



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIA ÂNGELA LACERDA RANGEL ESPER

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM BIOFILME
DE *Streptococcus mutans* SOBRE BRÁQUETES
METÁLICOS E CERÂMICOS: um estudo *in vitro***

2016

MARIA ÂNGELA LACERDA RANGEL ESPER

**INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA EM BIOFILME DE
Streptococcus mutans SOBRE BRÁQUETES METÁLICOS
E CERÂMICOS: um estudo *in vitro***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves
Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

São José dos Campos
2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Esper, Maria Ângela Lacerda Rangel

Inativação fotodinâmica em biofilme de *Streptococcus mutans* sobre
bráquetes metálicos e cerâmicos: um estudo in vitro. / Maria Ângela
Lacerda Rangel Esper. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
116 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves
Coorientadora: Alessandra Nara de Souza Rastelli.

1. Ortodontia. 2. Lesão de mancha branca. 3. *S mutans*. 4.
Inativação fotodinâmica. 5. Biofilme. I. Gonçalves, Sérgio Eduardo de
Paiva, orient. II. Rastelli, Alessandra Nara de Souza, coorient.
III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos,
UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista
'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI.
Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 16 de fevereiro de 2016
E-mail: angela_esper@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves (Orientador)
Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala
Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro
Universidade Camilo Castelo Branco
de São José dos Campos

Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo
Inst. de Pesquisas Energéticas e Nucleares
USP – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Eduardo Bresciani
Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 16 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

*A Deus,
por me proporcionar uma vida tão maravilhosa em que só posso
agradecer. Tudo é possível quando se tem fé!*

*Aos meus queridos pais Maria Ernestina e Lauro,
pelo amor verdadeiro, pela formação e apoio constante em todas as minhas
decisões, pelo incentivo em meus estudos e profissão.*

*Ao meu querido marido Maury,
pelo amor, atenção e estímulo em minha vida profissional e
pessoal, durante todos estes anos em que estamos juntos.*

*Aos meus filhos Helena e Renato,
meus amores, que tanto me incentivam em tudo que faço.
Obrigada por vocês serem como são.*

AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos
Agradeço ao ICT, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara e da Vice-diretora Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló.*

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora

*Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora
Agradeço a todos os professores que se dedicaram para a minha formação e evolução e de todos os alunos. Vocês são a alma da pós.*

*Aos docentes do curso de Pós-Graduação
Profs. Drs. Alessandra Borges, Clóvis Pagani, Carlos Torres, Eduardo Bresciani,
Filomena Huhtala, Taciana Caneppele*

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora

*Aos amigos da Dentística e GAPEC
Andréa, Daniele, Débora, Érica, Fabiana, Fernanda, Geraldo, Graziela, Laura,
Letícia, Lucas, Luciana, Monique, Maria Beatriz, Rayssa*

*Aos amigos da Prótese e Endodontia
Aline, Alecsandro, Ana Flávia, Cláudia Bin, Ivany, Lígia, Pedro, Rosemary, Tereza,
Sâmia*

*À colega e amiga do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora
Ana Carolina Salvia, minha querida amiga e dupla nas clínicas e GAPEC, graça de
pessoa. Obrigada pela atenção e amizade.*

*À Família Gonçalves
Bia, Daphne, Karen, Lucélia, Stella, Tânia
muito obrigada pela amizade, parceria, atenção e carinho.*

*Aos amigos do Laboratório de Microbiologia
Adeline, Ana Carolina Chipoletti, Ana Luiza, Elis, Felipes, Jéssica, Jonatas, Lucas,
Mirian, Michele, Marisol, Fernanda, Rodnei*

*À mestra Júnia Oliveira Barbosa
Muito obrigada pela grande ajuda e treinamento inicial na Microbiologia. Sem sua
ajuda não seria possível realizar este trabalho com êxito.*

*Às alunas e agora cirurgiã-dentistas Janaína Alvarenga e Isabela Duque
Obrigada pela ajuda durante a execução de minha pesquisa no laboratório de
Microbiologia. Sucesso na vida pessoal e profissional.*

*À supervisora técnica de seção da Biblioteca, Renata Aparecida Couto Martins
Agradeço muito pela orientação para a finalização deste trabalho.*

*Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio e Domingos
Pela ajuda e orientação constante durante a realização dos experimentos.*

Obrigada pela atenção dispensada.

*Às técnicas do Laboratório da Dentística, Josi e Fernanda
Muito obrigada pela amizade, atenção e disposição em sempre ajudar. Vocês são
essenciais para o funcionamento do laboratório e clínica.*

*À assessora administrativa Rosângela
Pela atenção e eficiência em me atender e ajudar.*

*Às minhas secretárias
Pela atenção e ajuda nestes anos da pós-graduação.*

*Ao Prof. Dr. Álvaro José Damião do IEAv
Pela ajuda na obtenção do espectro do LED, meus agradecimentos.*

*A todos os funcionários do ICT-UNESP
Agradeço especialmente aos funcionários e ex-funcionária da Seção da Pós-
graduação
Rosemary, Bruno, Ivan e Erena pela atenção, compreensão e por todos serviços
prestados.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A meu querido orientador Prof. Adj. Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves
Colega dentista, colega pianista e amigo,
agradeço pela orientação e dedicação para realização deste sonho. Agradeço por
todos estes anos de convívio, pelas oportunidades e dedicação. A minha gratidão,
respeito e admiração.*

*À minha querida co-orientadora Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli
Pela co-orientação, apoio nas decisões mais difíceis, pela atenção dispensada fora
do horário de trabalho, pelas conversas à distância. Muito obrigada pelo seu apoio
e incentivo.*

*À Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira
Agradeço por permitir a utilização do Laboratório de Microbiologia, para a
realização de meu trabalho. Muito obrigada pelas orientações, apoio e
ensinamentos que muito me auxiliaram.*

*Ao Prof. Dr. Adjaci Fernandes Uchoa
Pela orientação e disponibilização do fotossensibilizador utilizado nesta pesquisa.
Muito obrigada pela atenção.*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Bráquetes ortodônticos	20
2.2 Lesão de mancha branca	24
2.3 <i>Streptococcus mutans</i>	27
2.4 Biofilme	30
2.5 Inativação fotodinâmica	33
2.6 Fotossensibilizador	36
2.6.1 Eritrosina.....	40
2.6.2 Hematoporfirina IX.....	42
2.7 Fonte de luz	44
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Aspectos éticos	48
4.2 Delineamento do estudo	48
4.3 Cepas de micro-organismos	49
4.4 Preparo da suspensão padronizada de <i>S. mutans</i>	50
4.5 Inativação fotodinâmica em células planctônicas de <i>S. mutans</i> em presença de eritrosina ou hematoporfirina 10 µM e LED azul	51

4.5.1 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	51
4.5.2 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	54
4.6 Coleta e armazenamento dos dentes.....	55
4.7 Preparo dos espécimes.....	55
4.7.1 Corte dos dentes	56
4.7.2 Padronização das dimensões dos espécimes.....	57
4.7.3 Colagem dos bráquetes ortodônticos sobre os espécimes	59
4.8 Formação de biofilme de <i>S. mutans</i>.....	60
4.9 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina 10, 20 e 50 µM ou 10 e 20 µM e LED azul (estudo piloto).....	62
4.9.1 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	62
4.9.2 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	64
4.10 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina 10 µM e LED azul sobre bráquetes metálicos ou cerâmicos.....	66
4.10.1 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	66
4.10.2 Fotossensibilização <i>in vitro</i>	67
4.11 Análise estatística.....	69
5 RESULTADO.....	70
5.1 Inativação fotodinâmica em células planctônicas de <i>S.</i> <i>mutans</i> em presença de eritrosina ou hematoporfirina IX 10 µM e LED azul.....	70
5.2 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina IX 10, 20 e 50 µM e LED azul, sobre bráquetes metálicos (estudo piloto).....	72

5.3 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina IX 10 e 20 µM e LED azul, sobre bráquetes metálicos(estudo piloto).....	73
5.4 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina IX 10 µM e LED azul, sobre bráquetes metálicos.....	74
5.5 Inativação fotodinâmica em biofilme de <i>S. mutans</i> em presença de hematoporfirina IX 10 µM e LED azul, sobre bráquetes cerâmicos.....	75
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO	89
8 REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	112

Esper MALR. Inativação fotodinâmica em biofilme de *Streptococcus mutans* sobre bráquetes metálicos e cerâmicos: um estudo *in vitro* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

O trabalho *in vitro* avaliou a eficácia da inativação fotodinâmica (PDI) da eritrosina (E) e hematoporfirina IX (H), com 10 µM, utilizando LED azul, dose de 75 J/cm² em células planctônicas e biofilme de *S. mutans* (UA 159). Suspensões padrões contendo 10⁷ células/mL foram preparadas e submetidas a diferentes condições experimentais: a) hematoporfirina IX e LED (H+L+); b) eritrosina e LED (E+L+); c) apenas LED (F-L+); d) tratamento somente com hematoporfirina IX (H+L-); e) somente com eritrosina (E+L-); e f) grupo controle, sem tratamento com fotossensibilizador (F) e sem a utilização de LED (F-L-). As cepas foram semeadas em ágar MSBS para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Na segunda parte do trabalho foi realizado a PDI em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos e cerâmicos, com H a 10 µM e LED azul. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (p<0,05) e demonstraram que a E sob efeito do LED (E+L+) não foi eficaz na PDI de células planctônicas, nos parâmetros usados (p=0,3644). No entanto, a H promoveu redução de 6,78 log₁₀ (p<0,0001), no grupo de tratamento (H+L+). A PDI com a associação da H e LED foi efetiva na redução de 100% de culturas planctônicas de *S. mutans*, porém o mesmo não foi observado na associação com a E, na dosimetria utilizada no experimento. A PDI no biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, com a H e LED não foi eficaz nos parâmetros utilizados (p=0,1023), no entanto, ocorreu diminuição significativa de 53% sobre bráquetes cerâmicos (p=0,004). A H IX modificada é promissora como agente fotossensibilizador a ser empregado na técnica de PDI em associação ao LED azul, sendo necessários outros ensaios, em novas concentrações e/ou dosimetrias para se conseguir a inativação bacteriana.

Palavras-chave: Ortodontia. Lesão de mancha branca. *S. mutans*. Cárie dentária. Inativação Fotodinâmica. PDT. Eritrosina. Hematoporfirina IX. LED. Biofilme. *In vitro*.

Esper MALR. Photodynamic inactivation of Streptococcus mutans biofilm on metal and ceramic brackets: a study in vitro [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

*The in vitro study evaluated the efficacy of photodynamic inactivation (PDI) with erythrosine (E) and hematoporphyrin (H) 10 μ M, using a blue light-emitting diode (LED), a fluence of 75 J/cm², on planktonic cultures and biofilm of *S. mutans* (UA 159). Suspensions containing 10⁷ cells/mL were prepared and were tested under different experimental conditions: a) hematoporphyrin IX and LED (H+L+); b) erythrosine and LED irradiation (E+L+); c) only LED (P-L+); d) only hematoporphyrin IX (H+L-); e) only erythrosine (E+L-); and f) control group, no LED irradiation or photosensitizer (P) treatment (P-L-). After treatment, the strains were seeded onto MSBS agar in order to determine the number of colony-forming units (CFU/mL). The second part of this work consisted of the PDI of *S. mutans* biofilm on metal and ceramic brackets with the H 10 μ M and blue LED. The results were submitted to analysis of variance and the Tukey test ($p < 0.05$) and showed that E under the effect of LED proved to be ineffective in the PDI of planktonic cultures with the parameters used ($p = 0.3644$). H, however, caused a reduction of 6.78 log₁₀ ($p < 0.0001$) in the treatment group (H+L+). PDI with H and LED exerted antimicrobial effect of 100% of the *S. mutans* strain studied, whereas the same was not observed in the association with E in the dosimetry used in this work. PDI on *S. mutans* biofilm on metal brackets, with H and LED was not effective with the parameters used ($p = 0.1023$), however on ceramic brackets caused a significant reduction of 53% ($p = 0.004$). Modified H IX is a promising photosensitizer to be used in the PDI technique in combination with blue LED. Therefore, new tests with new concentrations and/or dosimetry are needed to achieve bacterial inactivation.*

*Keywords: Ortodontics. White spot lesion. *S. mutans*. Dental caries. Photodynamic inactivation. PDT. Erythrosine. Hematoporphyrin IX. LED. Biofilm. In vitro.*

1 INTRODUÇÃO

A Ortodontia é uma especialidade da Odontologia que visa restabelecer o relacionamento maxilo-mandibular, o posicionamento dentário, estético e funcional e a estética facial do paciente. Para conseguir este resultado, após um planejamento detalhado com o auxílio da anamnese, exame clínico, análise cefalométrica, radiográfica e de modelos, o ortodontista utiliza diferentes tipos de aparelhos ortodônticos que poderão ser removíveis ou fixos, dependendo do problema apresentado pelo paciente. Apesar da Ortodontia ter evoluído significativamente, com materiais e técnicas inovadoras, alguns aspectos ainda precisam de muitos estudos como a sensibilidade relatada pelo paciente após a movimentação ortodôntica e métodos preventivos para evitar o surgimento de lesão de mancha branca e de cárie durante o tratamento com aparelhos fixos (Krishnan, 2007; Pandis et al., 2010).

A instalação de aparelhos ortodônticos removíveis e/ou fixos causa uma modificação no ecossistema bucal, com um aumento do número de bactérias cariogênicas (Batoni et al., 2001; Sukontapatipark et al., 2001). Também favorece a formação de biofilme, restringe a auto-limpeza salivar e a higiene bucal torna-se mais difícil (Ahn et al., 2003; Derks et al., 2007; Lovrov et al., 2007; Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek, 2007). Ocorre, portanto, um desequilíbrio entre o processo de desmineralização e remineralização,

aumentando o risco de desmineralização e/ou cárie no paciente ortodôntico e o desenvolvimento de alterações gengivais e periodontias. Muitos estudos clínicos demonstram que os pacientes em tratamento ortodôntico são mais susceptíveis à doenças periodontais e lesões de mancha branca (Gorelick et al., 1982; Mizrahi, 1983; Ogaard, 1989; Rosenbloom, Tinanoff, 1991; Eliades et al., 1995; Petti et al., 1997; Ulukapi et al., 1997; Boersma et al., 2005; Lovrov et al., 2007; Pandis et al., 2010; Julien et al., 2013; Kirschneck et al., 2016).

Atualmente existe uma variedade muito grande de bráquetes ortodônticos (metálicos, plásticos e cerâmicos convencionais; autoligados metálicos e cerâmicos) que o ortodontista pode eleger para o tratamento de seus pacientes. No entanto, devido ao aumento da procura de tratamento ortodôntico por pacientes adultos, ocorreu também uma maior exigência da estética por parte do paciente e a maior utilização de bráquetes cerâmicos e plásticos (Jurela et al., 2013). Existem vários trabalhos comparando a colonização bacteriana cariogênica e alterações periodontais nas diferentes composições e desenhos de bráquetes e ligaduras metálicas ou elásticas. Os autores são unânimes em afirmar que ocorre um aumento significativo de micro-organismos cariogênicos quando é instalado o aparelho ortodôntico fixo, independente do tipo de bráquetes utilizados, podendo favorecer o aparecimento de lesões de mancha branca, se não houver colaboração do paciente com a higiene bucal (Ogaard et al., 1988a; Forsberg et al., 1991; Attin et al., 2005; Ahn et al., 2007; Papaioannou et al., 2007; Ristic et al., 2007;

Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek, 2007; Alves de Souza et al., 2008; Pandis et al., 2008; Jurela et al., 2013; Uzunur et al., 2014).

