

Giovani Lana Peixoto de Miranda

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS IN VITRO

Monografia apresentada ao Colegiado de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Especialista em Dentística.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Valente Araújo
Jacques Gonçalves

Belo Horizonte

2011

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE STREPTOCOCCUS
MUTANS IN VITRO

M672a Miranda, Giovani Lana Peixoto de
2011 Atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre streptococcus
MP mutans / Giovani Lana Peixoto de Miranda. 2011.
28 f.: il.
Orientadora: Patrícia Valente Araújo Jacques Gonçalves
Monografia (Especialização)- Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Odontologia.
1. Fotoquimioterapia. 2. Streptococcus mutans. I. Gonçalves, Patrícia
Valente Araújo Jacques. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D2

“O que a mente (...) pode conceber ela pode conseguir.”

W. Clement Stone

Aos meus pais, **Maria das Dores** e **Rui**, pelo apoio, confiança e amor.

À minha irmã **Margareth**, por acreditar e incentivar a vencer novos desafios.

Aos meus irmãos, e minha irmã **Renata** que mesmo distantes sempre me apoiando.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Prof. Dra. Patrícia Valente Araújo Jacques Gonçalves**, minha orientadora, que com muita paciência me ajudou a galgar este caminho, um carinho especial por sua atenção e colaboração, e espero contar sempre para trilharmos novos conhecimentos;

Ao **Prof. Dr. Luiz Thadeu de Abreu Poletto**, pelas orientações, experiência, confiança, incentivo. Com quem espero aprender muito mais e por tê-lo como amigo;

AGRADECIMENTOS

Aos **Professores do Departamento de Odontologia Restauradora**, em especial aos Profs. Lincoln e Rodrigo;

Ao **Prof. Dr. André Gustavo Pereira de Andrade**, pela atenção, interesse e tempo dedicados;

Ao **Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos**, pela atenção, ajuda, compreensão e por permitir o uso do Laboratório de Microbiologia da FO-UFMG;

À **Profa. Carolina Nemésio**, pela ajuda e atenção;

Aos **colegas de curso de Especialização**, pela ajuda companheirismo, e vivência;

À **Margarida**, funcionária da clinica de Especialização, pelo carinho e estar sempre disposta a ajudar;

À **Gió**, funcionária do Departamento de Odontologia Restauradora, pelo carinho, disponibilidade e incentivo.

À **Silvana** , funcionária do Laboratório de Microbiologia, pela paciência e colaboração constante;

Ao **Bruno**, funcionário do Laboratório de Odontologia Resaturadora, sempre disposto a ajudar;

À **Beth**, funcionária do Colegiado de Pós-Graduação, pela colaboração e apoio;

Ao **Colegiado de Pós-Graduação**, pelo apoio e incentivo.

À **Deus**, pela saúde, força, disposição e enfrentar e vencer mais um desafio.

À todos que sempre estiveram por perto acreditando, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

1 . INTRODUÇÃO.....	2
2 . OBJETIVOS.....	5
3 . REVISÃO.....	6
3.1 Terapia Fotodinâmica.....	6
3.1.1 Mecanismo de Ação.....	9
3.2 Patógenos Cariogênicos.....	11
3.3 Agentes Fotossensibilizantes.....	13
3.4 Fontes de Luz.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	16
4.2 Cultura bacteriana.....	16
4.3 Aplicação da Terapia fotodinâmica.....	16
4.4 Análise Estatística.....	17
5. RESULTADOS.....	18
6. DISCUSSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	23

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) se baseia na utilização de uma fonte de luz em combinação com agentes fotossensibilizantes, os quais iniciam uma reação fotoquímica que leva à destruição celular. Uma vez que a literatura tem demonstrado o potencial da PDT em promover a morte bacteriana, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo pré-irradiação e tempo de exposição no efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica (PDT) sobre suspensões de *S. mutans in vitro* (ATCC 25175). MATERIAL E MÉTODOS: Foram avaliados nove grupos, com três amostras cada (n=3). O grupo 1 continha 1 ml da suspensão padronizada (inóculo) e não recebeu nenhum tratamento, sendo utilizado como controle. Nos grupos 2 e 3 a atividade do corante e da fonte de luz foram testadas isoladamente. A toxicidade do azul de metileno foi avaliada deixando o G2 com 0.75ml de inóculo e 0,25 de azul de metileno sem ação da luz halógena. Para avaliar a toxicidade de luz, por si só, sem o corante, 1ml da suspensão padronizada foi irradiada pela luz halógena por 1min (G3). Nos outros seis grupos, as suspensões bacterianas foram submetidas à terapia fotodinâmica, associando-se o azul de metileno a 25mg/L a uma fonte de luz halógena. O tempo pré-irradiação é o período no qual o corante é deixado em contato com o substrato previamente à aplicação da luz. Para os grupos 4, 5 e 6 o tempo pré-irradiação foi de cinco minutos e o tempo de exposição variou de 1min para o G4, 30s para o G5 e 20s para o G6. Os mesmos tempos de exposição foram utilizados respectivamente para os grupos 7, 8 e 9, porém, com um tempo pré-irradiação de três minutos. Diluições seriadas até 10^3 UFC foram realizadas e alíquotas de 20 μ l foram plaqueadas em triplicata em Agar *mitis salivarius*. A contagem das UFC foi obtida visualmente após incubação em uma atmosfera de microaerofilia a 37°C por 48 horas. RESULTADOS: Os resultados demonstraram que os grupos 2 e 3 não apresentaram redução bacteriana significativa em relação ao grupo controle. Nos grupos onde foi realizada a PDT, a redução do tempo pré-irradiação e exposição provocaram uma redução no efeito antimicrobiano. Os grupos 4 e 5 apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando se utilizou um tempo de exposição de 60s e 40s e tempo pré-irradiação de 5 min. Os demais grupos 6,7,8 e 9, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao efeito antimicrobiano da PDT. Para estes grupos, a redução do tempo de exposição não afetou os resultados significativamente. CONCLUSÃO: A PDT nas condições utilizadas no experimento apresentou potencial antimicrobiano, o qual foi afetado tanto pela variação do tempo pré-irradiação quanto pelo tempo de exposição.

