamination of artificial carious bovine dentin. *Lasers Physics*, v. 16, n. 5, p. 859-864, 2006.
28. Tsai, J.C.; Chiang, C.P.; Chen, H.M.; Huang, S.B.; Wang, C.W.; Lee, M.I.; Hsu, Y.C.; Chen, C.T.; Tsai, T. Photodynamic therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med.*, New York, v.34, n.1, p. 18-24, 2004.
29. Lui, H.; Hoobs, L.; Tope, W.D.; Lee, P.K.; Elmets, C.; Provost, N.; Chan, A.; Heyndorff, H.; See, X.Y.; Jain, H.; Hamzavi, I.; McLean, D.; Bissonnette, R. Photodynamic therapy of multiple non-melanoma skin cancers with verteporfin and light-emitting diodes. *Arch Dermatol.*, Chicago, v. 140, n.1, p. 26-32, Jan 2004.
30. Wilson, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J*, London, v.44, n.2, p. 181-189, Apr. 1994.
31. Gustafson *et al.*, The Vipeholm dental caries study, the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand.*, v. 11 (3-4), p. 232-64, Sep. 1954.
32. Orland, F.J. *et al.* Use of the germ-free animal technique in the study of experimental dental caries. *J Dent Res*, v.33, n.2, p.147-174, Apr/1954.
33. Keyes, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*, v.1, p.304-320, 1960.
34. Von der Fehr, R.F.R.; Loe H.; Theilade E. Experimental caries in man. *Caries Res*, v. 4(2), p.131-48, 1970.
35. Fejerskov e Kidd, *Cárie Dentária - A Doença e seu Tratamento Clínico*, Editora Santos, cap.1, *Cariologia Clínica e a Dentística Operatória no Século XXI*, p.1-6, 2007.
36. Miller, W.D. *The micro-organisms of the human mouth*. Philadelphia, PA, 1890. (Republished Basel: S. Karger, 1973).
37. Cárie dentária – Wikipédia, a enciclopédia livre
http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1rie_dent%C3%A1ria#cite_note-10,
Acesso em: 22/04/2009

38. Newbrum, E. Cariology. 2ª Ed. Williams na Wilkins, Baltimore, 1978.
39. Lamosa *et al.* Prevenção em Dentística. In: Dentística: Filosofia, Conceitos e Prática Clínica (GBPD), p.39-64, São Paulo, 2005.
40. Guedes Pinto, AC. Odontopediatria. 6ª edição, São Paulo: Santos, cap. 27, p.449-74, 2000.
41. Marsh, PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, v. 8 , p.263-271, 1994.
42. Marsh, PD. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: Kuramitsu HK, Ellen RP, eds. *Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Wymondham: Horizon Scientific Press, 111-65, 2000
43. Fejerskov e Kidd, Cárie Dentária - A Doença e seu Tratamento Clínico, Editora Santos, p.29, 2007.
44. Marsh, P; Martin, MV. Microbiologia Oral. Editora Santos, São Paulo, cap. 2, A boca como habitat microbiano, p.5-16, 2005.
45. Müller, F. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Contra Bactérias Gram-Positivas: Estudo Comparativo Entre Fotossensibilizantes. Tese (Mestrado) – 2006 - Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.
46. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* , v.15, p.169-75, 1995.
47. Zampieri *et al.* Photodynamic therapy in bacterias *St. mitis St. sanguis* "in vitro". *Rev Bras. Implant*, p. 16-17, Abr- Jun/2003.
48. Levine, MJ, Tabak LA, Readdy M, Mandel ID. Nature of salivary pellicles in microbial adherence: role of salivary mucins. In: Mergenhagen SE, Rosan B, Eds. *Molecular basis of oral microbial adhesion*. Washington, DC: American Society of Microbiology, p.125-30, 1985.
49. Alaluusua, S; Renkonen, OV. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scand J Dent Res*, v. 91(6), p. 453-7, Dec, 1983.
50. Houte, J van. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* , v. 73, p. 672-81, 1994.
51. Marsh, P, Martin MV. Microbiologia oral. Editora Santos, cap.3, A Microflora Oral Residente, p.17-33, 2005.
52. Loeshe, WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human decay. *Microbiol Res*, v. 50, p.353-380, 1986.