A desmineralização ao redor dos bráquetes é um efeito adverso que é de grande relevância clínica, apesar dos modernos avanços na prevenção da cárie dentária (Gorelick et al., 1982; Ogaard, 1989; Mitchell, 1992; Jordan, 1998; Lovrov et al., 2007; Bensen, 2008; Benham et al., 2009; Chapman et al., 2010; Guzman-Armstrong et al., 2010; Tufekci et al., 2011; Bahoum et al., 2012; Maxfield et al., 2012). Ela é conhecida como lesão de mancha branca e pode ser vista após 4 semanas de tratamento com aparelhos ortodônticos fixos (O'Reilly, Featherstone, 1987; Ogaard et al., 1988a; Tufekci et al., 2011; Lucchese, Gherlone, 2013), especialmente na região cervical e ao redor dos bráquetes (Gorelick et al., 1982), se medidas preventivas não forem instituídas (Featherstone, 2000) e dependendo das condições do hospedeiro (pH da saliva muito ácido, alimentação cariogênica) (Alves et al., 2010). Essas manchas brancas, ou lesões iniciais de esmalte estão presentes em pacientes que estão em tratamento ortodôntico (Jordan, 1998), principalmente com aparelhos fixos totais. Os dentes mais vulneráveis à desmineralização são os incisivos superiores e primeiros molares superiores permanentes. As três localizações de maior risco para a desmineralização são as áreas cervicais, as regiões localizadas abaixo das bandas e o esmalte adjacente aos bráquetes colados (O'Reilly, Featherstone, 1987; Jordan, LeBlanc, 2002). Ocorrem mudanças na flora bucal como a colonização aumentada de *Streptococcus mutans*, agente etiológico primário de aparecimento da

lesão de cárie, que tem a habilidade de degradar carboidratos rapidamente, formando grande quantidade de ácido e promovendo a diminuição de pH (Svensater et al., 2001; Papaioannou et al., 2007; Tufekci et al., 2011).

Existem vários métodos que podem ser utilizados para prevenir a desmineralização: técnica adequada de escovação, uso do fio dental, uso de pastas dentais com baixa concentração de flúor e alta frequência (Kirschneck et al., 2016), bochechos fluoretados (Benson et al., 2005; Chadwick et al., 2005), gel fluoretados aplicados pelo profissional, soluções antimicrobianas para bochecho, selamento de fóssulas e fissuras (Benham et al., 2009; Shinaishin et al., 2011), aplicação de vernizes fluoretados ao redor dos bráquetes (Knosel et al., 2012; Nalbantgil et al., 2013; Kirschneck et al., 2016), vernizes de clorexedina (Beyth et al., 2003), utilização de escovas elétricas, aparelhos com jatos de água para facilitar a remoção de biofilme ou ainda, limpeza periódica profissional. Entretanto, muitos destes métodos necessitam da colaboração do paciente, o que nem sempre é conseguida. Vale ressaltar também, a importância da orientação da dieta dos pacientes que se submetem ao tratamento ortodôntico para a prevenção de lesões de manchas brancas e cáries dentárias (Alves et al., 2010).

Um método para eliminação de micro-organismos, foi introduzido na medicina, nos anos 60, sendo inicialmente utilizado na área de Oncologia e mais recentemente na Odontologia, tendo várias denominações: terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), terapia fotoquímica, fototerapia, inativação fotodinâmica

(PDI, do inglês *Photodynamic Inactivation*), terapia de fotorradiação, terapia antimicrobiana, quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT, do inglês *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*), desinfecção fotodinâmica ou ainda, fotossensibilização letal (Wainwright et al., 1998; Takasaki et al., 2009; Rossoni et al., 2010; Gursoy et al., 2013; Pereira et al., 2013).

A PDI é empregada em Odontologia no controle de patógenos periodontais (Meisel, Kocher, 2005; Takasaki et al., 2009; Birang et al., 2015) e cariogênicos, fungos, vírus (Wilson, 2004), desinfecção de canal radicular (Muhammad et al., 2015; Susila et al., 2015), tratamento de algumas infecções bucais, tais como estomatite induzida pelo uso de prótese total (Zanin et al., 2005; Wood et al., 2006; Junqueira et al., 2009; Mima et al., 2012) e herpes labial (Schindl, Neumann, 1999; Marotti et al., 2009; Sperandio et al., 2009; Bello-Silva et al., 2010; Marotti et al., 2010) e pacientes imunossuprimidos (AIDS, pós quimioterapia) (Tardivo et al., 2006; Noro Filho et al., 2012; Kimura et al., 2015). Consiste em uma técnica terapêutica que utiliza a aplicação de um fotossensibilizador (F) tópico ou sistêmico que é ativado por uma luz visível com comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio. A exposição do fotossensibilizador à luz resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, tais como o oxigênio singlete e radicais livres, que podem causar danos ou morte celular (Ochsner, 1997; Lima et al., 2009; Gursoy et al., 2013). Deste modo, a PDI representa uma alternativa de tratamento antibacteriano, antifúngico e antiviral, especialmente para micro-organismos resistentes aos tratamentos

convencionais (Trindade et al., 2012). O seu uso como uma modalidade terapêutica para o tratamento de infecções microbianas localizadas, representa um campo promissor nas ciências da saúde (Jori et al., 2006).

O uso da PDI para o tratamento de infecções apresenta algumas importantes vantagens sobre os tratamentos terapêuticos convencionais pois, além de promover uma ação antimicrobiana efetiva sem o desenvolvimento de resistência microbiana, podem ser utilizadas repetidas doses sem a necessidade de limitação da dose total, não ocorrendo resistência com a repetição do tratamento (Wainwright, Crossley, 2002; Konopka, Goslinski, 2007; Tavares et al., 2010; Trindade et al., 2012).

A eritrosina tem sido muito utilizada na Odontologia para detecção de biofilme dentário e também como fotossensibilizador porque não é tóxica e tem a aprovação para o seu uso na clínica (Wood et al., 2006; Allaker, Douglas, 2009). A hematoporfirina IX é derivada da protoporfirina que é usada como fotossensibilizador na PDI. Entretanto sua aplicação é limitada devido à formação de agregados e da baixa solubilidade em meio fisiológico. Para estimular seu uso, foram feitas modificações na molécula da protoporfirina IX para aumentar sua solubilidade em meio fisiológico e estimular seu uso em PDI. Para isso foram inseridas hidroxilas nas posições vinílicas 3¹ e 8¹, a fim de produzir a hematoporfirina IX, em meio ácido e básico e para potencializar seu rendimento global (Rossi et al., 2008; Uchoa et al., 2010). O LED azul usado como fonte de luz na PDI deste trabalho, é comumente

utilizado nos consultórios odontológicos para polimerização de resinas compostas e mais recentemente para clareamento dentário, tendo algumas vantagens quando comparado ao laser, como o baixo custo e simplicidade de configuração e uso (Zanin et al., 2005; Wilson, Patterson, 2008). Além do mais, não existem trabalhos na literatura descrevendo os efeitos da PDI com a hematoporfirina e o LED azul em culturas planctônicas e biofilme de *Streptococcus mutans*.

A possibilidade de desenvolver um protocolo de fácil aplicação clínica, com vantagens sobre os tratamentos convencionais e de controle pelo profissional na atividade de micro-organismos sobre o esmalte dentário em portadores de aparelhos ortodônticos fixos, muito nos estimulou a buscar conhecimento para tal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi dividida em tópicos para facilitar a compreensão do leitor em: bráquetes ortodônticos, lesões de mancha branca; *Streptococcus mutans*; biofilme; inativação fotodinâmica; fotossensibilizador (eritrosina; hematoporfirina IX) e fonte de luz.

2.1 Bráquetes ortodônticos

Os bráquetes ortodônticos desempenham um papel importante na desmineralização do esmalte (Pandis et al., 2010) porque eles propiciam superfícies retentivas adicionais para as bactérias bucais e tornam mais difíceis os procedimentos tradicionais de higiene bucal (Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek, 2007). Como resultado do exposto, os aparelhos ortodônticos fixos podem mudar o meio ambiente bucal, aumentando o acúmulo de biofilme e de bactérias acidogênicas, alterando o fluxo e a capacidade tampão da saliva e diminuindo o pH (Chang et al., 1999; Tufekci et al., 2011).

As mudanças do meio ao redor dos bráquetes podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de

desmineralização do esmalte dentário e inflamação periodontal (O'Reilly, Featherstone, 1987; Atack et al., 1996; Ristic et al., 2007; Paschoal et al., 2015).

O material que o bráquete é feito pode ter um papel importante no grau de adesão bacteriana, na formação de biofilme, tanto quanto nos fatores predisponentes de desenvolvimento de cárie. A adesão inicial das bactérias às superfícies sólidas é devido, principalmente, às interações eletrostáticas e hidrofóbicas. As regiões com alta energia livre de superfície, atraem mais facilmente bactérias como *S. mutans* (van Dijk et al., 1987). Em um estudo de 1995 (Eliades et al., 1995), o aço inoxidável apresentou a maior tensão superficial crítica, podendo ser esperado que tenha uma maior capacidade de retenção de biofilme. Os bráquetes ortodônticos metálicos são responsabilizados por induzir mudanças específicas no meio ambiente bucal tais como, redução dos níveis de pH, maior acúmulo de biofilme e aumento da colonização por *S. mutans*. Porém, um trabalho realizado sobre as possíveis diferenças na afinidade inicial de adesão de bactérias em bráquetes metálicos, cerâmicos e plásticos, ao longo do tempo, foi inconclusivo (Papaioannou et al., 2007). Portanto, é difícil fazer uma avaliação clara, se realmente os bráquetes metálicos têm um maior efeito cariogênico quando comparados aos bráquetes plásticos ou cerâmicos (Fournier et al., 1998; Ahn et al., 2002).

Um importante fator para a colonização das superfícies duras existentes na cavidade bucal é a película adquirida que pode se formar tanto nas superfícies dentárias, como também na

mucosa bucal (Bradway et al., 1989), restaurações, próteses (Edgerton, Levine, 1992; Shahal et al., 1998), implantes de titânio (Edgerton et al., 1996) e aparelhos ortodônticos (Lee et al., 2001). Portanto, a adesão dos micro-organismos bucais à superfície dos bráquetes é influenciada em grande parte, pelas interações entre os componentes salivares da película e as propriedades dos diferentes micro-organismos, além dos padrões de aderência das bactérias sobre os diferentes tipos de bráquetes ortodônticos (Ahn et al., 2002).

O desenho complexo dos aparelhos ortodônticos fixos e acessórios utilizados como arcos e ligaduras elásticas e/ou metálicas, ligaduras elásticas em corrente (*alastics*) promovem o desenvolvimento e maior retenção de biofilme supragengival devido à redução da eficiência da autolimpeza e maior dificuldade de higiene bucal satisfatória (Smiech-Slomkowska, Jablonska-Zrobek, 2007). O biofilme supragengival forma um reservatório complexo de cepas de bactérias cariogênicas e é um fator predisponente para desmineralização do esmalte e cárie dentária (Ahn et al., 2007). A adesão microbiana e maturação do biofilme nos pacientes ortodônticos dependem de diferentes variáveis, tais como, o material e desenho dos bráquetes, proximidade entre o sulco gengival e bráquetes, área de superfície do esmalte vestibular em relação ao bráquete, posição dos dentes na arcada dentária, material que une os bráquetes aos arcos metálicos (ligaduras metálicas, elásticas) e principalmente, os hábitos individuais de higiene bucal e dieta (Papaioannou et al., 2007; Alves et al., 2010).

Alguns estudos provaram que a instalação de

aparelhos ortodônticos fixos favorece o aumento do número de estreptococos (Sandham et al., 1992; Pandis et al., 2010). Entre eles, *S. mutans* e *S. sobrinus* foram reconhecidos como principais microorganismos causadores da cárie dentária (Ahn et al., 2007).

Como a procura por bráquetes cerâmicos e plásticos cresceu muito na última década devido ao aumento da demanda por estética durante o tratamento ortodôntico, foi realizado um estudo (Jurela et al., 2013) para identificar as possíveis variações no padrão de adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus* sobre os diferentes tipos de bráquetes, a fim de diminuir o risco de possíveis efeitos secundários de tal terapia. Os pesquisadores concluíram que o número de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* e *S. sobrinus* em amostras de saliva estimulada não foi significativamente diferente entre os pacientes com bráquetes de aço inoxidável e de plástico.

Entre os diferentes tipos de bráquetes, os bráquetes autoligados (bráquetes que dispensam os amarrilhos elásticos que os prendem ao arco, pois possuem um dispositivo que abre e fecha, prendendo o fio em seu interior) deveriam ter melhores resultados no quesito saúde periodontal devido à ausência de ligaduras e formato com menos retenções. No entanto, alguns estudos (Pandis et al., 2008; Garcez et al., 2011) mencionam que, na realidade, esta vantagem teórica pode ser eliminada pois os bráquetes autoligados possuem mecanismos de abertura e fechamento que propiciam locais adicionais de retenção de biofilme e acúmulo de tártaro (Ogaard et al., 1988a; Forsberg et al., 1991; Attin et al., 2005; Ahn et al., 2007; Papaioannou et al., 2007; Ristic et al., 2007; Alves de Souza et al.,

2008; Pandis et al., 2010; Jurela et al., 2013).

Alguns pesquisadores concluíram que as ligaduras elásticas dos bráquetes convencionais causam um maior acúmulo de biofilme e inflamação periodontal quando comparadas aos bráquetes autoligados (Turkkahraman et al., 2005; Pellegrini et al., 2009; Lara-Carrillo et al., 2010), enquanto outros autores reportaram não haver diferença significativa (Pandis et al., 2010). Uzener e colaboradores reportaram não haver diferença significativa entre os bráquetes metálicos convencionais com ligaduras metálicas e bráquetes metálicos autoligados em relação à colonização microbiana e condição periodontal (Uzuner et al., 2014).

2.2 Lesão de mancha branca

A descalcificação de esmalte ou lesão de mancha branca é um problema frequente encontrado na prática ortodôntica, podendo acometer até 96% dos pacientes ortodônticos (Gorelick et al., 1982; Mizrahi, 1982; Mitchell, 1992; Chang et al., 1997; Ogaard et al., 2001; Chapman et al., 2010; Tufekci et al., 2011; Julien et al., 2013), apesar de ser um assunto muito estudado na literatura (Jordan, 1998; Benham et al., 2009; Guzman-Armstrong et al., 2010; Chen et al., 2013; Kirschneck et al., 2016) para a sua prevenção.

As lesões de mancha branca desenvolvem-se em áreas associadas aos aparelhos ortodônticos, tais como nas proximidades

das bandas, bráquetes, arcos, ligaduras metálicas e elásticas. Além disso, a maioria dos pacientes ortodônticos são adolescentes com higiene bucal deficiente e dieta cariogênica, o que possibilita o acúmulo de biofilme e favorece a desmineralização do esmalte (Gorelick et al., 1982).