Palavras chave: terapia fotodinâmica, *Streptococcus mutans*, azul de metileno

SUMMARY

Photodynamic therapy (PDT) is based on the use of a light source in combination with photosensitizing agents, which initiate a photochemical reaction that leads to cell destruction. Since the literature has demonstrated the potential of PDT to promote bacterial killing, the purpose of this study was to evaluate the influence of the pre-irradiation and exposure time in the antimicrobial effect of photodynamic therapy (PDT) on suspensions of *S. mutans* in vitro (ATCC 25175). MATERIALS AND METHODS: Nine groups were evaluated, with three samples each ($n = 3$). Group 1 contained 1 ml of standardized suspension (inoculum) and received no treatment, being used as a control. In groups 2 and 3 the activity of the dye and the light source were tested separately. The toxicity of methylene blue was assessed with the G2 leaving 0.75ml inoculum and 0.25 methylene blue without action of the halogen light. To evaluate the toxicity of light alone without dye, 1 ml of standardized suspension was irradiated by halogen light for 1 min (G3). In the other six groups, the bacterial suspensions were subjected to photodynamic therapy, in association with methylene blue to 25 mg / L to a halogen light source. The pre-irradiation time is the period in which the dye is left in contact with the substrate prior to application of light. For groups 4, 5 and 6 pre-irradiation time was five minutes and the exposure time ranged from 1 min for G4, G5 and 30s to the 20s for the G6. The same exposure times were used respectively for the groups 7, 8 and 9, but with a pre-irradiation time of three minutes. Serial dilutions were performed up to 10^3 CFU, and 20 μ l aliquots were plated in triplicate on mitis salivarius agar. The count of CFU was obtained visually after incubation in a microaerophilic atmosphere at 37 ° C for 48 hours. RESULTS: The results showed that groups 2 and 3 showed no significant bacterial reduction in the control group. In groups where PDT was performed, reducing the time pre-irradiation and exposure caused a reduction in the antimicrobial effect. Groups 4 and 5 showed statistically significant results, when using an exposure time of 60s and 40s and pre-irradiation time of 5 min. The other groups 6, 7, 8 and 9, showed no statistically significant differences in relation to the antimicrobial effect of PDT. For these groups, reducing the exposure time did not affect the results significantly. CONCLUSION: PDT under the conditions used in the experiment presented antimicrobial potential, which was affected by the time variation of the pre-irradiation and exposure time.

Keywords: photodynamic therapy, *Streptococcus mutans*, methylene blue

1 . Introdução

A cárie dental é considerada como uma doença infecciosa que causa a destruição localizada dos tecidos dentais duros (THILSTRUP e FERJERSKOV, 1988). Ela é influenciada pelo fator tempo e é descrita como um processo dependente da interação entre microbiota específica, carboidratos e uma superfície dentária susceptível. A presença de bactérias é crucial para o início e progressão da doença cárie, devido à formação de um biofilme microbiano, a placa dental. Os microorganismos crescem nesse biofilme aderido a uma superfície sólida, o dente, onde se formam microcolônias em uma matriz extracelular polimérica, que inclui água e canais nutrientes (COSTERTON ET AL,1999).

O tratamento convencional da cárie dental consiste na redução bacteriana por remoção mecânica do tecido contaminado e/ou a administração local de agentes antimicrobianos (GARECZ ET AL, 2003).

Existem evidências substanciais que não é necessária a remoção de todos os vestígios de uma dentina infectada, próximo a polpa, para a paralização da doença cárie (THOMPSON ET AL,2008). KIDD *et al.* (1996) propuseram que apenas a remoção da dentina úmida e macia é necessária para o sucesso do tratamento, assim como o selamento efetivo da cavidade é suficiente para manter a bactéria residual em um estado dormente.

Em teoria, a cárie dentária poderia ser prevenida eliminando-se bactérias cariogênicas, especialmente *Streptococcus mutans*, da boca, bem como pelo aumento da resistência dos dentes e modificação da dieta. Outras bactérias encontradas em lesões de cáries progressivamente ativas são consideradas invasores secundários, provavelmente formando simbiose com *S.mutans* em relação às suas atividades fisiológicas. (HAMADA e SLADE, 1980).

Existem alguns agentes antimicrobianos que são utilizados, como a clorexidina e o hipoclorito, mas permitem que alguns microorganismos desenvolvam resistência à eles (MULLER, 2007). Atualmente, a terapia fotodinâmica (PDT) tem sido sugerida como uma alternativa aos agentes antimicrobianos para eliminar bactérias bucais, e auxiliar no tratamento das doenças orais (WILSON,1999). De acordo com Hope e Wilson (2006), uma das vantagens da PDT em relação à antibioticoterapia convencional é que o efeito antimicrobiano fica confinado apenas às áreas cobertas pelo corante e irradiadas pela luz. Além disso, de acordo com Wainwright (1998) a resistência bacteriana à PDT é improvável, pois o oxigênio singlete e os radicais livres formados interagem com várias estruturas celulares bacterianas e possuem diferentes caminhos metabólicos. As bactérias podem ser sensibilizadas pela luz através de um tratamento prévio com um produto químico, o agente fotossensibilizador.

A terapia fotodinâmica, do inglês *photodynamic therapy* (PDT), é um tratamento que engloba a ação simultânea de uma fonte de luz e de um agente fotossensibilizante (PS), na presença do oxigênio dos tecidos. Individualmente, cada uma destas substâncias é inócua e quando interagem são capazes de originar espécies citotóxicas que levam à morte celular (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007).

Segundo Wilson (2004), várias espécies de bactérias orais, na presença de um agente fotossensibilizante adequado, são eliminadas após a irradiação de uma luz de baixa potência. As espécies sensíveis incluem as formadoras de placa e espécies cariogênicas: *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus*. Muitos estudos têm demonstrado a efetividade da PDT em grande número de bactérias bucais, utilizando uma grande variedade de agentes fotossensibilizadores e diferentes tipos de luz com seus respectivos comprimentos de onda (LIMA et al 2009). Os tempos pré-irradiação e tempo de exposição à luz também têm apresentado muita diversidade entre os estudos. O tempo pré-irradiação é definido como o tempo que a foto-agente está em contato com o substrato, antes da exposição à luz. De acordo com BEVILLACQUA (2007), o tempo pré-irradiação é importante para ajudar a conseguir um efeito antibacteriano expressivo da PDT.

O trabalho de Araujo e cols. (2009) descreve um protocolo clínico de aplicação da PDT em pacientes portadores de molares com lesões cariosas oclusais que já acometem a dentina, e neste estudo, o agente fotossensibilizante azul de metileno a 25mg/L, associado a uma fonte de luz halógena, mostrou-se capaz de reduzir o número de microorganismos viáveis presentes em uma lesão de cárie *in vivo*. O tempo pré-irradiação preconizado foi de cinco minutos e o tempo de exposição à luz foi de um minuto.

Diante disso, o objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a efetividade antimicrobiana da PDT sobre uma suspensão de *S. mutans*, utilizando uma fonte de luz halógena em associação com o azul de metileno, variando-se o tempo de pré-irradiação e o tempo de exposição à luz, a fim de verificar se é possível reduzir o tempo operatório da terapia.