53. Müller *et al.*, Effects of low power red laser on induced-dental caries in rates. Archives Of Oral Biology, v.52, p. 648-54, 2007.
54. Bowen,WH, Lawrence,RA, Comparison of the Cariogenicity of Cola, Honey, Cow Milk, Human Milk, and Sucrose. Pediatrics ,v.116, p.921-926, 2005.
55. Loeshe,WJ. Dental decay and periodontal disease as specific bacterial infections. In: 20 Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo- Odontopediatria e Prevenção, v.4,cap.13, Editora Artes Médicas- Divisão Odontológica, 2002.
56. Loeshe, WJ. Modelo animal de cárie dentária. In: Cárie Dental – uma infecção tratável. Cultura Médica, Rio de Janeiro, Brasil, p.82-102, 1993.
57. Marsh,P; Martin, MV. Microbiologia Oral. Editora Santos, São Paulo, cap. 6,Cárie dental, p.82-103, 2005.
58. Zhu,H; Willcox,Md ; Green, RM & Knox, KW. (1997) In: Pekkala, E. Sucrose load, calcium-deficiency and dental caries on molars of growing rats. Tese de mestrado, Universidade de Oulu, Finlândia, 2003.
59. Goldman, MP.,Terapia Fotodinâmica, Série Procedimentos em Dermatologia Cosmética, Saunders / Elsevier, cap.1, Mecanismo de Ação do Ácido Aminolevulínico Tópico, p. 1-12, 2007.
60. Prates *et al.*,J Photoch Photobiol B., Bactericidal effect of malachite green and red laser on Actinobacillus actinomycetemcomitans. v. 86, p. 70-76, 2007.
61. Demidova *et al.*,Int J. Immunol Pharmacol, Photodynamic therapy targeted to pathogens. v. 17, p. 245-254, 2004.
62. Tedesco,AC. Processos Fotodinâmicos: "A Luz" de uma nova terapia aplicada à saúde humana. Jornal Brasileiro de Laser, v. 1, n.4, p. 32-41, Out/2007.
63. Giusti *et al.*, Antimicrobial Photodynamic Action on Dentin Using a Light-Emitting Diode Light Source, Photomedicine and Laser Surgery, v. 26, n. 4, p. 279-285, 2008.
64. Burns,T; Wilson,M; Pearson,GJ. Caries Res., v.29, p.192, 1995.
65. 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., v. 31, n.2, p. 86-90, 2002.
66. Zanin *et al.*, Aplicação da Terapia Fotodinâmica na Descontaminação Bacteriana, Revista da Associação Paulista de Cirurgião Dentista, v. 56 supl, p. 7-11, Junho / 2002.

67. Ushoa *et al.*, Terapia Fotodinâmica: Mecanismos e Perspectivas de Desenvolvimento de Novos Fotossensibilizadores. *Jornal Brasileiro de Laser*, v.1, n.4, p. 10-22, Out/2007.
68. Chan, Y and Lai, Ch., Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, v.18(1), p. 51-55, 2003.
69. NÚÑEZ, S.C. Efeito da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. Tese (Doutorado), 2007 – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
70. Savino, F. *et al.*, Methemoglobinemia caused by the ingestion of cougette soup given in order to resolve constipation in two formula-fed infants. *Ann. Nutr. Metab.*, v.50, p. 368-371, 2006.
71. Betten, DP, *et al.*, Antidote use in the critically ill poisoned patient. *J Intensive Care Med.*, v. 21, p. 255-277, 2006.
72. Golshan, M. and Nakhli, F., Can methylene blue only be used in sentinel lymph node biopsy for breast cancer? *Breast J.*, v. 12, p. 428-430, 2006.
73. Prates, Renato Araujo ; Silva, Eriques Gonçalves da ; Yamada Júnior, Aécio Massayoshi ; Suzuki, Luis Cláudio ; Paula, Claudete R. ; Ribeiro, Martha Simões . The Irradiation Parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. *Progress in Biomedical Optics and Imaging*, v. 9, p. 684606-1-684606-6, 2008.
74. Kairalla, Eleni Cristina. Estudo da redução microbiana intra canal utilizando *laser* de baixa potência associado a fotossensibilizador e *laser* de alta potência. Tese (Mestrado), 2006 – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2006.
75. Williams, J.A.; Pearson, G.J.; Colles, M.J. and Wilson, M. The photo – activated Antibacterial Action of Toluidine Blue in a Collagen Matrix and in Carious Dentine. *Caries Res.*, v.38, p. 530-536, 2004.
76. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol*, v. 20, p.221–225, 2005.