O tratamento ortodôntico é associado ao aumento da desmineralização do esmalte devido ao acúmulo de biofilme ao redor dos bráquetes (Gwinnett, Ceen, 1979) e do desenvolvimento de um ambiente bacteriano mais cariogênico (Corbett et al., 1981; Mattingly et al., 1983), o que causa uma mudança quantitativa e qualitativa do biofilme (Pender, 1986). Após a colagem dos bráquetes, o lugar mais frequente de ocorrer a desmineralização em pacientes ortodônticos é o terço médio e cervical das faces vestibulares dos dentes (Mizrahi, 1982), deslocando assim a tendência de desmineralização das faces interproximais para as superfícies vestibulares dos dentes, bem como das regiões posteriores para as anteriores da boca (Zachrisson, Zachrisson, 1971; Zachrisson, 1975).

O aumento de nichos de retenção de biofilme criados pelos aparelhos ortodônticos, torna a higiene bucal um grande desafio, resultando em elevados níveis de *S. mutans* (Scheie et al., 1984) e diminuição do pH do biofilme (Chatterjee, Kleinberg, 1979).

As lesões de mancha branca são lesões de cárie iniciais de superfície lisa que ocorrem quando o ambiente ácido promove uma desmineralização subsuperficial. Sob uma superfície hipermineralizada intacta, o conteúdo mineral abaixo do corpo da lesão produz um índice de refração alterado, relativo ao esmalte

sadio, resultando clinicamente em uma antiestética lesão branca (Bensen, 2008).

A etiologia das lesões de mancha branca, pode portanto, estar vinculada a um efeito colateral negativo dos aparelhos ortodônticos com bráquetes, extensamente descrito na literatura (Ogaard et al., 1988a; Melrose et al., 1996; Benson et al., 1999; Chapman et al., 2010; Tufekci et al., 2011; Julien et al., 2013). Além do problema estético, especialmente nos dentes anteriores (Knosel et al., 2007), as lesões de mancha branca devem ser consideradas um estágio inicial da doença cárie, caracterizado por uma camada subsuperficial de esmalte com uma acentuada desmineralização (Palamara et al., 1986). É um processo que ocorre rapidamente (Ogaard et al., 1988b), dentro de 4 semanas (Gwinnett, Ceen, 1979), podendo piorar o seu estado se não forem implementadas medidas preventivas (Featherstone, 2000).

Acreditava-se que as lesões de mancha branca iriam se recuperar com a remineralização natural através da saliva, após o aparelho ortodôntico ser removido e restaurada a higiene bucal (Ogaard et al., 1988b). Entretanto, a simples remoção do biofilme não é suficiente para se conseguir a completa reparação das lesões de mancha branca, sendo que alguns pontos secundários permanecem após a retirada dos aparelhos e podem durar de 5 a 12 anos (Ogaard, 1989; Shungin et al., 2010). A remineralização natural com a saliva, que envolve ganho mineral através da camada superficial das lesões de mancha branca, tem pouca melhora na estética e nas propriedades estruturais nas lesões mais profundas (Cochrane et al., 2010).

O dia da retirada do aparelho fixo é aguardado com muita expectativa pelo paciente, pais e ortodontista. Entretanto, as lesões de mancha branca podem diminuir a qualidade dos resultados do tratamento ortodôntico e causar frustração nos pacientes, pais e profissionais da Odontologia envolvidos no tratamento (Maxfield et al., 2012).

Os autores de uma revisão sistemática sobre o efeito dos agentes remineralizantes usados atualmente nas lesões de mancha branca, após o tratamento ortodôntico, concluíram que não existem evidências confiáveis que suportem a efetividade dos agentes remineralizantes atuais para o tratamento pós ortodôntico destas lesões (Chen et al., 2013). E ainda, a frequência do aparecimento das lesões de mancha branca nos pacientes ortodônticos, aponta a necessidade de reavaliação dos protocolos de prevenção (Maxfield et al., 2012). Portanto, existe a carência de meios efetivos que evitem o aparecimento de tais lesões durante o tratamento ortodôntico e a inativação fotodinâmica poderá ser utilizada para este fim, se forem feitos estudos a este respeito.

2.3 *Streptococcus mutans*

Após ter comprovado seu potencial de indução de cárie em modelos animais, considerável número de investigações encontra-se descrito na literatura (Fitzgerald et al., 1960; Fitzgerald,

Keyes, 1960). A associação de *S. mutans* com a cárie dentária foi relatada pela primeira vez por Clarke (Clarke, 1924), que isolou o micro-organismo de lesões de cárie.

Em um artigo de revisão sobre a terapia fotodinâmica antibacteriana para cárie dentária, os autores afirmam que nos 18 artigos analisados, *S. mutans* foi a bactéria mais estudada, pois é a principal espécie relacionada à cárie dentária (Nagata et al., 2012).

Os principais micro-organismos associados ao desenvolvimento inicial da cárie dentária são estreptococos do grupo *mutans* (particularmente, *S. mutans* e *S. sobrinus*) e as espécies de lactobacilos (van Houte, 1994), estreptococos do grupo *salivarius* (*S. salivarius*, *S. vestibularis*) e *S. parasanguinis*, assim também como lactobacilos (*L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*) e espécies *Veillonella* (*V. atypica*, *V. dispar*, *V. parvula*) (Marsh, 2003; Gross et al., 2010; Marsh et al., 2011; Gross et al., 2012). Aproximadamente 20% das bactérias bucais são estreptococos (Schachteie et al., 2007). Para uma eficiente colonização das superfícies, estas bactérias necessitam, primeiramente, aderir-se aos dentes e formar o biofilme. Neste processo inicial os estreptococos do grupo *mutans* (especialmente *S. mutans*) assumem a parte essencial através da geração de polímeros de glucano enquanto outros estreptococos bucais participam (Nishimura et al., 2012; Koo et al., 2013).

S. mutans são bactérias Gram-positivas, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase e oxidase negativos e colonizam a

maioria da população humana do mundo (Becker et al., 2002; Mitchell, 2003). Eles medem de 0,5 a 0,75 μm de diâmetro, são agrupados aos pares ou em cadeias, habitando as superfícies dos dentes, com capacidade de produzir um ambiente ácido e de formar um biofilme espesso. Requerem meios nutricionalmente ricos, com sangue ou soro para o seu crescimento, sendo 37 °C a sua temperatura ótima de crescimento e o pH na faixa de 7,4 a 7,6.(Gold et al., 1973; Grande et al., 2015; Zvanych et al., 2015). O crescimento é estimulado pela presença de CO₂ (crescimento capnofílico). Estas bactérias formam colônias pequenas, fortemente aderidas ao meio de cultura e com bordas irregulares quando em meio de cultura Ágar Mitis Salivarius (Gold et al., 1973).

A habilidade de *S. mutans* formar biofilme é devido, principalmente, à secreção de glucosiltransferases que formam polissacarídeos. Estes possuem propriedades de adesão nas superfícies duras e são um fator de virulência significativa no início da cárie dentária, em superfícies lisas do esmalte e do cimento (Hamada, Slade, 1980; Loesche, 1986; Almeida et al., 2002; Kalesinskas et al., 2014). As enzimas extracelulares catalizam a transferência de glucosil a partir da sacarose para uma cadeia crescente de glucano. A colônia de bactéria produz ácidos metabólicos que podem desmineralizar a superfície dentária (Devulapalle et al., 1997).

S. mutans é considerado o principal patógeno causador da cárie dentária humana (Loesche, 1986). Normalmente existe como um membro regular da comunidade do biofilme dentário maduro,

entretanto sob certas circunstâncias, pode tornar-se dominante e causar a cárie dentária (Marsh, 2003). É particularmente eficaz na produção de ácidos provenientes da dieta rica em carboidratos, sendo tolerante aos ácidos e podendo crescer e continuar a realizar a glicólise em valores baixos de pH. Esta diminuição do pH do biofilme bucal provoca danos significativos aos tecidos mineralizados dos dentes, podendo causar a cárie dentária se medidas preventivas não forem introduzidas (Schachtele, Jensen, 1982; Loesche, 1986; Banas, 2004).

S. mutans são frequentemente isolados das cavidades de lesões de cárie, induzem a formação de cárie em animais alimentados com uma dieta rica em sacarose, são altamente acidogênicos e acidúricos (Hamada, Slade, 1980; Gorelick et al., 1982). Essas bactérias são capazes de produzir antígenos de superfície I/II e glucano que é insolúvel em água, promovendo a adesão à superfície dentária e à outras bactérias (Tavares et al., 2010). Uma revisão sistemática da literatura realizada por Tanzer et al. (Tanzer et al., 2001), confirma o papel principal de *S. mutans* no aparecimento da cárie dentária em superfícies de esmalte e raiz.

2.4 Biofilme

O biofilme dentário é formado pela agregação de micro-organismos mantidos juntos por uma matriz polissacarídea

(Ahn et al., 2008). Podem ser encontradas mais de 500 espécies bacterianas nesse biofilme, ocorrendo um alto nível de interação entre elas, que são essenciais para o desenvolvimento e maturação do mesmo. A interação inclui contato físico, trocas metabólicas, pequenos sinais de comunicação mediada por molécula e troca de material genético, que beneficia o micro-organismo, aumenta a sua resistência à defesa do hospedeiro e potencializa a sua virulência (Mahajan et al., 2013).

O biofilme é uma comunidade de bactérias bucais unidas por uma matriz de polissacarídeos aderidas à superfície dentária (Mattingly et al., 1983; Marsh et al., 2011). Ele contém glucano insolúvel em água (10 a 20% de peso seco), frutano (1 a 2 % de peso seco), proteínas bacterianas e salivares (~40% do peso seco), variável quantidade de lipídios, cálcio, fósforo, magnésio, fluoreto e em condições *in situ*, água até 80% (Bowen, Koo, 2011). Estão presentes no biofilme dentário: polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, glicoproteínas salivares, proteínas, pigmentos e restos alimentares (Jorge, 2012). A complexidade da microbiota do biofilme dentário revela grande diversidade e os estreptococos do grupo *mutans* (alfa-hemolíticos) são reconhecidos como os principais produtores da matriz rica em polissacarídeos extracelulares (Núñez et al., 2013). Estes são compostos principalmente de glucanos insolúveis em água, derivados da interação da glucosiltransferase com a sacarose e hidrolisados do amido (como a maltose). É importante salientar que a densidade da matriz polissacarídea aumenta com a exposição do biofilme

bacteriano à sacarose. Na verdade, o amido, que também está presente nos alimentos, acelera este processo (Klein et al., 2010).

Os glucanos são polissacarídeos compostos pela repetição de unidades de glicose que são sintetizadas a partir da sacarose pela ação enzimática da glucosiltransferase e podem ou não ser solúveis em água (Paes Leme et al., 2006; Bowen, Koo, 2011; Nishimura et al., 2012). Eles servem como uma matriz para o biofilme com várias funções: promovem a aderência e acúmulo adicional bacteriano sobre o dente; fornecem uma carcaça estrutural para o biofilme; e aumentam a acidogenicidade da matriz do biofilme (Paes Leme et al., 2006; Bowen, Koo, 2011).

A formação do biofilme na superfície dentária é um processo com vários estágios, segundo Bowen e Koo (2011). No primeiro estágio, as proteínas salivares são seletivamente aderidas à hidroxiapatita do esmalte, incluindo as proteínas ricas em prolina, -amilase, lisozima, histatina, peroxidase, estatina e mucina. Esta camada inicial de material é denominada de película adquirida, na qual as bactérias e suas glucosiltransferases aderem-se.

No segundo estágio, as enzimas glucosiltransferases C secretadas por *S. mutans*, são aderidas e inseridas na película e promovem a adesão da bactéria e proteínas glucosiltransferases B. Vale salientar que as enzimas glucosiltransferases B produzidas por *S. mutans* podem também se aderir em outras superfícies bacterianas, envolvendo bactérias que não expressam a glucosiltransferase (por exemplo: *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*).

No estágio 3, as enzimas glucosiltransferases B e C de

S. mutans aderidas às superfícies, pronta e rapidamente, utilizam a sacarose para gerar glucanos insolúveis e parcialmente solúveis em água. As enzimas glucosiltransferases D contribuem neste processo sintetizando os glucanos solúveis em água, que são utilizados como iniciadores para glucosiltransferases B, aumentando, assim, toda a produção de polissacarídeos extracelulares. Em paralelo, se o amido está disponível no microambiente, pode ser digerido pela α -amilase, gerando maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos.

Durante o estágio 4, as proteínas de ligação e glucanos de *S. mutans*, tanto quanto outros agregados de bactérias ligados às moléculas de glucano, formam uma adesão bacteriana mais forte e conseqüentemente, o desenvolvimento de microcolônias na superfície do esmalte dentário. Além disso, as glucosiltransferases secretadas por outras espécies estreptocócicas, acompanhadas pelas de *S. mutans* auxiliam na síntese de glucanos, a partir da sacarose e contribuem para a maturação do biofilme (Bowen, Koo, 2011).

2.5 Inativação fotodinâmica

Há uma crescente necessidade de abordagens e alternativas inovadoras para a redução da população bacteriana e uma solução com muito potencial é a Inativação Fotodinâmica (PDI). É um processo terapêutico, envolvendo a combinação de uma luz não prejudicial, no correto comprimento de onda e agentes fotossensíveis

não tóxicos, chamados fotossensibilizadores (Wainwright, 1998). O processo fotodinâmico é composto por um protocolo de dois passos, no qual as células alvo são expostas a um fotossensibilizador e irradiadas com uma luz com efeito não térmico ou sem efeito térmico, no comprimento de onda com máxima absorção para o fotossensibilizador utilizado. Com isto ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete e radicais livres que podem danificar os componentes essenciais das células, tais como a membrana plasmática e DNA, ou modificar as atividades metabólicas de uma maneira irreversível, causando, assim, a morte celular seletiva (Figura 1) (Ochsner, 1997; Lima et al., 2009; Gursoy et al., 2013).

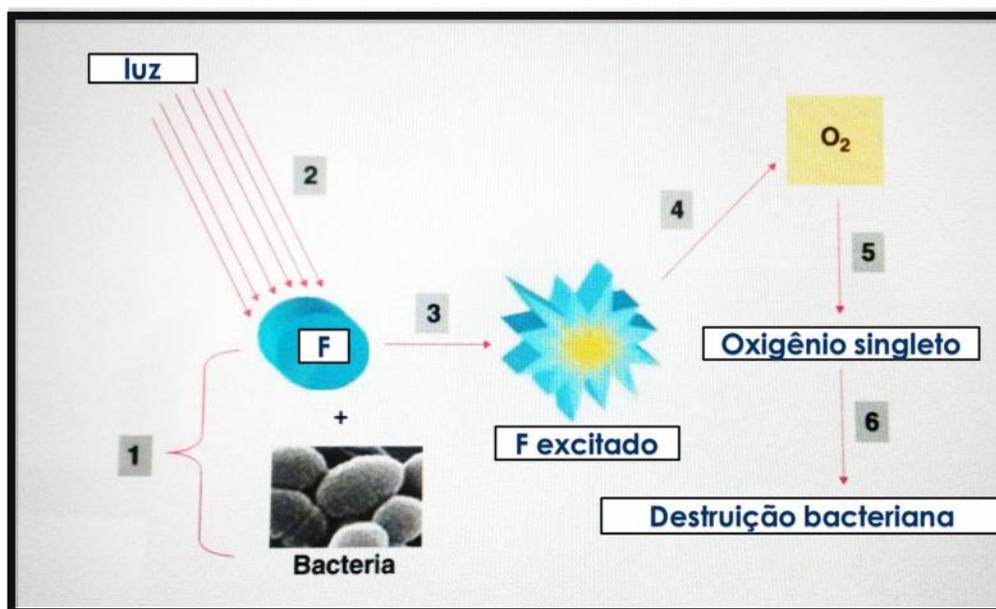


Figura 1 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica. Um fotossensibilizador é associado a um micro-organismo (1), é exposto a uma fonte de luz de apropriado comprimento de onda (2) e é ativado a um estágio de excitação (3). O fotossensibilizador transfere energia da luz para o oxigênio molecular (4), gerando oxigênio singlete e radicais livres (5) que são citotóxicos para as células (6) (Soukos, Goodson, 2011).