2. Objetivos:

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a efetividade antimicrobiana da PDT sobre uma suspensão de *S. mutans*, utilizando uma fonte de luz halógena em associação com o azul de metileno, variando-se o tempo de pré-irradiação e o tempo de exposição à luz, a fim de verificar se é possível reduzir o tempo operatório da terapia.

3. Revisão

3.1 Terapia fotodinâmica

O termo PDT, também é conhecido como terapia de foto radiação, foto-terapia ou foto-químio-terapia, vem sendo usado desde meados de 1900, quando Raab realizou uma interação entre o corante acridina e uma luz visível na presença de oxigênio para eliminação de paramécios. A PDT foi introduzida na medicina em 1904, por Von Tappeiner e Jodlbaner, que a descreveram como sendo uma reação química oxigênio-dependente, que sobre a ação da luz causa a inativação de células, microorganismos ou moléculas (MAILK et al., 2010). Em 1913, um físico alemão foi o pioneiro no estudo da terapia de foto radiação com porfirinas. Em 1999, a PDT foi aprovada pela FDA (Food and Drugs Administration) para o tratamento de lesões iniciais de câncer de pele e vem emergindo nos últimos anos como uma modalidade terapêutica para o tratamento de várias infecções por bactérias, fungos e vírus (JORI et al., 2006).

Segundo O'riordan, Akilov e Hasan (2005) nos últimos trinta anos a PDT foi utilizada no tratamento de diferentes tumores e degeneração macular, e recentemente tem havido um crescente interesse no emprego da PDT para infecções orais.

O uso da PDT na pesquisa odontológica tem recebido considerável investigação. Várias metodologias usando substratos como suspensões bacterianas, amostras de placa dental de humanos, matriz de colágeno que se assemelham a uma dentina desmineralizada ou dentes cariados extraídos, têm sido utilizadas para demonstrar o efeito bactericida da PDT em bactérias cariogênicas (O'RIORDAN et al., 2005).

Wilson et al (1995) encontraram uma resposta de 97% de morte bacteriana com laser helium/neon associado ao azul de toluidina, comprovando os resultados encontrados em estudos anteriores que demonstraram uma redução de 99% de *S.mutans* em biofilmes.

Em outro estudo, Williams et al(2004), mostraram a susceptibilidade do *S.mutans* ao PDT , trabalhando com uma suspensão bacteriana exposta por 60s ao laser vermelho combinado com TBO, atingindo uma redução microbiana de 81%.

Wood *et al* (2006) avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica mediada pelo PS eritrosina em biofilmes de *Streptococcus mutans* gerados *in vitro*. A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada de filamento de tungstênio e o tempo de iluminação foi de 15 min. Além da eritrosina, outros corantes como o fotofrin e o azul de toluidina também foram testados e concluiu-se que a eritrosina mostrou-se mais efetiva que os outros dois fotossensibilizantes em promover a morte de *S. mutans*, o que revela o excelente potencial da terapia fotodinâmica mediada pela eritrosina no tratamento da placa dental.

Zanin et al(2006), também mostraram a eficácia da PDT sobre o *S.mutans* com uso de TBO e LED, onde encontraram uma redução nos biofilmes de *S.mutans* e *S.sobrinus* de ~95% e de 99,9% nos biofilmes de *S.sanguis*.

Metcalf *et al* (2006) avaliaram o efeito do fracionamento da dose de luz e redução de tempos de aplicação na morte de *S. mutans*, irradiados por uma lâmpada de filamento de tungstênio associada ao corante eritrosina (22 μ M). A fonte de luz possuía uma potência de 400W e foi posicionada a 30cm da amostra, com um dissipador de calor entre eles. A intensidade de luz média foi de 22,7mW/cm² e a faixa de comprimento de onda era 500-550nm. Após 15 min de período pré-irradiação no escuro, os biofilmes de *S. mutans* foram expostos a 0, 1, 2, 5, 10, 15 ou 30min contínuos ou fracionados em períodos de 5x1min ou 10x30s. Entre os pulsos de luz as amostras eram deixadas no escuro por 5min (pulso de 1min) ou 2min (pulso de 30s). O número de células viáveis foi contado após diluição seriada e plaqueamento em triplicata. Observou-se aproximadamente 98% de morte celular após 5min. O fracionamento da luz aumentou a eficácia da PDT e os dois grupos de luz fracionada obtiveram resultado superior ao grupo de 30min contínuo.

Muller et al(2007) em um estudo em esmalte bovino observou que houve menos de 1 log₁₀ de destruição bacteriana do biofilme após sensibilização com azul de metileno

seguida de exposição à luz vermelha com 665nm. Essa destruição parcial das bactérias após a pré-irradiação com azul de metileno e exposição à luz foi atribuída à baixa penetração do fotossensibilizador.

Em uma revisão sistemática realizada por ARAUJO e cols.(2010), para identificar estudos sobre o efeito antimicrobiano da PDT in vitro, 19 estudos foram avaliados e comprovaram o efeito bactericida da PDT sobre patógenos cariogênicos in vitro. Não foi possível realizar uma comparação entre os estudos devido à heterogeneidade dos agentes fotossensibilizadores, fonte de luz, tempo pré-irradiação e tempo de exposição. Portanto, segundo os autores, não existe um protocolo definido de uso da PDT, devido à heterogeneidade nos parâmetros de tratamento.

ARAUJO e cols.(2009), mostraram, em um estudo in vitro, um melhor desempenho do azul de metileno (73% de redução) em relação ao azul de toluidina (70%) quando estes fotossensibilizantes foram associados a um laser vermelho (660nm) e utilizados sobre suspensões bacterianas de *S. mutans*. Porém, quando estes corantes foram associados a uma luz halógena, a redução bacteriana foi de 99,5% para o azul de metileno e de 81,3% para o azul de toluidina. Em função de seu melhor desempenho, o azul de metileno foi o agente fotossensibilizante selecionado para os trabalhos in vivo posteriormente realizados.

Os mesmos autores (ARAUJO e cols, 2009) realizaram um estudo in vivo associando o azul de metileno a um laser vermelho e não encontraram resultados satisfatórios quando a terapia fotodinâmica foi aplicada em lesões cáries ativas em dentina na face oclusal de molares de crianças de três a nove anos. O protocolo clínico sugerido para a terapia foi um tempo pré-irradiação de cinco minutos, período durante o qual o azul de metileno foi deixado em contato com a cavidade para posterior exposição a um laser vermelho (660nm) por um minuto. De acordo com os autores, problemas clínicos como o feixe de luz reduzido e a dificuldade de penetração do corante e da luz na dentina cariada podem ter contribuído para os resultados encontrados. Segundo Burns, Wilson e Pearson (1995), a dentina pode reduzir a quantidade de luz penetrante. Zanin et al (2006), relatam que biofilmes que contém altas concentrações

de polissacarídeos extracelulares, *in vitro*, podem afetar a penetração do agente fotossensibilizador, reduzindo assim a quantidade de luz absorvida pela bactéria, diminuindo a efetividade da PDT.

Em outro estudo, Araujo e cols (2009) associaram o azul de metileno a 25mg/L a uma luz halógena, com um tempo pré-irradiação de cinco minutos e um tempo de exposição de um minuto e encontraram uma redução bacteriana de 2,5 log (99,5%). O estudo foi realizado *in vivo*, com a terapia sendo aplicada em molares com lesões cariosas ativas de dentina.

3.1.1. Mecanismo de ação

São necessários três componentes para que a terapia fotodinâmica aconteça: fotossensibilizador, luz e oxigênio. Quando o fotossensibilizador é irradiado por um comprimento de onda adequado, isso leva a transição da molécula do estado fundamental para um estado singleto excitado (GARCEZ *et al*, 2003). Conseqüentemente, o fotossensibilizador pode voltar a seu estado normal com a emissão de fluorescência, ou pode sofrer uma transição para um estado tripleto com maior energia (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Este estado pode levar a uma reação do oxigênio da célula produzindo um oxigênio singleto e radicais livres, causando uma destruição seletiva e rápida da célula alvo (Fig.1). A utilização do oxigênio para produção de outros tipos de oxigênio é conhecida como consumo fotoquímico do oxigênio. A reação do fotossensibilizador no estado tripleto ocorre com as biomoléculas através de dois mecanismos. A reação do Tipo I envolve elétrons/hidrogênio que são transferidos diretamente do fotossensibilizador, produzindo íons ou elétrons/hidrogênio que são removidos das células formando radicais livres. Estes, por sua vez, reagem rapidamente com o oxigênio, resultando na formação de outros tipos de oxigênio (superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio). A reação do Tipo II produz oxigênio singleto altamente reativo. Estas duas reações indicam o mecanismo de destruição tecidual/celular que depende tanto da

concentração do fotossensibilizador e da tensão do oxigênio (KONOPKA E GOLINSKI, 2007). A PDT causa efeitos citotóxicos nas organelas citoplasmáticas; apoptose nas mitocôndrias e necrose nos lisossomos e membrana celular (CASTANO et al.,2005).

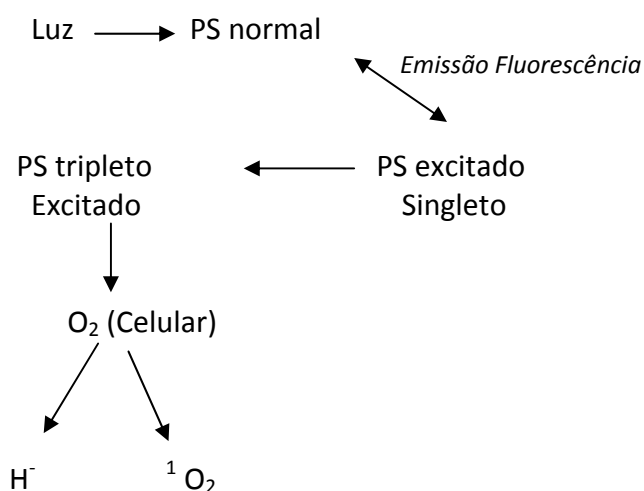


Figura 1 – Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica

PDT é uma tecnologia complexa e inerente, que depende de muitas variáveis, incluindo as propriedades químicas e fotoquímicas da PS, a dosagem PS e veículo de entrega, o intervalo de tempo da luz, o comprimento de onda, dose de energia, a densidade de potência e estrutura de pulso da luz, e do estado de oxigenação do tecido (ARAUJO E COLS 2009).

Os métodos convencionais para determinar os efeitos da PDT envolvem exposição de bactérias à luz, na presença de um fotossensibilizador, seguido pela contagem de número de bactérias visíveis (UFC) remanescentes na amostra. As condições de controle que são normalmente adotadas no estudo incluem a utilização do fotossensibilizador sem a luz, a luz sem o fotossensibilizador, e a solução sem a luz e sem o fotossensibilizador, sendo esta última utilizada como controle.

De acordo com HAMBLIN & HASSAN (2004), a PDT para infecções localizadas poderia ser realizada mediante o uso local do PS na área infectada,

por métodos, tais como, aplicação tópica, injeção intersticial ou aerosol. As principais questões abordadas são a eficácia do tratamento em diminuir ao máximo o número de microorganismos causadores da doença e a seletividade do PS com as bactérias, para assim evitar danos ao tecido hospedeiro na área de infecção.

PAULINO et al (2005) mostrou que as bactérias eram 10 vezes mais sensíveis à PDT do que os fibroblastos, que supostamente podem ser um reflexo dos sistemas de proteção e reparo no eucariota. Esses autores demonstraram a destruição fotoinduzida de *S.mutans* sem morte celular dos fibroblastos, apoiando a seletividade desta terapia. Devido à sua natureza localizada e não invasiva, os efeitos colaterais, comparados com os de muitos antibióticos (por exemplo, distúrbio gastrointestinal), são pouco prováveis de ocorrer com a PDT (KOMERIC et al,2003).

3.2 Patógenos cariogênicos

A cárie dentária é uma doença microbiana que afeta os tecidos duros dos dentes, começando primeiro com uma dissolução localizada das estruturas inorgânicas de uma dada superfície do dente por ácidos de origem bacteriana, levando a desnaturação da matriz orgânica. É normalmente uma doença progressiva e, se não tratada, desenvolve-se em direção à polpa causando um quadro de dor, devido a uma pulpite, inicialmente, reversível, progredindo para pulpite irreversível. Finalmente, o resultado será necrose pulpar e perda da vitalidade do dente. (LIMA et al,2009)

A cárie pode ser vista como uma doença dependente de múltiplos fatores. A mediação bacteriana ocorre através da produção de ácidos orgânicos por microorganismos orais, os quais utilizam, como substrato, carboidratos disponíveis localmente. A dieta do hospedeiro fornece a principal fonte de tais substratos, de tal forma que a dieta pode ser vista como um fator primário na determinação da susceptibilidade para a doença. Uma série de fatores intrínsecos ao hospedeiro também determinam a susceptibilidade e severidade da doença. Estes incluem a composição e fluxo da saliva, forma do dente, alinhamento do arco e a natureza físico-química da superfície do dente. Finalmente a composição da placa bacteriana é um fator primário. Uma

quantidade de diferentes bactérias orais tem sido implicada com o processo de cárie. É a combinação de todos esses fatores, superpostos sobre os mecanismos de dissolução ácida bacteriana da superfície do dente, que determina a susceptibilidade à cárie dentária e o desenvolvimento básico da doença.