Existem duas classes de espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* – *ROS*), uma criada através da transferência de elétrons (reação do tipo I) e a outra pela transferência de energia (reação do tipo II). A transferência do elétron para o O₂ pode produzir superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Na reação do tipo II, a transferência de energia para o O₂ resulta em formação de oxigênio singleto (¹O₂) (Kübler, 2005; Wilson, Patterson, 2008). Os tipos I e II dependem de vários parâmetros, sendo os mais importantes, o fotossensibilizador usado e a concentração do oxigênio (Ochsner, 1997).

Quando as células que serão atingidas com esta técnica são micro-organismos patogênicos é denominada inativação fotodinâmica (PDI) (O'Riordan et al., 2006) ou terapia antimicrobiana (a-PDT, do inglês *antimicrobial Photodynamic Therapy*), fotossensibilização letal (Wilson, 2004) ou na área odontológica desinfecção foto-ativada (PAD, do inglês *Photo-Activated Disinfection*) (Bergmans et al., 2008). É uma técnica localizada, não térmica e não invasiva, utilizada para diminuir a contaminação de determinados micro-organismos nas infecções bucais mas não causar danos às células humanas (Suci et al., 2010; Baptista et al., 2012; Longo et al., 2012). Alguns estudos ilustram que a aPDT tem um forte efeito em bactérias bucais Gram-positivas e negativas, quando são usados diferentes fotossensibilizadores e fontes de luz (George et al., 2009; Mang et al., 2012).

A eficiência da PDI é dependente de vários fatores, tais como comprimento de onda e sua interação com o

fotossensibilizador, potência de saída, duração do tempo de irradiação, diâmetro do feixe, modo de operação da fonte de luz (contínua ou pulsada) e convergência do feixe (focado ou difuso) (Wilson, 1993).

2.6 Fotossensibilizador

Do ponto de vista da interação entre bactéria e fotossensibilizador, a efetividade da terapia fotodinâmica está relacionada a três fatores principais: a) capacidade do fotossensibilizador interagir com a membrana bacteriana; b) capacidade de penetração e ação do fotossensibilizador dentro da célula, e c) formação de espécies reativas de oxigênio ao redor da célula bacteriana, através da iluminação do fotossensibilizador (Nagata et al., 2012).

Os fotossensibilizadores devem ter as seguintes propriedades: elevado coeficiente de absorção na região do espectro de excitação da luz; um estado tripleto de energia apropriada para permitir transferência de energia suficiente para o oxigênio no estado fundamental; alto rendimento quântico para o estado tripleto e alto ciclo de vida no estado tripleto, pois a eficiência do fotossensibilizador é dependente das propriedades fotofísicas em seu menor estado tripleto de excitação e alta fotoestabilidade (DeRosa, Crutchley, 2002).

O mecanismo de ligação da membrana celular é diferente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nitzan et al., 1992). Esta diferença pode ser explicada pelas variações estruturais de suas paredes celulares, hidrofobicidade e efeitos de carga do fotossensibilizadores. As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular complexa formada por bi-camadas lipídicas que funcionam como uma barreira física e funcional entre as células e o meio ambiente, enquanto que as células Gram-positivas (a exemplo de *S. mutans*) têm uma membrana delgada que é relativamente permeável (Minnock et al., 2000; Maisch et al., 2004; Maisch, 2007; Nagata et al., 2012). É possível que esta camada porosa de peptidoglicanos e ácidos lipoteicoicos da parede celular das espécies Gram-positivas permita a difusão do fotossensibilizador, dando assim amplo acesso à membrana citoplasmática (Konopka, Goslinski, 2007; Dai et al., 2009).

Além das diferenças estruturais citadas acima, a carga do fotossensibilizador pode influenciar na inativação de espécimes Gram-positivos e Gram-negativos. Em geral, é aceito que no pH fisiológico, compostos neutros ou aniônicos, tais como rosa bengala, eritrosina, eosina, derivados da porfirina (*Photofrin*®, *Photosan*® e *Photogem*®) ligam-se eficientemente e inativam as bactérias Gram-positivas. Entretanto, nas bactérias Gram-negativas eles se ligam de certa maneira à membrana externa, mas não as inativam tão eficientemente após a iluminação. Em contraste, os fotossensibilizadores catiônicos, como azul de metileno e azul de toluidina são capazes de inativar bactérias Gram-positivas e negativas

(Nagata et al., 2012).

Um outro mecanismo da terapia fotodinâmica é a penetração do fotossensibilizador e ação dentro da célula. Isto é possível devido a hidrofiliidade e solubilidade dos corantes, que determinam a rapidez que eles cruzam a parede celular (Usacheva et al., 2001). A bactéria Gram-positiva protege a membrana citoplasmática com uma parede espessa, multicamada de peptidoglicano que bloqueia a passagem de componentes hidrofóbicos devido a presença de aminoácidos e açúcares no interior da membrana celular. Portanto, somente componentes hidrofílicos penetram nesta parede (Schaechter et al., 2002).

Em geral, os corantes podem ter um caráter mais hidrofílico ou hidrofóbico, ou ainda pode ser anfifílico. A literatura considera que rosa bengala, azul de metileno e azul de toluidina apresentam caráter anfifílico, sendo que rosa bengala mais hidrofóbico, enquanto que o azul de metileno e azul de toluidina mais hidrofílico (Wainwright, Giddens, 2003). A eritrosina é considerada hidrofílica e a ftalocianina e os derivados da porfirina (*Photofrin*®, *Photosan*® e *Photogem*®), hidrofóbicos. Quando as bactérias estudadas forem Gram-positivas, os melhores resultados esperados serão com os fotossensibilizadores hidrofílicos. Considerando o fato de que a eritrosina é o fotossensibilizador mais hidrofílico e que a bactéria Gram-positiva permite maior penetração deste corante, parece ser o mais indicado para a PDI (Nagata et al., 2012).

Além da capacidade do fotossensibilizador se ligar à membrana bacteriana e penetrar em seu interior, há relatos de

inativação de bactérias em que o fotossensibilizador não penetra ou nem entra em contato com as células para ser efetivo. De acordo com alguns autores, se uma quantidade suficiente de oxigênio singlete pode ser gerada próxima às membranas externas das bactérias, será o suficiente para causar danos às estruturas vitais (Dahl et al., 1987).

O tempo de vida do oxigênio singlete é altamente dependente do meio ambiente e quando em solução, varia com a natureza do solvente. Em água, seu tempo de vida é por volta de 4 μs e em sistemas biológicos, extremamente menor, menos de 0,04 μs (Ochsner, 1997) o que reduz seu raio de ação para, aproximadamente, 0,02 μs (Dougherty et al., 1998). A quantidade de oxigênio singlete gerado pelas reações fotodinâmicas é muito importante e varia de acordo com cada corante. Esta quantidade é medida pelo rendimento quântico do oxigênio singlete. Autores relatam a produção de oxigênio e o menor ao maior rendimento quântico para os derivados da ftalocianina (0,56), azul de metileno (0,59), azul de toluidina (0,60), eritrosina (0,63), rosa bengala (0,76) e derivados da hematoporfirina, como o *Photofrin*® (0,83) (DeRosa, Crutchley, 2002). Quanto maior for o rendimento quântico, maior a produção de oxigênio singlete e, conseqüente, maior a eficácia fotodinâmica (Nagata et al., 2012).

O uso de fotossensibilizadores com baixa concentração resulta em baixa toxicidade, alta solubilidade e prevenção de manchamento dentário (Nagata et al., 2012), de restaurações estéticas e/ou de bráquetes estéticos.

Portanto, a escolha do fotossensibilizador apropriado

deve considerar todos os aspectos citados acima, mas o mais importante nesta escolha parece ser a característica estrutural da membrana bacteriana alvo (Gram-positiva ou negativa) para que o corante possa ser mais efetivo (Nagata et al., 2012).

2.6.1 Eritrosina

A eritrosina é um composto cíclico do grupo xanteno que contem três anéis aromáticos, em um arranjo linear e um átomo de oxigênio no centro do anel (Figura 2). Absorve luz no espectro visível (450-550 nm) (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006) e sua capacidade de iniciar reações fotoquímicas está bem documentada (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006; Costa et al., 2010; Pereira et al., 2013; Habiboallah et al., 2014; Yassunaka et al., 2015).

Eritrosina ou tetraiodofluoresceína (Vermelho ácido 51) é um corante rosa-cereja, cuja fórmula química é $C_{20}H_8I_4O_5$. Normalmente comercializada na forma do sal sódico, é um derivado da fluorona. É usada principalmente como corante de alimentos, em tintas de impressão e como corante biológico. Na área odontológica é utilizada na produção de soluções e pastilhas para evidenciação de biofilme. A eritrosina apresenta vantagens sobre os outros fotossensibilizadores em desenvolvimento, pois é utilizada com frequência para prevenção de cárie e doenças periodontais, e seu uso na cavidade bucal tem total aprovação dos órgãos da saúde (Metcalf

et al., 2006; Wood et al., 2006).

A eritrosina é um fotossensibilizador aniônico e hidrofílico que é muito utilizado na inativação fotodinâmica de bactérias Gram-positivas (Metcalf et al., 2006; Costa et al., 2010; Lee et al., 2012; Nagata et al., 2012; Pereira et al., 2013). No entanto, pesquisadores têm mostrado resultados promissores em bactérias Gram-negativas (Habiboallah et al., 2014; Silva et al., 2015).

Costa et al. (2010) realizaram um estudo pioneiro de inativação fotodinâmica em cultura planctônica de *S. mutans* utilizando eritrosina, rosa bengala e LED azul e obtiveram redução bacteriana de 6,86 log₁₀ com o fotossensibilizador rosa bengala e 5,16 log₁₀ com a eritrosina, quando comparado com o grupo sem tratamento, nos parâmetros utilizados. A concentração dos fotossensibilizadores foi de 2 µM, a menor concentração da eritrosina encontrada na literatura para inativação de cultura planctônica. Outros autores utilizaram outras concentrações, variando de 5 µM (Pereira et al., 2013) na inativação de biofilme de *S. mutans* e *S. sanguinis*, 22 µM para *S. mutans* (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006) e *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Habiboallah et al., 2014). Entretanto, no estudo de Rossoni e colaboradores (2010) que comparou a eficácia de dois fotossensibilizadores, eritrosina e rosa bengala a 50 µM, na inativação de cepas enterobacterianas, não obteve redução de UFCs/mL com a eritrosina. As cepas estudadas foram sensíveis à terapia fotodinâmica com o rosa bengala, nos parâmetros utilizados

no trabalho.

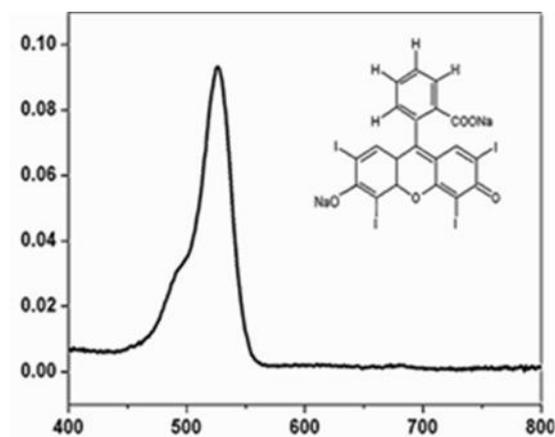


Figura 2 - Estrutura química e espectro de absorção do fotossensibilizador eritrosina (Costa et al., 2011).

2.6.2 Hematoporfirina IX

Os derivados da hematoporfirina, juntamente com suas marcas comerciais *Photofrin*[®], *Photosan*[®], *Photogem*[®] e *Photocarcinorin*[®] têm um importante lugar na história na fototerapia dos tumores. Eles formaram a primeira geração de fotossensibilizadores. As primeiras observações da PDT foram feitas com estes materiais e a primeira autorização para uso clínico foi feita em favor do *Photofrin*[®] (Bonnett, 1995).

A hematoporfirina IX (H) é derivada da protoporfirina que ocorre naturalmente na hemoglobina, citocromo c e outras

moléculas biologicamente relevantes. No entanto, a aplicação da H é limitada devido à formação de agregados e da baixa solubilidade em meio fisiológico. Algumas modificações foram feitas por alguns pesquisadores, para melhorar a solubilidade, aumentar o rendimento global em até 70% e estimular seu uso na PDI. Para isto foram inseridos grupos hidroxilas nas posições vinílicas 3¹ e 8¹ para produzir a hematoporfirina IX (C₃₄H₃₆N₄O₆Na₂), na forma de sal de sódio (Rossi et al., 2008; Uchoa et al., 2010).

As porfirinas são heterociclos aromáticos formados por quatro unidades pirrólicas unidas. Apresentam bandas de absorção na região do visível e baixa solubilidade em solventes orgânicos e água. Estes compostos possuem, em geral, uma banda de maior intensidade na região de 400 nm, denominada banda soret ou banda B (Figura 3), e outras de menor intensidade localizadas em maiores comprimentos de onda (500-650 nm - bandas Q) (Bonnett, 2000). Os derivados da hematoporfirina, juntamente com suas marcas comerciais *Photofrin*®, *Photosan*®, *Photogem*®, são fotossensibilizadores hidrofóbicos (Nagata et. al, 2012).

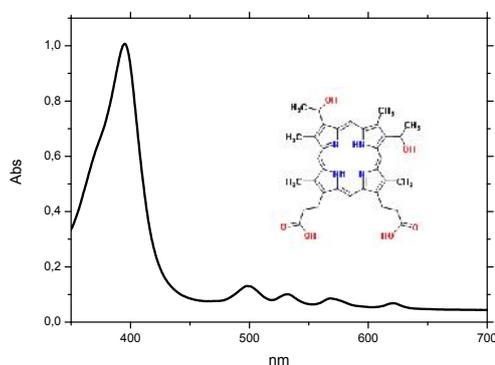


Figura 3 - Estrutura química e espectro de absorção do fotossensibilizador hematoporfirina IX (Uchoa et al., 2010).

2.7 Fonte de luz

O requisito básico das fontes de luz na PDI é que elas devem coincidir com o espectro de ativação (espectro de absorção eletrônico) do fotossensibilizador, geralmente o comprimento de onda de pico mais longo. A literatura apresenta três classes principais de fontes de luz para uso clínico em PDI: o laser, LED e lâmpadas halógenas. O laser tem algumas vantagens como a monocromaticidade e alta eficiência de acoplamento em fibras ópticas individuais endoscópicas (maior que 90%), alta potência e entrega de luz intersticial, entretanto apresenta custo mais alto. O laser de diodo é um dos de menor custo entre os sistemas laser. É muito prático e confiável, mas ele tem um comprimento de onda único e requer uma unidade separada para cada fotossensibilizador, devido aos diferentes comprimentos de onda (Wilson, Patterson, 2008).