É sabido, desde 1890, que microorganismos são essenciais na patogênese da cárie dental, quando Miller fez a observação significativa de que muitos microorganismos podiam produzir ácidos a partir da fermentação do açúcar. Os ácidos assim formados seriam responsáveis pela dissolução dos cristais de apatita que constituem aproximadamente 95% do volume do esmalte (HORSTED-BINDSLEV e MJOR, 1990). Entretanto, foi em 1924 que CLARKE definiu a cárie como sendo resultante de um microorganismo *Streptococcus mutans*. Esta teoria foi confirmada por KEYES (1960); FITZGERALD e KEYES (1965) (citados por BUSATO e cols, 2005) que argumentaram a relação entre a cárie e os microorganismos, o hospedeiro e a dieta (BUSATO e cols, 2005).

O *S.mutans* e *S.Sobrinus* são bactérias gram-positivas que são parte essencial na constituição da placa dental e de inquestionável importância na etiologia da cárie. Os *S.mutans* têm sido considerados os agentes etiológicos primários das lesões cariosas devido a sua alta concentração na placa antes do aparecimento da lesão de cárie, devido à sua habilidade de degradar carboidratos facilmente com a formação abundante de ácidos e à sua habilidade de induzir uma tolerância a ambientes de pH baixo (ZANIN et al, 2005).

De acordo com Demidova e Hamblin (2005) as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis a terapia fotodinâmica do que as bactérias gram-negativas. Isto pode ser explicado pela estrutura da parede celular da bactéria. As bactérias gram-negativas possuem a parede celular constituída de duas camadas de lipídios, enquanto que as gram-positivas possuem apenas uma camada lipídica, o que a torna mais permeável ao fotossensibilizador. Os fungos são mais resistentes que as bactérias a PDT, devido ao tamanho da célula e da presença de membrana nuclear, que é uma barreira a mais para a penetração do fotossensibilizador (DONNELLY,2007).

3.3 Agentes fotossensibilizantes

Um fotossensibilizador ideal deve ser atóxico, e ativado pela luz. Normalmente, o fotossensibilizador deve ter um número de características foto-químicas, físicas e biológicas (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades de um fotossensibilizador ideal

- 1 Altamente seletivo
- 2 Baixa toxicidade e ser eliminado rapidamente pela pele e epitélio
- 3 Picos de absorção na janela de transmissão com baixa perda de tecido biológico
- 4 Ótima relação entre o poder de absorção de luz e conversão da mesma.
- 5 Alta produção de oxigênio singleto
- 6 Alta solubilidade em água, soluções injetáveis e derivados do sangue
- 7 Armazenamento e estabilidade na aplicação da luz

Fonte: *Raghavendra et al, 2007.pág S103* (Traduzida)

Várias classes de compostos químicos, incluindo as fenotiazinas, ftalocianinas e porfirinas, as quais apresentam propriedades fotoativas têm sido efetivas na terapia fotodinâmica (MAISH *et al.*, 2007). Um agente fototerapêutico clinicamente adequado deve possuir no seu estado tripleto excitado um tempo de vida de longa duração, podendo reagir eficientemente tanto com moléculas vizinhas, como com o oxigênio. Deve também apresentar elevada absorvidade molar na região espectral compreendida entre 600 e 1000 nm, conhecida como “janela fototerapêutica”, onde a membrana celular apresenta considerável transparência à radiação eletromagnética (MACHADO, 2000). Quanto maior o comprimento de onda incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido. Radiações de comprimento de onda menores sofrem maior espalhamento e são absorvidas pelos cromóforos endógenos (substâncias que absorvem luz) nos tecidos, fazendo com que a penetração de luz seja menor. Por outro

lado, acima de 800 nm ocorre absorção da radiação pela água o que restringe o comprimento de onda nesse limite superior (SIMPLICIO, 2002).

O azul de metileno é uma substância fotossensibilizadora, que tem sua administração intravenosa aprovada pela FDA(Food and Drug Administration) para tratamento da metaglobulinemia, e vem sendo testada como um candidato promissor na terapia fotodinâmica para o câncer e também para várias bactérias orais. A característica hidrofílica do azul de metileno e seu baixo peso molecular são pontos positivos que permitem sua passagem através dos canais protéicos na membrana bacteriana. O azul de metileno interage, predominantemente, com ânions de macromoléculas de lipopolissacarídeos, resultando na formação de dímeros de azul de metileno que participam no processo de fotossensibilização (FONTANA et al, 2009).

3.4 Fontes de luz

As fontes de luz visível são utilizadas para ativar os fotossensibilizadores. Os primeiros sistemas de laser empregados eram muitos complexos e caros, mas logo surgiram os sistemas de LED (light-emitting diodes) que são de fácil manuseio, portáteis e de baixo custo.

Os fotossensibilizadores podem ser ativados por uma luz de baixa energia com comprimento de onda específico. Uma fonte de luz com comprimento de onda de 630nm e 700nm é capaz de penetrar no tecido humano a uma profundidade de 5mm e 15mm, respectivamente (RAGHAVENDRA et al.,2009). A ativação dos fotossensibilizadores é dependente da intensidade e da quantidade de luz, da capacidade de penetração da luz e localização da área alvo. Com tudo isso, a luz deve penetrar o máximo possível no tecido sem produzir efeitos térmicos.

Segundo Araujo e cols (2009), embora os trabalhos encontrados na literatura utilizem principalmente fontes de luz laser e LEDs, a luz halógena oferece perspectivas bastante promissoras para emprego na terapia fotodinâmica. De acordo com o gráfico 1, pode-se observar que o espectro de emissão da luz halógena engloba quase a totalidade da

área do espectro de absorção do azul de metileno. Além disso, um largo espectro de emissão pode ser uma vantagem por permitir a ativação de diferentes agentes fotossensibilizantes.

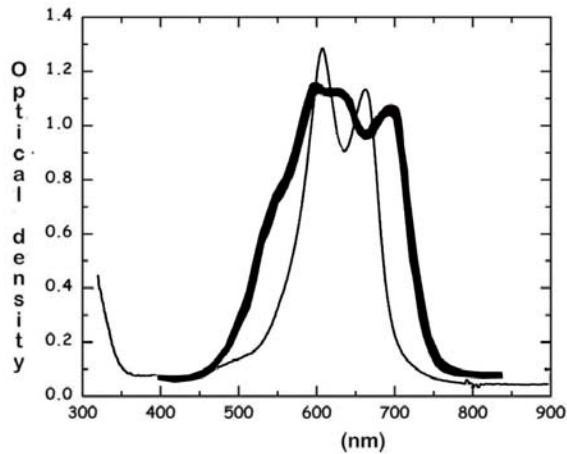


Gráfico 1- *Espectro de emissão da luz halógena e espectro de absorção do azul de metileno, demonstrando a ressonância entre eles*

De acordo com Williams et al. (2004), a dose de energia é o fator mais importante para promover a morte bacteriana. WILSON et al. (1995) descreve que a dose de energia pode ser calculada a partir da equação tempo de exposição multiplicado pela potência da luz (mW). Ao aumentar a potência, a dose de energia aplicada à bactéria poderá ser aumentada sem alterar o tempo de exposição, o que é interessante do ponto de vista clínico do tratamento. Além disso, é necessário que o fotossensibilizador tenha um espectro de absorção próximo ao espectro de emissão da fonte de luz. Assim, tendo em consideração esses parâmetros, é possível que várias combinações de diferentes fontes de luz e PS possam ser eficazes em uma fotossensibilização letal para as bactérias.

4. Materiais e Métodos

4.1 Fotossensibilizador e fonte de luz

O agente fotossensibilizante azul de metileno (Chimiolux®- Aptivalux/Belo Horizonte, Brasil) foi utilizado na concentração de 25mg/L, obtida a partir da diluição de sua concentração inicial (100mg/L) em água destilada estéril. A fonte de luz empregada foi uma luz halógena obtida do aparelho Curing Light 3M Espe® (3M Espe, USA), o qual foi utilizado sem o filtro de comprimento de onda.

4.2 Cultura bacteriana

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *S.mutans* (ATCC 25195) e a metodologia para preparo de inóculo foi realizada de acordo com Araujo et al (2009). Uma amostra de 0,5µl do microrganismo foi adicionada a 5 ml de caldo *brain-heart-infusion* (BHI) e colocada em ambiente de microaerofilia a 37°C por 24hs. Após o crescimento inicial, foi realizado o plaqueamento da suspensão em ágar *mitis salivarius* (Acumedia Fabricantes®, Inc. Lansing, Michigan), seletivo para estreptococos. Com uma alça descartável, amostras do microrganismo plaqueado foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo água destilada estéril e esta suspensão foi homogeneizada em vórtex antes de ser levada ao espectrofotômetro (SpectrumLab 22PC®) para padronização. De acordo com Paulino et al(2005), uma suspensão com a turbidez ajustada a uma absorbância de 0,5 no comprimento de onda de 600nm do espectrofotômetro apresenta uma concentração inicial de aproximadamente 10^9 células/ml. Todo o experimento foi realizado sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar.

4.3 Aplicação da Terapia fotodinâmica

Nove grupos foram avaliados em triplicata (n = 3). O grupo controle (G1) continha 1ml da suspensão padronizada (inóculo), preparado conforme descrito acima. A toxicidade do azul de metileno foi avaliada adicionando-se 0,25ml de azul de metileno a 0,75ml de inóculo, sem ação da luz halógena (G2). Para avaliar a toxicidade da luz,

isoladamente, sem o corante, o grupo 3 (G3) foi preparado com 1 ml do inóculo, que foi irradiado pela luz halógena por um minuto. Dos nove grupos avaliados, seis foram submetidos à terapia fotodinâmica, associando-se o azul de metileno a 25mg/L a uma fonte de luz halógena. Para os grupos 4, 5 e 6 o tempo pré-irradiação foi de cinco minutos e o tempo de exposição variou de 1min para o G4, 30s para o G5 e 20s para o G6. Os mesmos tempos de exposição foram utilizados respectivamente para os grupos 7, 8 e 9, porém, com um tempo pré-irradiação de três minutos. O tempo pré-irradiação é o período no qual o corante é deixado em contato com o substrato previamente à aplicação da luz. Diluições seriadas até 10^3 foram realizadas e alíquotas de 20 μ l foram plaqueadas em triplicata em ágar *mitis salivarius*. Após incubação em jarra de vela em ambiente de microaerofilia em estufa a 37°C por 24h, o número de unidades formadoras de colônias foi obtido por contagem visual.

4.4 Análise Estatística

Após a contagem visual do número de unidades formadoras de colônia, calculou-se a média e o desvio padrão para cada grupo. Os resultados foram transformados em logaritmo, para padronização dos resultados antes de serem enviados para a análise estatística (SHAPIRO-WILK $p < 0,05$).

Para avaliação de dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e posteriormente trabalhou-se com o teste de Post-Hoc de Dunn para identificar onde estavam as diferenças ($p \leq 0,05$).

Para avaliar a influência do tempo pré- irradiação, dois grupos, A (TPI=5min) e B (TPI=3min) foram criados e empregou-se o Teste de Mann-Whitney, ($p < 0,05$).

5. Resultados

Neste experimento foi possível observar uma relação entre a eficácia da PDT e o tempo pré-irradiação e o tempo de exposição.

Avaliando-se os grupos, isoladamente, observou-se uma redução bacteriana nos grupos de 4 a 9 em relação ao grupo controle. Dentre estes, os grupos 4, 5 e 6 apresentaram uma redução de 99,8%, 99,2% e 97,9 %, respectivamente ($p \leq 0,05$). Nos grupos 7, 8 e 9, houve uma diminuição do número de bactérias de 97,3%, 92,3% e 84% respectivamente, o que não foi considerado estatisticamente significante ($p \geq 0,05$).

A redução para os grupos em $\log_{10}(\log \text{kill})$ foi: G4 (3,6), G5 (3,5), G6 (2,8), G7(2,7), G8(1,9) e G9(2,3) em comparação ao grupo controle que era de G1(6,4). Nos grupos 2 e 3, onde utilizou-se apenas o corante ou apenas a fonte de luz, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle.

Mantendo-se, o mesmo tempo pré-irradiação, foi feita uma comparação intergrupos. No grupo A (TPI= 5min), não houve diferença entre os tempos de exposição de 60s e 40s. Já entre os tempos de 60s e 20s e 40s e 20s, houve diferença significativa na redução bacteriana . Com o TPI =3min (Grupo B), não houve diferença significativa entre os grupos. Observou-se que o tempo pré-irradiação afeta a ação da PDT, uma vez que os resultados do grupo A foram melhores que do grupo B. Gráfico 2 explica os resultados encontrados



6. Discussão

De acordo com Thompson et al (2008) embora haja substancial evidência do contrário, a maioria dos cirurgiões-dentistas continua a seguir os princípios básicos que se deve remover todo e qualquer tecido dentinário afetado pela cárie. Dobson e Wilson (1992) afirmam que a remoção de tecido cariado preconizada é subjetiva e a facilidade de se eliminar as bactérias dentro das lesões poderá permitir decisões mais objetivas quanto à quantidade de dentina a ser removida.