O LED tornou-se uma tecnologia muito utilizada na PDI nos últimos anos, particularmente para a irradiação de superfícies teciduais de fácil acesso. A principal vantagem do LED sobre o laser ou fonte de laser de diodo é o custo baixo e a fácil configuração dos dispositivos em diferentes geometrias de irradiação. O acoplamento do LED com fibras ópticas individuais tem sido demonstrado com eficiência de 25 a 50% em uma potência baixa e estes dispositivos de LED e fibra podem tornar-se uma opção para futuras aplicações clínicas. Como o laser de diodo, o LED tem um comprimento de onda

de saída fixo, mas como o custo por Watt é muito menor, compensa ter diferentes fontes para cada fotossensibilizador (Wilson, Patterson, 2008).

A lâmpada halógena filtrada tem a vantagem de poder ser espectralmente filtrada para coincidir com qualquer F, contudo não pode ser acoplada a um feixe de fibra óptica ou guia de luz e causa aquecimento. É uma fonte de banda larga (25-30nm) como o LED, sua potência de saída é menor quando comparada ao laser e sua eficiência é de 50%, como o LED (Wilson, Patterson, 2008).

O laser e a lâmpada com filamento de tungstênio produzem altas doses de energia. Este aspecto deve ser analisado com cuidado quando usado em dentes, pois o aumento da temperatura na dentina e polpa pode causar mudanças irreversíveis a esses tecidos. A literatura mostra que um aumento da temperatura de 2,2 °C não promove efeito adverso, no entanto, um aumento de 5,5 °C resultou em necrose pulpar em 15% dos casos. Um aumento por volta de 11 °C, seguramente ocorre a morte pulpar (Zach, Cohen, 1965). O uso de LED não mostrou aumento marcante de temperatura após 45 e 60 s de exposição, enquanto a lâmpada halógena causou mudança de até 5 °C (Weerakoon et al., 2002; Silva et al., 2005).

Muitos pesquisadores têm usado LED vermelho (Zanin et al., 2006; Bevilacqua et al., 2007; Giusti et al., 2008; Lima et al., 2009) na terapia fotodinâmica antibacteriana para a cárie dentária que corresponde a uma penetração da luz de 0,5 cm (630 nm) para 1,5 cm (700 nm) (Salva, 2002). No entanto, na cárie dentária o cromóforo hemoglobina pode estar ausente, e

consequentemente, a luz azul e verde podem não apresentar efeito de interferência. Assim, o uso de luz azul começou a ser estudado (Maisch et al., 2009; Costa et al., 2010; Pereira et al., 2013; Tonon et al., 2015) e novos estudos são necessários para um melhor entendimento da interferência tecidual na eficiência da PDI (Nagata et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inativação fotodinâmica com os fotossensibilizadores eritrosina e hematoporfirina IX (experimental), usando LED azul em células planctônicas e em biofilme de *Streptococcus mutans* (UA 159) sobre bráquetes metálicos ou cerâmicos colados, em espécimes de dentes humanos. Foram testadas, também, diferentes concentrações da hematoporfirina IX.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP; CAAE: 44832215.0.0000.0077) devido à utilização de dentes humanos indicados para extração. Os documentos referentes à coleta dos dentes doados e aprovação do estudo encontram-se nos: (ANEXOS A e B).

4.2 Delineamento do estudo

Primeiramente foi testada a susceptibilidade de *S. mutans* em cultura planctônica utilizando os fotossensibilizadores eritrosina e hematoporfirina IX (experimental), e LED azul. Foi avaliada a efetividade da hematoporfirina e da eritrosina na eliminação da bactéria estudada, em diferentes concentrações e dosimetrias, utilizando-se a inativação fotodinâmica.

Na segunda parte do trabalho foi realizada a formação

do biofilme de *S. mutans* sobre espécimes formados por dentes humanos e bráquetes metálicos ou cerâmicos e pesquisada a inativação fotodinâmica, na presença de LED azul, com a hematoporfirina IX, que foi o fotossensibilizador que demonstrou o melhor resultado na primeira parte do estudo.

4.3 Cepas de micro-organismos

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159) mantida em freezer -80 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para ativação desse micro-organismo, a cepa de *S. mutans* foi cultivada em ágar Infuso Cérebro Coração (BHI) (Difco, Detroit, EUA), de onde foram removidos os micro-organismos para fazer o caldo e ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (0,2 UI por mL de meio) e de 15% de sacarose, para verificar se a cultura estava pura, por 24 h a 37 °C em atmosfera de microaerofilia (5% de CO₂) (Figura 4) .



Figura 4 – Estufa a 5% de CO₂.

4.4 Preparo da suspensão padronizada de *S. mutans*

S. mutans foi cultivado em caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, India) acrescido de 15% de sacarose, incubado a 37 °C em atmosfera de microaerofilia (5% de CO₂) por 24 h. Em seguida, as suspensões microbianas foram centrifugadas (4700 *xg* por 5 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de solução fisiológica (salina 0,85%). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada por meio de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 10⁷ micro-organismos/mL. Os valores do comprimento de onda foram 398 nm, enquanto que a densidade óptica foi de 0,560.

A metodologia das células planctônicas foi proposta por Costa e colaboradores (Costa et al., 2010) com algumas modificações.

4.5 Inativação fotodinâmica em células planctônicas de *S. mutans* em presença de eritrosina ou hematoporfirina 10 μ M e LED azul

4.5.1 Fotossensibilizador e fonte de luz

A eritrosina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e a hematoporfirina IX na concentração de 10 μ M foram utilizadas para a sensibilização do *S. mutans*. A hematoporfirina IX foi produzida no laboratório de química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) e cedida pelo Prof. Dr. Adjaci Fernandes Uchoa. As soluções fotossensibilizadoras foram preparadas na hora do experimento dissolvendo 0,4 mg de eritrosina em 45 mL de solução fisiológica a 0,85% para se obter a concentração de 10 μ M da eritrosina (Figura 5). 1 mg de hematoporfirina IX foi diluída em 1 mL dimetil sulfóxido (DMSO, Merck). Após, 0,1 mL desta solução foi adicionada em 10 mL de solução fisiológica a 0,85% e obteve-se a concentração de 10 μ M da hematoporfirina IX (Figura 6). Foram filtradas em filtro de membrana estéril de 0,20 μ m (GVS, Sanford, EUA) e armazenadas na ausência de luz.



Figura 5 –Eritrosina com a concentração final de 10 μM , à direita.

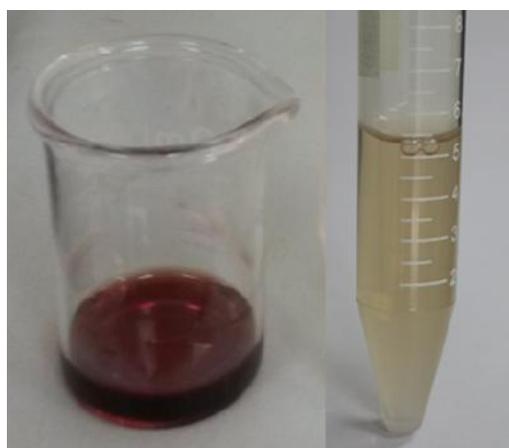


Figura 6 –Hematoporfirina IX com a concentração final de 10 μM , à direita.

A fonte de luz testada no experimento foi um LED azul sem fio (Emitter C, Schuster, Santa Maria, RS, Brasil) com comprimento de onda de 420-480 nm, com potência de 625 mW, área da ponteira de 0,5 cm², energia de 37,5 J, por 60 segundos, taxa de fluência de 1250 mW/cm² e fluência de 75 J/cm². A figura 7 ilustra o espectro de emissão do LED azul utilizado no presente trabalho.

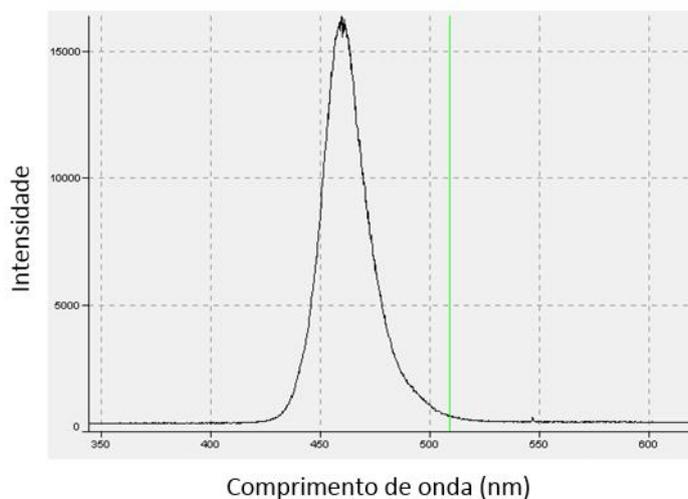


Figura 7 – Espectro de emissão do LED azul (Emitter C).

Foram realizados 2 experimentos para cada fotossensibilizador em tempos diferentes, totalizando $n=10$, para cada grupo. Os ensaios foram divididos nas condições experimentais descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais e tratamentos realizados com eritrosina, hematoporfirina $10 \mu\text{M}$ e LED azul

Grupos	Tratamento
E+L+	Eritrosina + LED azul
F-L+	Apenas irradiação com LED
E+L-	Tratamento somente com a eritrosina
H+L+	Hematoporfirina IX + LED azul
H+L-	Tratamento somente com a hematoporfirina IX
F-L-	Grupo controle, sem tratamento ou corante

4.5.2 Fotossensibilização *in vitro*

De acordo com as condições experimentais descritas acima, 0,1 mL da suspensão padronizada de *S. mutans* foi adicionada em cada orifício da placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizada e com tampa (Costar Corning, New York, EUA). Após, 0,1 mL do fotossensibilizador, eritrosina ou hematoporfirina, foi adicionado nos grupos E+L+ e E+L- ou H+L+ e H+L- e 0,1 mL de solução fisiológica a 0,85% foi adicionada nos grupos F-L+ e F-L-.

A placa foi agitada por 5 minutos (tempo de pré-irradiação ou pré-difusão) em um agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil). A seguir, os poços contendo os grupos E+L+ ou H+L+ e F-L+ foram irradiados de acordo com o protocolo descrito acima. A distância entre a fonte de luz e as células bacterianas foi de aproximadamente 6 mm. A irradiação foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com a luz apagada, com um anteparo de papel cartão negro fosco, esterilizado, com orifício do diâmetro coincidente ao tamanho da entrada do poço, para evitar o espalhamento da luz aos poços vizinhos (Figura 8).



Figura 8 – Inativação fotodinâmica com o LED azul (Emitter C).

Após a fotossensibilização, foram realizadas diluições seriadas dos ensaios e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas, em placas de petri contendo meio de cultura seletivo, ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (0,2 UI por mL de meio) e de 15% de sacarose (MSBS). As placas foram incubadas em microaerofilia (5% de CO₂) a 37 °C por 48 h. Após este período foram contadas as UFC/mL.

4.6 Coleta e armazenamento dos dentes

Foram coletados 40 terceiros molares humanos permanentes hígidos, com indicação de extração devido à impactação, doados por dois cirurgiões buco-maxilo-faciais de São José dos Campos, com consentimento livre e esclarecido por parte dos pacientes. Os dentes foram armazenados a 4 °C em solução de timol a 0,1% e após o corte, em água deionizada a 37 °C, trocada semanalmente, até o momento do uso. Sua manipulação foi realizada com equipamentos de proteção individual.

4.7 Preparo dos espécimes

4.7.1 Corte dos dentes

Para obtenção de amostras circulares de dimensões padronizadas foi utilizada a “Máquina para Corte de Amostras Circulares”, desenvolvida pelo Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres do Departamento de Odontologia Restauradora e construída com os recursos provenientes de um auxílio à pesquisa financiado pela FAPESP (2010/50912-8) sob responsabilidade do mesmo (Figura 9).

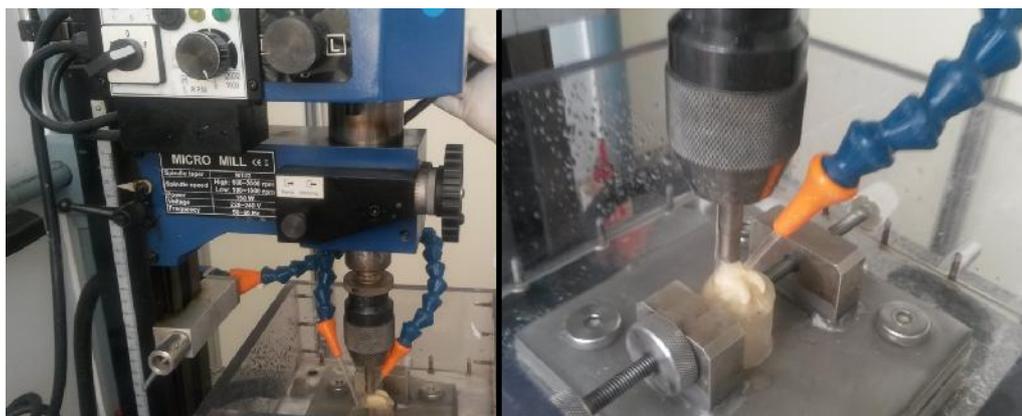


Figura 9 - “Máquina para Corte de Amostras Circulares”.

Para o posicionamento dos dentes na máquina para corte de amostras, foram confeccionados apoios em resina acrílica autopolimerizável (Jet, Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) com formato cilíndrico, de 25 mm de diâmetro por 30 mm de altura. A fixação dos dentes humanos nos cilindros de resina foi feita com cera pegajosa (Asfer, São Caetano do Sul, Brasil) (Figura 10A).

Os dentes foram posicionados na máquina cortadora de amostras e as coroas foram cortadas em suas faces mesial, distal, vestibular e lingual (Figura 10B)., com uma broca trefina com 6 mm de diâmetro interno, com partículas de diamante aglutinado nas margens de sua ponta ativa (desenvolvida pelo Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres, para cortar amostras circulares) acoplada à máquina, com abundante irrigação (Figura 9). Após o término do corte, fragmentos com diâmetro exato de 6 mm foram removidos do remanescente dentário, utilizando um disco diamantado em baixa rotação (Dremel – Campinas, SP, Brasil) (Figura 10C). Foram obtidos de 2 a 3 espécimes de formato cilíndrico das superfícies livres e proximais de cada coroa dentária (Figura 10).

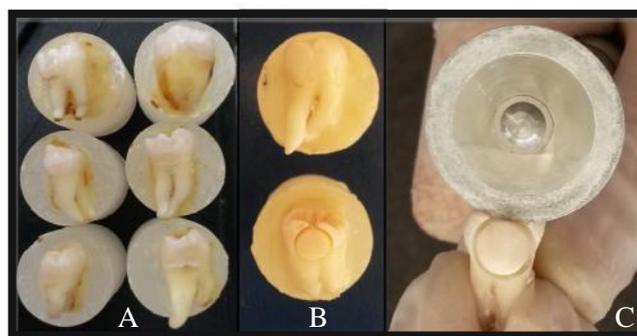


Figura 10 - Corte dos espécimes. A) Dentes fixados com cera pegajosa em cilindros de resina acrílica; B) Dente cortado com a broca trefina de 6 mm de diâmetro; C) Corte do espécime com disco de metal diamantado.

4.7.2 Padronização das dimensões dos espécimes

Cada espécime foi inserido no interior de uma matriz

metálica (Figura 11A), com dimensões fixadas em 6 mm de diâmetro e 2,15 mm de profundidade, verificada por meio de paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A superfície de dentina ficou voltada para o exterior do orifício da matriz metálica e foi desgastada com lixa de granulação 120 (Fepa-P, Extec, Enfield, CT, USA) em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração a água e baixa velocidade (Figura 11B). A espessura final de 2,0 mm dos espécimes foi conferida com o paquímetro digital (Figura 11C). Após, foi realizada a limpeza dos espécimes em ultrassom por 10 minutos (Figura 12). O armazenamento dos espécimes foi realizado a 37 °C em água deionizada para evitar desidratação.



Figura 11 - Polimento dos espécimes na politriz. A) Posicionamento do espécime na matriz metálica; B) Polimento do espécime; C) Espessura final conferida com paquímetro digital.



Figura 12 – Ultrassom utilizado para limpeza dos espécimes

4.7.3 Colagem dos bráquetes ortodônticos sobre os espécimes

Foi realizada a limpeza da superfície do esmalte de cada espécime com escova de Robinson e pedra pomes de granulação fina, durante 6 segundos em baixa rotação. Após, foi feita a lavagem com jatos de ar e água por 10 segundos e a secagem dos espécimes. Foi feito o condicionamento ácido com gel de ácido fosfórico a 37% por 30 segundos. Logo em seguida, foi feita a lavagem abundante por 10 segundos e secagem do esmalte.

O adesivo (Orthoprimer, Ref. 85.01.016, Morelli, Sorocaba, Brasil) foi aplicado na superfície do esmalte e na base do bráquete ortodôntico com o auxílio de microbrush. Com uma espátula de resina, foi colocado uma pequena quantidade de resina ortodôntica para colagem (Orthobond, Ref. 85.01.015, Morelli,

Sorocaba, Brasil), na base do bráquete ortodôntico metálico ou cerâmico (Edgewise Ricketts ou Edgewise ceramic, Ref. 10.30.209, Ref. 10.18.012, respectivamente, Morelli, Sorocaba, Brasil), que foi pressionado até tocar o centro do esmalte da amostra, com auxílio de uma pinça para colagem de bráquetes, removendo-se o excesso da resina ao redor do bráquete com uma sonda exploradora.

Foi realizada a fotopolimerização da resina por 40 segundos de acordo com as orientações do fabricante, com o mesmo fotopolimerizador de 1250 mW/cm² de intensidade utilizado nos experimentos (Emitter C, Schuster, Santa Maria, RS, Brasil), sendo 10 segundos em cada face do bráquete, o mais próximo possível, sem tocá-lo. Em seguida, os espécimes foram armazenados a 37 °C, em tubos falcon e água deionizada, trocada semanalmente até o momento do uso. Antes dos experimentos, os espécimes com os bráquetes colados foram esterilizados em autoclave, dentro de tubos falcon com água deionizada, a 135 °C por 30 minutos.

4.8 Formação de biofilme de *S. mutans*

Para a formação do biofilme foi utilizada a metodologia descrita por Pereira et al. (Pereira et al., 2013) com algumas modificações. O biofilme foi formado sobre os espécimes de dentes e bráquetes metálicos ou cerâmicos, que foram suspensos em um suporte metálico (Figura 13A e 13B) confeccionado com fio

ortodôntico de aço inoxidável (.016''x .016'', Ref. 55.02, Morelli, Sorocaba, Brasil), nas laterais do poço, da placa de microtitulação de 24 poços para que os espécimes não ficassem no fundo dos poços, onde tem mais acúmulo de biofilme, para simular a cavidade bucal (Costar Corning, Nova York, EUA) (Figura 13C).

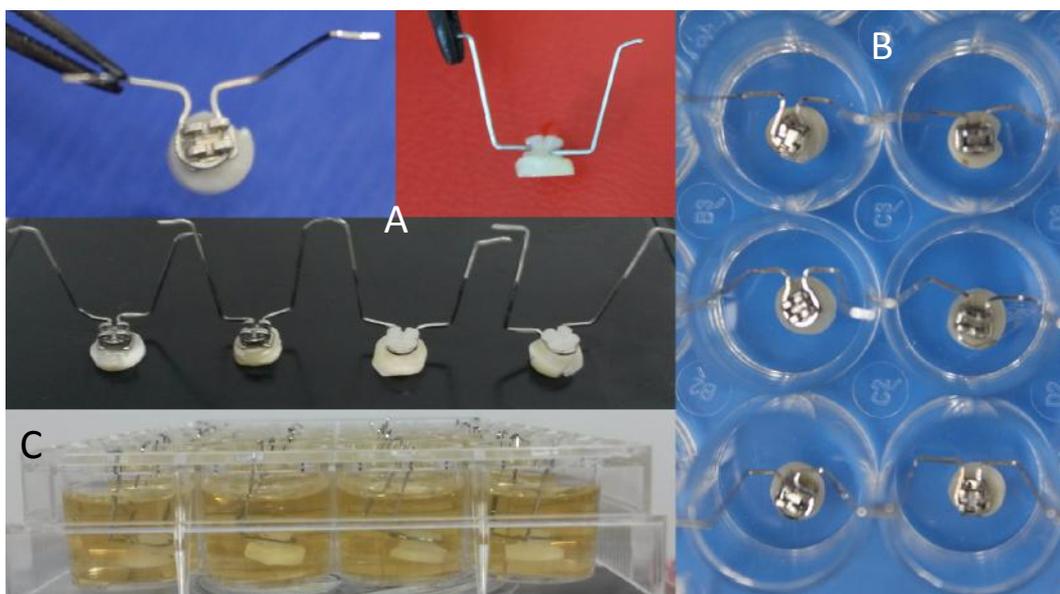


Figura 13 - A) Suporte metálico confeccionado com fio ortodôntico de aço inoxidável para apoio dos espécimes; B) Posicionamento do espécime na placa de 24 poços; C) Formação de biofilme – espécime fica suspenso sem tocar fundo do poço.

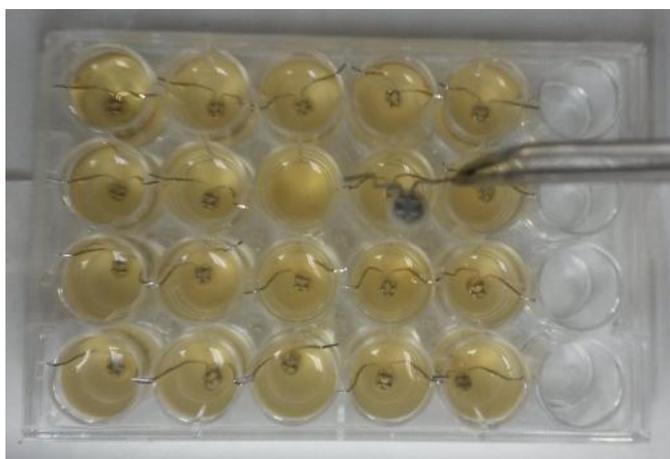


Figura 14 - Posicionamento dos espécimes na placa de 24 poços com o auxílio de uma pinça clínica esterilizada.

Inicialmente foram inoculados 2000 μL de Caldo BHI (Brain Heart Infusion), acrescido com 15% de sacarose e 100 μL da suspensão padronizada de células de *S. mutans* em cada poço. Logo em seguida, foram posicionados os espécimes, a placa tampada e incubada a 37 °C com CO_2 por 24 h para promover a adesão inicial dos micro-organismos. O caldo foi aspirado e trocado depois de 24 h. Após 48 h, cada espécime contendo biofilme foi lavado duas vezes em 2000 μL de solução fisiológica 0,85% para remover as células frouxamente aderidas, com auxílio de pinça estéril e posicionados em outra placa de 24 poços para ser realizar o tratamento (Figura 14).

4.9 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina 10, 20 e 50 μM ou 10 e 20 μM e LED azul sobre bráquetes metálicos (estudo piloto)

4.9.1 Fotossensibilizador e fonte de luz

A hematoporfirina IX nas concentrações de 10, 20 e 50 μM ou 10, 20 μM foram utilizadas para a sensibilização de *S. mutans*. A solução fotossensibilizadora foi preparada na hora do experimento dissolvendo 1 mg de hematoporfirina IX em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck), filtrada em filtro de membrana estéril de 0,20 μm (GVS, Sanford, EUA) e armazenada na ausência de luz. Depois foram feitas as diluições em solução fisiológica a

0,85% nas concentrações utilizadas (10, 20 e 50 μM de H ou 10 e 20 μM de H). 0,1 mL da solução acima foi adicionada em 10 mL de solução fisiológica a 0,85% e obteve-se a concentração de 10 μM de H IX. 0,4 mL da solução foi adicionada em 1,6 mL de solução fisiológica a 0,85% e obteve-se a concentração de 20 μM de H IX. 2,5 mL da solução foi adicionada em 2,5 mL de solução fisiológica a 0,85% e obteve-se a concentração de 50 μM de H IX.

A fonte de luz e os parâmetros utilizados foram os mesmos no experimento das células planctônicas descritos no item 4.5.1.

Foi realizado 1 experimento com bráquetes metálicos totalizando $n=5$ para cada grupo. Os ensaios foram divididos nas condições experimentais descritas na tabela 2 e 3.

Tabela 2 – Grupos experimentais e tratamentos realizados com hematoporfirina 10, 20 e 50 μM e LED azul

Grupos	Tratamento
10H+L+	Hematoporfirina IX 10 μM + LED azul
20H+L+	Hematoporfirina IX 20 μM + LED azul
50H+L+	Hematoporfirina IX 50 μM + LED azul
F-L-	Grupo controle, sem tratamento e corante

Tabela 3 – Grupos experimentais e tratamentos realizados com hematoporfirina 10 e 20 μM e LED azul

Grupos	Tratamento
10H+L+	Hematoporfirina IX 10 μM + LED azul
20H+L+	Hematoporfirina IX 20 μM + LED azul
F-L-	Grupo controle, sem tratamento e corante

4.9.2 Fotossensibilização *in vitro*

Após a formação do biofilme por 48 h sobre os espécimes como descrito no item 4.8, em orifício da placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizada e com tampa (Costar Corning, New York, EUA), foi acrescentado 150 μL de hematoporfirina IX, 10, 20 e 50 μM nos grupos 10H+L+, 20H+L+ e 50H+L+ ou 10H+L+ e 20H+L+ e 150 μL de solução fisiológica 0,85% no grupo F-L-. Os espécimes foram colocados nos orifícios da placa, sem os suportes de metal. Estes foram removidos do suporte de metal, fazendo-se pressão para abrir o ômega que segurava os bráquetes e os espécimes foram posicionados na placa sem o auxílio de pinça, onde foi realizado o tratamento. A placa foi agitada por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em um agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil), recoberta com papel alumínio para proteção da luz. A seguir, os poços contendo os grupos 10H+L+, 20H+L+ e 50H+L+ ou 10H+L+ e 20H+L+ foram irradiados de acordo com o

protocolo descrito acima. A irradiação foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com a luz apagada, com um anteparo de papel cartão negro fosco, esterilizado, com orifício do diâmetro coincidente ao tamanho da ponteira do LED, para evitar o espalhamento da luz aos poços vizinhos. Após o tratamento, os espécimes foram lavados em 200 μ L de solução fisiológica 0,85%, com auxílio de pinça estéril.

Em seguida, os espécimes foram transferidos para tubos falcon contendo 10 mL de solução fisiológica 0,85% e o biofilme aderido aos espécimes foi rompido por homogeneização por 30 s em homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200, 50W, Bandelin Eletronic) (Figura 15) com amplificação de 20%. Em seguida, 10 μ L deste inóculo, de cada tubo falcon, foi transferido para tubo eppendorf contendo 990 μ L de solução fisiológica 0,85% para realização de diluições seriadas.

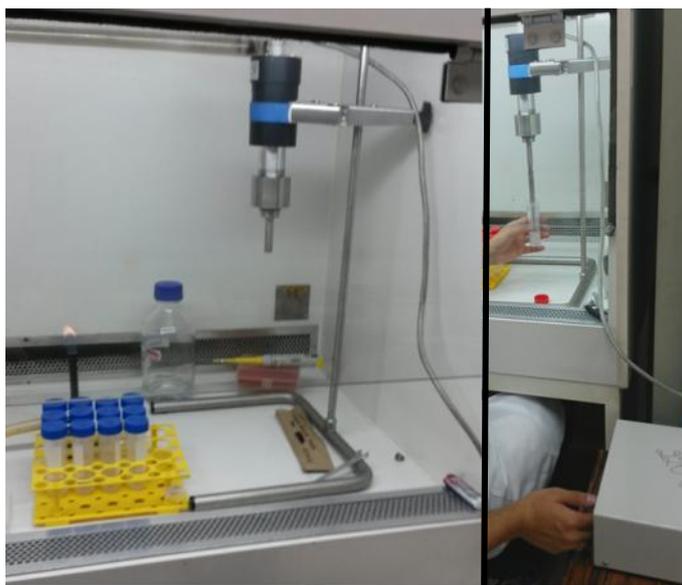


Figura 15 - Homogeneização ultrassônica dos espécimes (Sonoplus HD 2200).

Alíquotas de 100 μ L das diluições foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos para *S. mutans*, ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (0,2 UI por mL de meio) e de 15% de sacarose (MSBS). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com CO₂ por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

4.10 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina 10 μ M e LED azul sobre bráquetes metálicos ou cerâmicos

4.10.1 Fotossensibilizador e fonte de luz

A hematoporfirina IX na concentração de 10 μ M foi utilizada para a sensibilização de *S. mutans*. A solução fotossensibilizadora foi preparada como descrita no item 4.9.1.

A fonte de luz e os parâmetros utilizados foram os mesmos no experimento das células planctônicas descritos no item 4.5.1.

Foram realizados 2 experimentos, com bráquetes metálicos ou cerâmicos, totalizando n=10 para cada grupo. Os ensaios foram divididos nas condições experimentais descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Grupos experimentais e tratamentos realizados com hematoporfirina 10 μ M e LED azul

Grupos	Tratamento
H+L+	Hematoporfirina IX + LED azul
F-L+	Apenas irradiação com LED
H+L-	Tratamento somente com a hematoporfirina IX
F-L-	Grupo controle, sem tratamento e corante

4.10.2 Fotossensibilização *in vitro*

Após a formação do biofilme por 48 h sobre os espécimes como descrito no item 4.8, em orifício da placa de microtitulação de 96 poços de fundo plano, esterilizada e com tampa (Costar Corning, New York, EUA), foi acrescentado 150 μ L de hematoporfirina IX, 10 μ M nos grupos H+L+, H+L- e 150 μ L de solução fisiológica 0,85% no grupo F-L- e F-L+. Os espécimes foram colocados nos orifícios da placa, sem os suportes de metal. Estes foram removidos do suporte de metal, fazendo-se pressão para abrir o ômega que segurava os bráquetes e os espécimes foram posicionados na placa sem o auxílio de pinça, onde foi realizado o tratamento. A placa foi agitada por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) em um agitador orbital (Solab, Piracicaba, Brasil), recoberta com papel alumínio para proteção da luz. A seguir, os poços contendo os grupos H+L+, H+L- foram irradiados de acordo

com o protocolo descrito acima. A irradiação foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar com a luz apagada, com um anteparo de papel cartão negro fosco, esterilizado, com orifício do diâmetro coincidente ao tamanho da ponteira do LED, para evitar o espalhamento da luz aos poços vizinhos. Após o tratamento, os espécimes foram lavados em 200 μ L de solução fisiológica 0,85%, com auxílio de pinça estéril.