Em virtude da possibilidade de aplicação tópica e de seu efeito localizado, a utilização da terapia fotodinâmica para o tratamento de lesões de cárie tem sido bastante discutida na literatura. A terapia fotodinâmica é uma alternativa promissora para o tratamento de infecções locais, pois se trata de uma técnica pouco invasiva, de baixo custo e fácil aplicação (SOUKOS et al,2003).

Se as bactérias dentro das lesões de cárie puderem ser erradicadas pela PDT *in situ*, teríamos conseqüências benéficas para a saúde dental, permitindo um tratamento mais rápido e com mínima remoção de tecido. (WILSON E PATTERSON, 2008).

Em uma revisão sistemática realizada em 2009, Araujo e cols concluíram que a terapia fotodinâmica é uma técnica que tem se mostrado eficaz contra bactérias cariogênicas *in vitro*. Embora vários estudos já tenham demonstrado o potencial antimicrobiano da PDT *in vitro*, em suspensões bacterianas (MULLER, 2004), em amostras de placa dental (WILSON *et al*, 1995) ou em biofilmes produzidos laboratorialmente (WILSON *et al*, 1996), não há uma definição sobre o tempo pré-irradiação ideal e o tempo de exposição à luz a serem usados. Uma grande variedade de agentes fotossensibilizadores e diferentes fontes de luz com seus respectivos comprimentos de onda também têm sido avaliados (LIMA *et al*, 2009). Em função desta ampla variedade de associações possíveis, não há um consenso na literatura em relação a um protocolo clínico de aplicação da PDT.

A partir dos trabalhos de Araujo e cols (2009), onde um protocolo de aplicação da PDT foi testado *in vivo*, constatou-se a efetividade antimicrobiana da PDT associando-se o azul de metileno a uma fonte de luz halógena. O tempo pré-irradiação utilizado foi de cinco minutos e o tempo de exposição foi de um minuto. A fim de se avaliar a possibilidade de reduzir o tempo clínico da terapia, o presente estudo se propôs a avaliar se a redução do tempo de exposição e do tempo pré-irradiação inicialmente preconizados teriam algum efeito sobre a atividade antimicrobiana da PDT.

Segundo Wood *et al* (2006), a lâmpada de filamento de tungstênio associado a diferentes corantes na fotossensibilização de biofilmes de *S.mutans*, tem sua ação comprovada. ARAUJO e cols (2009), também confirmam a eficiência da luz halógena, em um estudo com MB e luz halógena, e MB e laser sobre *S.mutans* e comprovaram que houve uma redução percentual de 99,5% para a associação azul de metileno e luz halógena, com uma resposta de ação melhor que a associação do MB e laser que foi de 81,3%.

Qualquer fonte pode ser utilizada em PDT, desde que tenha características espectrais apropriadas, tais como lâmpada de tungstênio ou halogênio, laser ou LED (PAULINO *et al.*, 2005). A técnica de ativação do fotossensibilizador pode ser feita com laser vermelho e infra vermelho, sistemas de LED ou fontes de luz visível (JURCZYNYN *et al.*, 2007.; WALSH, 1997). De acordo com Paulino *et al.* (2005) é possível ter um efeito bactericida eficiente utilizando os aparelhos fotoativadores disponíveis no consultório, especialmente se considerarmos a possibilidade de mudar os filtros de luz dos aparelhos, aumentando a aplicabilidade da terapia pela variação do espectro de emissão a uma larga variedade de agentes fotossensibilizantes, produzindo uma combinação contra patógenos dentais e pouca ou nenhuma atividade sobre células mamíferas.

Burns, Wilson e Pearson (1994) afirmam que a relativa não especificidade do efeito bactericida da terapia fotodinâmica contra quatro espécies bacterianas tem significância clínica, uma vez que quais microorganismos estão presentes nas lesões de cárie é um dado desconhecido. Ter como alvo bactérias específicas pode ser menos satisfatório e resultar em um efeito clínico limitado. Estes autores utilizaram a combinação de uma ftalocianina (AlPcS2) associada a um laser de GaALAs ou ao laser de HeNe. Embora o presente estudo tenha avaliado o efeito antibacteriano da PDT apenas contra o *S. mutans*, a utilização da luz halógena como fonte de luz pode permitir este efeito não específico descrito por Burns, Wilson e Pearson (1994) em virtude do amplo espectro de emissão, o que poderia contribuir para uma maior efetividade contra as bactérias presentes no tecido cariado. Araujo e cols também encontraram resultados satisfatórios contra o *Lactobacillus* (redução de 2,4log) quando a luz halógena foi associada ao azul de metileno, conforme o protocolo utilizado neste estudo.

Os trabalhos de Hamblin *ET AL* (2002), Williams *ET AL* (2004) e Bevilacqua *ET AL* (2007) demonstram um aumento na efetividade da terapia em função de um maior tempo pré-irradiação. Os resultados aqui encontrados comprovaram estes achados, pois em todos os grupos onde foi utilizado o TPI de 5min, a redução foi maior. A diminuição do TPI para 3 min afetou adversamente a efetividade antimicrobiana da PDT e nos grupos

onde este TPI foi utilizado, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e a redução foi de pelo menos 1log menor que para os grupos onde o TPI foi de 5min.

Vários trabalhos também apontam para um efeito dose dependente da PDT. Isto significa dizer que quanto maior a dose de energia, maior o efeito antimicrobiano. Para Williams *et al.*(2003) a dose de energia(mW/s) é o fator mais importante na morte bacteriana. Essa dose de energia pode ser calculada multiplicando o tempo de exposição (s) pelo poder de emissão de luz pela fonte (mW). E quando a emissão de luz é aumentada, a dose de energia pode aumentar sem alterar o tempo de exposição.(WILSON *et al.*,1995). Neste estudo observou-se que os grupos pré-irradiados por 5 min com tempo de exposição de 60s e 40s apresentaram maior redução do número de *S.mutans* viáveis, o que está de acordo com os trabalhos da literatura que afirmam que o efeito da PDT é dose-dependente.

Baseado nos resultados apresentados pode-se concluir que tanto o tempo pré-irradiação quanto o tempo de exposição exercem influência no efeito antimicrobiano da PDT. A redução do tempo clínico afetou adversamente a eficácia da terapia fotodinâmica quando esta foi aplicada sobre suspensões bacterianas de *S. mutans in vitro*.