Em seguida, os espécimes foram transferidos para tubos falcon contendo 10 mL de solução fisiológica 0,85% e o biofilme aderido aos espécimes foi rompido por homogeneização por 30 s em homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200, 50W, Bandelin Eletronic) com amplificação de 20%. Em seguida, 10 μ L deste inóculo, de cada tubo falcon, foi transferido para tubo eppendorf contendo 990 μ L de solução fisiológica 0,85% para realização de diluições seriadas.

Alíquotas de 100 μ L das diluições foram semeadas em placas de petri contendo meios de cultura seletivos para *S. mutans*, ágar Mitis Salivarius (Difco, Detroit, EUA) acrescido de bacitracina (0,2 UI por mL de meio) e de 15% de sacarose (MSBS). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com CO₂ por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

4.11 Análise estatística

Para análise estatística, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) nas células planctônicas e formação de biofilme *in vitro*. Os resultados foram transformados em logaritmo (\log_{10}) em planilha Excel (Microsoft Office) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey por meio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADO

5.1 Inativação fotodinâmica em células plantônicas de *S. mutans* em presença de eritrosina ou hematoporfirina IX 10 μM e LED azul

A inativação fotodinâmica mediada por 10 μM da eritrosina com LED azul, em células planctônicas de *S. mutans* não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, com os parâmetros utilizados. A média, desvio padrão estão representados na figura 16 e p na legenda.

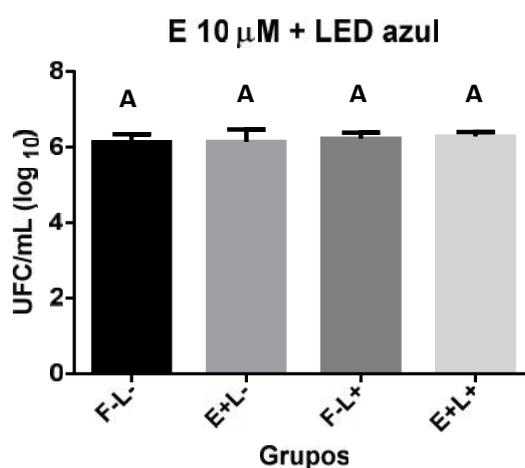


Figura 16 - Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica de *S. mutans* em células planctônicas mediada pela eritrosina 10 μM e LED azul, $p = 0,3644$.

A inativação fotodinâmica mediada por 10 μM da hematoporfirina IX com LED azul, em células planctônicas de *S. mutans* apresentou diferença estatisticamente significante entre o grupo submetido a terapia (H+L+) e os outros grupos estudados, com os parâmetros utilizados. Comparando-se os grupos somente hematoporfirina IX (H+L-) ou irradiado (F-L+) e o grupo controle (F-L-), não foi observada diferença significativa. A média, desvio padrão estão representados na figura 17 e p na legenda. O tratamento realizado resultou em uma redução de 6,78 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo H+L+ quando comparado ao grupo controle (F-L-).

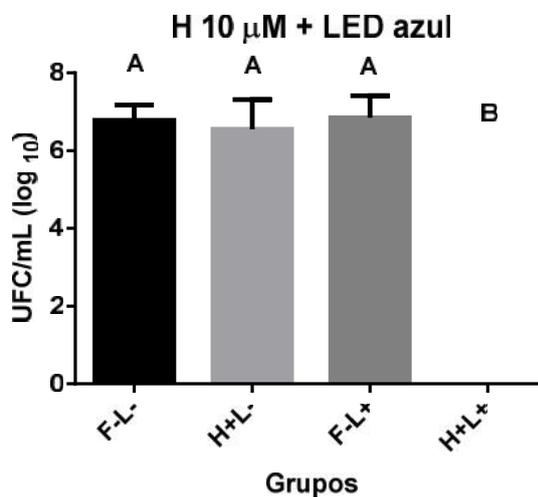


Figura 17 - Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica de *S. mutans* em células planctônicas mediada por 10 μM de hematoporfirina IX e LED azul, $p < 0,0001$.

5.2 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina IX 10, 20 e 50 μM e LED azul, sobre bráquetes metálicos (estudo piloto)

A inativação fotodinâmica mediada por 10, 20 e 50 μM da hematoporfirina e LED azul, em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos F-L- e 20H+L+, F-L- e 50H+L+, 10H+L+ e 20H+L+, 10H+L+ e 50H+L+ com os parâmetros utilizados. Os grupos F-L- e 10H+L+, 20H+L+ e 50H+L+ não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O tratamento realizado resultou em uma redução de 6,29 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo 50H+L+ e de 4,02 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo 20H+L+ quando comparados ao grupo controle (F-L-). A média, desvio padrão estão representados na figura 18 e p na legenda.

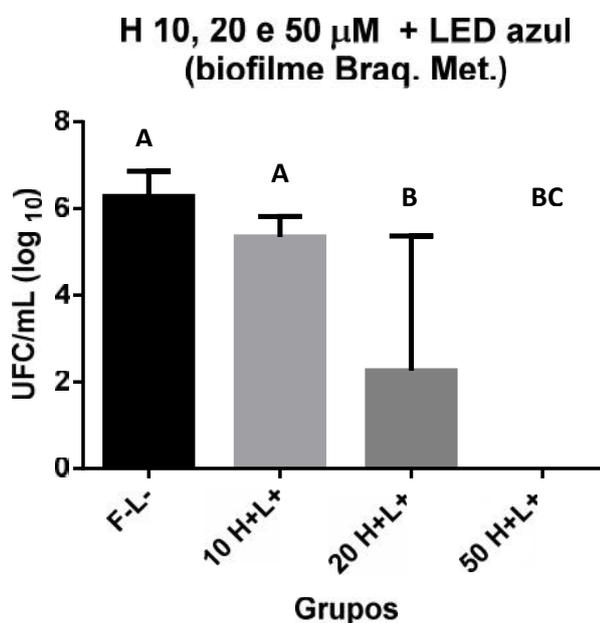


Figura 18 - Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, mediada por 10, 20 e 50 μM de hematoporfirina IX e LED azul, $p < 0,0001$.

5.3 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina IX 10 e 20 μM e LED azul, sobre bráquetes metálicos (estudo piloto)

A PDI mediada por 10 e 20 μM da hematoporfirina e LED azul, em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos F-L- e 10H+L+, F-L- e 20H+L+ com os parâmetros utilizados. Os grupos 10H+L+ e 20H+L+ não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O tratamento realizado resultou em uma redução de 4,45 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo 20H+L+ e de 2,75 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo 10H+L+ quando comparados ao grupo controle (F-L-). A média, desvio padrão estão representados na figura 19 e p na legenda.

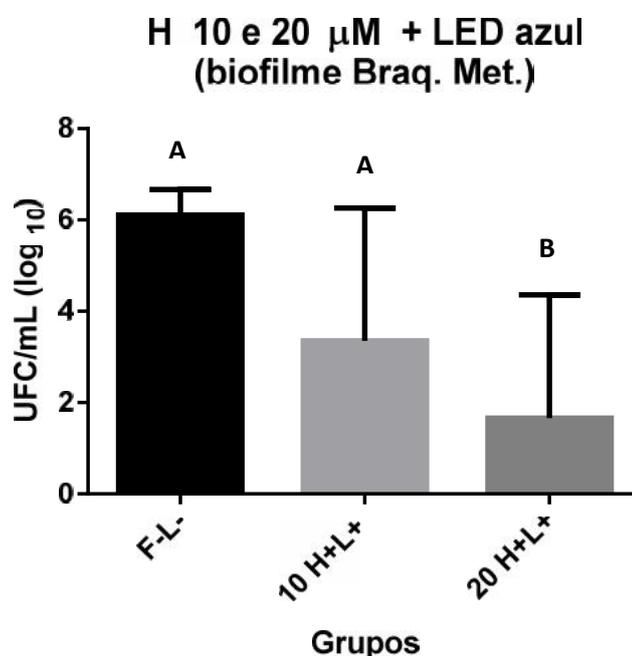


Figura 19- Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes cerâmicos, mediada por 10 e 20 μM de hematoporfirina IX e LED azul, $p = 0,0008$.

5.4 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina IX 10 μ M e LED azul, sobre bráquetes metálicos

A PDI mediada por 10 μ M da hematoporfirina e LED azul, em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, com os parâmetros utilizados. A média, desvio padrão estão representados na figura 20 e p na legenda.

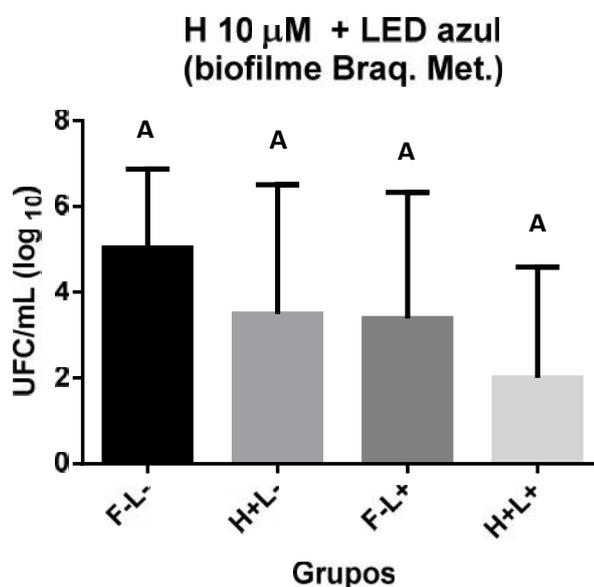


Figura 20 - Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos, mediada por 10 μ M de hematoporfirina IX e LED azul, $p = 0,1023$.

5.5 Inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* em presença de hematoporfirina IX 10 μ M e LED azul, sobre bráquetes cerâmicos

A inativação fotodinâmica mediada por 10 μ M da hematoporfirina e LED azul, em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes cerâmicos, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos F-L- e H+L+, H+L- e H+L+, F-L+ e H+L+, com os parâmetros utilizados. Os grupos F-L- e H+L-, F-L- e F-L+, H+L- e F-L+ não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O tratamento realizado resultou em uma redução de 3,60 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo H+L+ quando comparado ao grupo controle (F-L-). A média, desvio padrão estão representados na figura 21 e p na legenda.

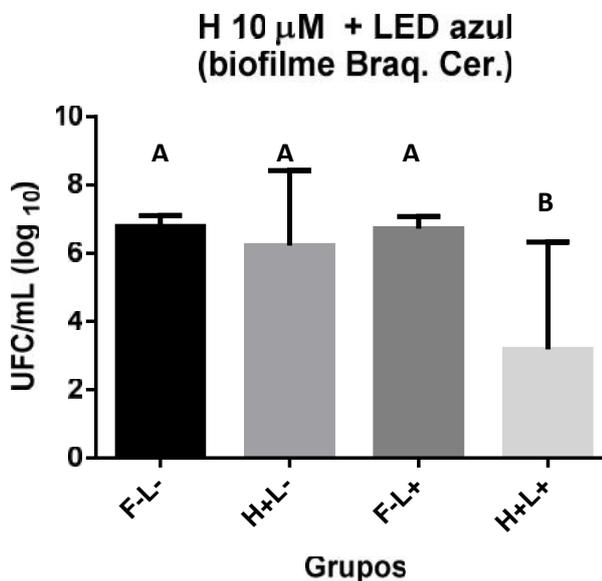


Figura 21 - Média e desvio padrão das reduções de UFC/mL (\log_{10}) obtidas da inativação fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* sobre bráquetes cerâmicos, mediada por 10 μ M de hematoporfirina IX e LED azul, $p = 0,0004$.

6 DISCUSSÃO

Muitas técnicas são estudadas para a remoção do biofilme dentário que é o agente etiológico de várias doenças bucais, incluindo a cárie dentária, mas com sucesso limitado. Por esta razão, técnicas alternativas são necessárias para a prevenção de lesão de mancha branca, principalmente nos pacientes ortodônticos, prevenção da cárie (Lee et al., 2012) e doenças periodontais (Habiboallah et al., 2014), que não dependam somente da colaboração do paciente.

A inativação fotodinâmica é uma destas técnicas alternativas para superar a resistência bacteriana aos antibióticos e agentes químicos. É usada para diversas espécies microbianas, que incluem bactérias, vírus e fungos. A técnica envolve a utilização de uma fonte de luz, que é minimamente invasiva e não tóxica, para ativar um fotossensibilizador adequado para controlar a formação de biofilme bucal. Essa ativação resulta na transferência de energia ou elétrons do composto (F) para o ambiente circunvizinho. Formam-se espécies reativas de oxigênio, tais como o oxigênio singlete e radicais livres, processos estes de oxidorredução que implantam no sítio de ação o estresse oxidativo, que pode causar danos irreversíveis ou morte celular. É, portanto, um processo fotofísico e fotoquímico para destruição da célula alvo. (Ochsner, 1997; Wilson, 2004; Lima et al., 2009; Lee et al., 2012; Gursoy et al., 2013).

Existem algumas vantagens da PDI sobre os agentes antimicrobianos convencionais, tais como: a morte do micro-organismo alvo pode ser conseguida de uma maneira bem rápida, dependendo dos parâmetros utilizados; não ocorre desenvolvimento de resistência pelo organismo alvo; e, finalmente, os efeitos antimicrobianos podem ser localizados a uma determinada região, evitando a morte da microflora normal de outras regiões da cavidade bucal (Wainwright, Crossley, 2002; Konopka, Goslinski, 2007; Tavares et al., 2010; Trindade et al., 2012).

Nos estudos microbiológicos *in vitro* podem ser realizados testes em cultura planctônica ou biofilme. Nas culturas planctônicas, os micro-organismos estão livres ou em pequenos agrupamentos e há uma abundante disponibilização das moléculas do fotossensibilizador. No entanto, no biofilme o crescimento microbiano ocorre em uma organização mais complexa, formando uma estrutura tridimensional, com várias camadas celulares. Também ocorre na matriz polissacarídea extracelular, a incorporação de compostos que auxiliam a adesão intercelular, fornecendo maior resistência aos procedimentos ou compostos químicos antimicrobianos. Por isso, protocolos semelhantes de PDI podem resultar em taxas de morte distintas quando comparados aos experimentos em culturas planctônicas e em biofilme (Núñez et al., 2013).

Para estabelecimento de um protocolo de tratamento clínico futuro utilizando a PDI, existe a necessidade de avaliação da eficiência e definição de parâmetros adequados. Primeiramente são

realizados experimentos *in vitro* em culturas celulares. Se a eficácia não for observada nesses experimentos, é provável que esta técnica de tratamento não obtenha êxito. No entanto, mesmo que a eficiência seja comprovada nas culturas celulares, não necessariamente se obterá em ensaios *in vivo*. Porém, essa sequência de experimentação *in vitro* e posterior *in vivo* é essencial para o desenvolvimento na área biomédica, garantindo assim, a segurança e eficácia dos protocolos clínicos (Núñez et al., 2013).