Referências Bibliográficas

ARAUJO PV, TEIXEIRA KIR, LANZA LD, CORTES ME, POLETTO LTA. *In vitro lethal photosensitization of S.mutans using methylene blue and toluidina blue O as photosensitizers*. Acta Odont Latinoam.,2009;22:93-97.

ARAUJO PV, CORTES ME, POLETTO LTA . *Photodynamic therapy of cariogenic agents: a systematic review* . Journal of Laser Applications 2010; 1:13-21.

BEVILACQUA IM, NICOLAU RA, KHOURI S, BRUGNERA JR. A, TEODORO GR, ÂNGARO RA, PACHECO MTT. *The Impact of Photodynamic Therapy on the Viability of Streptococcus mutans in a planktonic culture*. Photomed Laser Surg 2007; 25: 513-518.

BURNS T, WILSON M, PEARSON GJ. *Killing of cariogenic bacteria by light from a allium arsenide diode laser*. J .Dent 1994; 22:273-278.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. *Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2004; 1:279—293.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. *Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2005; 2:1-23.

CONSTERTON JW, STEWART OS, GREENBERG EP. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science 1999; 284:1318-1322.

DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW ET AL. *Photodynamic therapy*. J.Natl. Cancer Inst.1998; 90:889-905.

FONTANA CR, ABERNETHY AD, SOM S, RUGGIERO K, DOUCETTE S, MARCANTONIO RC, BOUSSIOS CI, KENT R, GOODSONJM, TANNER ACR, SOUKOS NS. *The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms*. J. Periodont.Res 2009; 44 : 751-759.

GOULART RC,THEDEI G,SOUZA SLS,TEDESCO AC, CIANCAGLINI P. *Comparative study of methylene blue and erythrosine dyes employed in photodynamic therapy for inactivation of planktonic and biofilm-cultivated Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Photomedicine and Laser Surgery 2008; 28:(1 Suppl): S85-S90.

HAMADA S, SLADE HD. *Biology, Immunology and Cariogenicity of Streptococcus mutans*. Microbiological Reviews 1980; 44:331-384.

HAMBLIN MR, HASAN, T. *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochem Photobiol Sci 2004; 3: 436-450.

JORI G et al. *Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basics principles and perspective applications.* Lasers Surg Med 2006; 38:468-481.

JUNQUEIRA JC et al. *Antimicrobial photodynamic therapy: photodynamic antimicrobial effects of malachite Green on Staphylococcus, Enterobacteriaceae, and Candida.* Photomedicine and Laser Surgery 2010; 28(1):s67-s72.

JURCZYSZYN K, ZIÓLKOWSKI P, GERBER A, OSIECKA BJ. *Potentiality of photodynamic therapy in Dentistry – Literature review.* Dent Med Probl 2007; 44: 255-258.

KIDD EAM, RICKETTS DNT, BEIGHTON D. *Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: clinical and microbiological study.* Br Dent J.1996; 180:287-291.

KOMERIC N, NAKANISHI H, MACROBERT AJ, HENDERSON B, SPEIGHT P, WILSON M. *In vivo killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003; 47:932-940.

KUBLER AC. *Photodynamic therapy.* Med Laser Appl 2005; 20:37-45.

MAISCH T, BAIER J, FRANZ B, MAIER M, LANDTHALER M, SZEIMIES RM, BAUMLER W. *The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria.* PNAS 2007; 104: 7223-7228.

MALIK R, MANOCHA A, SURESH DK. *Photodynamic therapy – a strategic review.* Indian J Dent Res 2010; 21(2):285-291.

MARSH P, MARTIN M, *Oral Microbiology*, 3rd edn. London: Chapman and Hall, 1992.

METCALF D, ROINSON C, DEVINE D, WOOD S. *Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of Streptococcus mutans biofilms by light fractionation.* J. Antimicrob. Chemother 2006; 58:190-192.

MULLER P, GUGGENHEIM B, SCHIMIDLIN PR. *Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro* Eur J Oral Sci 2007; 115:77-80.

RICKETTS D. *Deep or partial caries removal: which is best?* Evid Based Dent 2008; 9:71-72.

O'RIORDAN K, AKILOV OE, HASAN T. *The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2005; 2: 247–262.

PAULINO TP, RIBEIRO KF, THEDEI JR. G, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P. *Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate Streptococcus mutans*. Arch. Oral Biol. 2005; 50:353-359.

PLAETZER K, KRAMMER B, BERLANDA J et al. *Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects*. Lasers Med Sci 2009; 24:259-268.

RAGHAVENDRA M, KOREGOL A, BHOLA S. *Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics*. Australian Dental Journal 2009; 54: (1 Suppl):S102-S109.

SOUKOS NS, MULHOLLAND SE, SOCRANSKY SS, DOUKAS AG. *Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms*. Pharm Res 2000; 17:405-409.

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; 33:161-168.

THOMPSON V, CRAIG RG, CURRO WS, SHIP JA. *Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review*. J Am Dent Assoc 2008; 139:705-712.

USACHEVA MN, TEICHERT MC, BIEL MA. *Comparison of methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms*. Lasers Med Sci 2001; 29:165-173.

VAN HOUTE J. *Role of Micro-organisms in Caries Etiology*. J Dent Res 1994; 73:672-681.

WAINWRIGHT M. *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J Antimicrob Chemother 1998; 42:13-28.

WAINWRIGHT M, PHOENIX DA, GASKELL M, MARSHALL B. *Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant Enterococcus spp.* J Antimicrobiol Chemother 1999; 44:823-825.

WALSH L J. *The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications*. Australian Dental Journal 1997; 42:302-306.

WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ, WILSON M. *The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on Streptococcus mutans*. Caries Res 2003; 37:190-193.

WILLIAMS JA et al. *The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine*. Caries Res 2004; 38:530-536.

WILSON M, DOBSON J, SARKAR S. *Sensitisation of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser*. Oral Microbiol. Immunol. 1993; 8:182-187.

WILSON M, BURNS T, PRATTEN J, PEARSON GJ. *Bacteria in supragingival plaque amples can be killed by lowpower laser light in the presence of a photosensitizer*. J Appl Bacteriol 1995; 78:569-574.

WILSON M. *Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections*. Photochem Photobiol Sci 2004; 3: 412-418.

WILSON BC, PATTERSON SM. *The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy*. Phy Med Biol 2008; 53:61-109.

WOOD S, NATTRESS B, KIRKHAM J ET AL. *An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo*. J Photochem Photobiol B 1999; 50:1-7.

ZANIN JCI ET AL, *Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries*. Eur J Oral Sci 2009; 117:568-574.

ZANIN JCI, LOBO MM, RODRIGUES LKA, PIMENTA LAF, HOFLING JF, GONÇALVES RB. *Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode*. Eur J Oral Sci 2006; 114:64-69.