Assim, na primeira parte do trabalho testou-se o efeito da inativação fotodinâmica da hematoporfirina IX e comparou-se com a eritrosina, um fotossensibilizador usado em PDI por vários pesquisadores (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006; Rossoni et al., 2010; Costa et al., 2012; Pereira et al., 2013; Habiboallah et al., 2014). Este experimento mostrou um resultado interessante com a hematoporfirina IX, ocorrendo a morte de 100% de *S. mutans* em cultura planctônica, entretanto, não foi observado efeito com a eritrosina. Em relação à hematoporfirina, não existem trabalhos na literatura descrevendo o efeito da PDI associando hematoporfirina IX e LED azul em cultura planctônica de *S. mutans*.

A fonte de luz eleita foi um LED azul que apresenta muitas vantagens: é geralmente utilizado no consultório odontológico para a fotoativação de materiais resinosos e clareamento dentário, não causando danos aos tecidos bucais. Os cirurgiões-dentistas poderiam utilizar os seus próprios LEDs para realizar a PDI em seus consultórios, reduzindo os gastos de aquisição de laser ou diferentes tipos de LEDs. Além do mais, é um equipamento pequeno e leve,

com modelos sem fio, seu custo por Watt é muito menor, tem uma saída de largo espectro, de larga faixa de frequência, é fácil de operar e de configurar seus dispositivos em diferentes geometrias de irradiação (Meisel, Kocher, 2005; Konopka, Goslinski, 2007; Wilson, Patterson, 2008). Um ponto importante a ser salientado é que estudos mostraram que o uso apenas do LED exerce pouco ou nenhum efeito antimicrobiano (Zanin et al., 2005; Engelmann et al., 2007)

A eritrosina tem sido usada frequentemente na clínica odontológica para a detecção de biofilme sobre a superfície dentária em concentrações de 9-25 μM (Marsh et al., 1989) e apresenta algumas vantagens sobre os outros fotossensibilizadores pois não é tóxica ao hospedeiro e foi aprovada para o uso em Odontologia (Wood et al., 2006; Allaker, Douglas, 2009). Após verificar os resultados de dois trabalhos (Costa et al., 2010; Pereira et al., 2013) que pesquisaram o efeito do LED e eritrosina, foi escolhida esta para servir de comparação com o outro fotossensibilizador experimental (hematoporfirina IX) em culturas planctônicas de *S. mutans*, neste trabalho.

Atualmente existem muitos fotossensibilizadores como os derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina), porfirinas (*Photofrin*®, *Photosan*® e *Photogem*®), ftalocianinas (azuleno), xantenos (eritrosina, eosina e rosa bengala) e clorinas (*Photoditazine*®) (Wainwright, 1998). No entanto, o futuro da PDI está altamente dependente do desenvolvimento de fotossensibilizadores mais eficientes (Savellano, Hasan, 2003). No rendimento fotoquímico, há muitos fatores que são importantes para a

eficiência da PDI, tais como a localização tecido/célula e a ligação à membrana celular (Engelmann et al., 2007). Entretanto, ter um grande rendimento fotoquímico é certamente necessário mas não a única característica requerida para desenvolver novos fotossensibilizadores para a PDI (Castano et al., 2005). A efetividade da PDI está principalmente relacionada a três aspectos: capacidade do fotossensibilizador interagir com a membrana celular presente nos micro-organismos; habilidade do fotossensibilizador penetrar e agir dentro da célula; e formação de oxigênio singleto reativo ao redor da célula bacteriana pela iluminação do fotossensibilizador (Nagata et al., 2012).

A hematoporfirina IX é derivada da protoporfirina que é utilizada como um fotossensibilizador para PDI. Entretanto, sua aplicação é limitada devido à formação de agregados e da baixa solubilidade em meio fisiológico. Foram realizadas modificações em sua estrutura para melhorar a solubilidade, aumentar o rendimento global em até 70% e estimular seu uso na PDI (Rossi et al., 2008; Uchoa et al., 2010). Por estas razões este fotossensibilizador foi escolhido para testes *in vitro* e também por seu espectro de absorção (400 nm) coincidir com o comprimento de onda do LED azul utilizado neste trabalho.

A quantidade de oxigênio singleto gerado pelas reações fotodinâmicas é muito importante e varia de acordo com cada fotossensibilizador utilizado. Esta quantidade é medida pelo rendimento quântico do oxigênio singleto. A literatura reporta que a produção de oxigênio e o rendimento quântico para a eritrosina é de

0,63 e para os derivados da hematoporfirina, como o Photofrin® é de 0,83 (DeRosa, Crutchley, 2002). Quanto maior for o rendimento quântico, maior a produção de oxigênio singleto e, conseqüente, maior a eficácia fotodinâmica. Entretanto, nos sistemas biológicos vários fatores podem afetar esta atividade (Nagata et. al, 2012). Talvez por esta razão ocorreu um melhor resultado neste trabalho, da PDI com a hematoporfirina IX quando comparado à eritrosina. A hematoporfirina foi modificada para potencializar o seu efeito fotodinâmico.

Costa e colaboradores (Costa et al., 2010) testaram o efeito da PDI com a eritrosina ou rosa bengala a 2 μM usando um LED sobre culturas planctônicas de *S. mutans* (ATCC 35688) e concluíram que ambos fotossensibilizadores exerceram um efeito antimicrobiano na cepa estudada, sendo o melhor resultado obtido com o fotossensibilizador rosa bengala. Utilizaram um comprimento de onda de 440-460 nm, similar a este estudo. A concentração da eritrosina da presente pesquisa foi de 10 μM . No entanto, não foi observado efeito com a eritrosina (mesmo que em maior concentração), apesar do uso da mesma metodologia, mesmos parâmetros de comprimento de onda e energia, mas cepas diferentes (UA 159) do trabalho mencionado acima.

No trabalho de Ishiyama (Ishiyama et al., 2012), os autores utilizaram o laser Nd-YAG e três fotossensibilizadores (rosa bengala, eritrosina e floxina – 10 μM) para avaliar a habilidade de produção de oxigênio singleto relacionados às suas atividades bactericidas. O rosa bengala mostrou a mais alta atividade bactericida

contra *S. mutans*, seguida da eritrosina e floxina. Uma das razões da discrepância entre a habilidade de gerar oxigênio singlete e atividade bactericida foi a eficiente incorporação dos fotossensibilizadores dentro das células bacterianas. Eles usaram a mesma concentração utilizada no presente estudo, mas um laser Nd-YAG com frequência dobrada (532 nm - verde).

De acordo com Reddy et al. (Sudhakara Reddy et al., 2012), existem dois mecanismos básicos propostos para o dano letal causado às bactérias pela PDI. Um deles é relacionado ao dano no DNA e o outro, na membrana citoplasmática, permitindo vazamento dos conteúdos celulares ou inativação dos sistemas de transporte através da membrana e inativação das enzimas. Ocorrem quebras simples e duplas na cadeia do DNA e o desaparecimento da fração superenovelada do plasmídeo nos micro-organismos Gram-positivos e negativos. As outras causas para a morte celular também incluem a alteração das proteínas da membrana citoplasmática, alteração na síntese da parede celular como também, o aparecimento de uma estrutura multi lamelar perto do septo de divisão celular e ainda a perda de íons de potássio pelas células.

Uma redução significativa de *S. mutans* foi observada no grupo submetido à PDI (H+L+) quando comparado aos outros grupos. A hematoporfirina IX e eritrosina absorvem luz em 400 e 400-550 nm, respectivamente e a fonte de luz usada neste trabalho emite luz numa faixa de 420-480 nm. Estes resultados podem explicar o fato de obtenção de melhores resultados com a hematoporfirina IX, do que com a eritrosina. Apenas os trabalhos de

Costa et al. (2010) em cultura planctônica e de Pereira et al. (2013) em biofilme utilizaram LED azul associado a eritrosina e conseguiram resultados significativos. Neste trabalho, a metodologia foi baseada nos resultados de Costa et al., (2010) e Pereira et al. (2013) Outros autores (Metcalf et al., 2006; Wood et al., 2006) utilizaram em biofilme, a luz verde associada à eritrosina com uma concentração maior (22 μM) e observaram resultados positivos na PDI sobre biofilme de *S. mutans*. Talvez por esta razão, no atual trabalho não foi obtida redução microbiana com a eritrosina. Com uma outra fonte de luz com comprimento de onda próximo a 530 nm, os resultados seriam diferentes, como sugere Nagata e colaboradores (Nagata et al., 2012).

Bevilacqua e colaboradores (Bevilacqua et al., 2007) foram os primeiros pesquisadores a utilizarem o LED (600-670nm) sobre culturas planctônicas de *S. mutans* e obtiveram morte de 100% dos micro-organismos com azul de toluidina O a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como fotossensibilizador.

Em outro estudo (Paschoal et al., 2014) testou a PDI com uma nova fonte de luz não coerente de amplo espectro (400-700 nm) e baixas concentrações de curcumina (0,75 μM) e azul de toluidina (25 μM) sobre culturas planctônicas de *S. mutans*. Os autores conseguiram uma fotoinativação letal *in vitro* de 100% dos micro-organismos envolvidos, utilizando uma luz visível e um curto tempo de exposição (12,2 s). Relataram que existe a limitação dos fotossensibilizadores de potencial manchamento (azul de toluidina) e hidrofobicidade (curcumina) e que novos estudos deverão ser

realizados para assegurar o uso clínico desta nova fonte de luz. No presente estudo foi usado um tempo de exposição do LED azul de 60 s.

A segunda parte deste trabalho demonstrou a eficácia da PDI utilizando a hematoporfirina IX e LED azul em biofilme da cepa UA 159 de *S. mutans* sobre bráquetes metálicos ou cerâmicos colados, em espécimes de dentes humanos. Este fotossensibilizador foi testado em biofilme pois obteve melhor resultado nos experimentos em cultura planctônica, na primeira parte deste trabalho, quando comparado à eritrosina. A cepa UA 159 foi eleita por ter o genoma sequenciado em 2002 servindo para comparações com outros trabalhos e por servir de base para o desenvolvimento de novas drogas e novas abordagens para prevenção e tratamento da cárie dentária (Ajdic et al., 2002).

Em um artigo de revisão sobre a terapia fotodinâmica antimicrobina para cárie dentária (Nagata et al., 2012), os autores comentaram que dos artigos analisados, *S. mutans* foi a bactéria mais estudada pois é o principal micro-organismo relacionado à cárie, seguido de *L. Acidophilus*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii*. Relatam também, que o uso de fotossensibilizadores com baixa concentração deveria ser a escolha ideal para prevenção de manchamento dentário, de restaurações estéticas e no caso deste trabalho de bráquetes estéticos (cerâmicos), nos tratamentos com a PDI. Com as concentrações de 10 e 20 μM da H, utilizadas no presente trabalho, não foi observado manchamento nos espécimes dentários, nem nos bráquetes cerâmicos. O que não ocorreu quando

utilizada a concentração de 50 μ M da H, onde foi observado pigmentação marrom claro nos espécimes dentários, o que representaria uma limitação clínica.

Apenas um trabalho encontrado na literatura fez um estudo longitudinal, randomizado cego sobre o efeito da PDI em pacientes em tratamento ortodôntico. Os autores utilizaram a curcumina e LED azul e compararam com o verniz de clorexidina a 2% em pacientes adolescentes em tratamento ortodôntico, em relação a inflamação periodontal (Paschoal et al., 2015). Concluíram que a PDI representa uma abordagem antimicrobiana promissora para a prevenção de gengivite em adolescentes em tratamento ortodôntico fixo. Entretanto, relatam que devem ser realizadas outras investigações para esclarecer o papel da PDI na prevenção daquela doença e encorajar o estudo em uma amostra maior. Além do mais, estudos que investiguem os parâmetros com o objetivo de diminuir o tempo de exposição à luz e ao mesmo tempo, otimizar esta nova técnica de tratamento em pacientes com alto risco de desenvolver diferentes patologias bucais, devem ser desenvolvidos. Visando a prevenção de lesões de mancha branca nos pacientes em tratamento ortodôntico, não existe trabalho na literatura sobre o assunto, utilizando a PDI.

Neste estudo, a hematoporfirina IX foi usada como fotossensibilizador na concentração de 10 μ M para o tratamento do biofilme de *S. mutans* pois foi o corante e a concentração que obteve melhor resultado na primeira parte do trabalho da PDI em culturas planctônicas (Figura 17).

Foram feitos estudos piloto utilizando várias concentrações de H (10, 20 e 50 μM) e H (10, 20 μM), para que fossem observadas quais concentrações do fotossensibilizador poderiam ser letais para os micro-organismos estudados. Como o ideal é o tratamento com o fotossensibilizador de baixa concentração para evitar manchamentos dentários e toxicidade (Nagata et al., 2012) e avaliando os resultados conseguidos (Figuras 18 e 19), optou-se por continuar os experimentos com H 10 μM .

No experimento do biofilme com bráquetes metálicos não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Os grupos F-L+ e H+L- , grupos estes de tratamento apenas com LED e fotossensibilizador, respectivamente, tiveram redução de micro-organismos não significante, quando comparado ao controle (F-L-). O tratamento da H 10 μM em biofilme com bráquetes metálicos deverá ser repetido em melhores condições ambientais (muito calor no dia do experimento) para ser comparado com os resultados dos bráquetes cerâmicos. Em relação ao biofilme sobre bráquetes cerâmicos, o resultado foi diferente e apresentou diferença estatisticamente aasignificante entre os grupos controle (F-L-), tratamento apenas com irradiação (F-L+) e tratamento apenas com o fotossensibiliador (H+L-) quando comparados ao grupo H+L+. O tratamento realizado com H 10 μM e LED azul resultou em uma redução de 3,60 UFC/mL (\log_{10}) para o grupo H+L+ quando comparado ao grupo controle (F-L-).

O sucesso da PDI está baseado em alguns fatores como o tipo, concentração, tempo de pré-irradiação do

fotossensibilizador, condição fisiológica dos micro-organismos estudados, fonte de luz e doses utilizadas (Rossoni et al., 2010). Portanto a investigação do modelo planctônico *in vitro* é um passo importantíssimo capaz de guiar protocolos/parâmetros *in vivo* no futuro para aspectos de iluminação (relacionados às fontes de luz) e concentração (relacionados aos corantes) e podem demonstrar a eficiência do controle de crescimento de *S. mutans* em suspensão planctônica (Paschoal et al., 2013).

Um trabalho realizado em 2012 (Lee et al., 2012) apresentou os efeitos positivos da PDI na redução de biofilme de *S. mutans* utilizando eritrosina (20 µM) e um fotopolimerizador de luz halógena (400-520nm), muito usado na clínica odontológica. Eles demonstraram uma significativa diminuição do crescimento *in vitro* de *S. mutans* em resposta à utilização desta simples técnica de PDI e verificaram o seu uso potencial para controle de biofilme e prevenção de lesões cáries. Comentaram que por utilizarem fotossensibilizador e fotopolimerizador que convencionalmente é usado nas clínicas odontológicas, o efeito da PDI poderá ser conseguido sem custos adicionais. Esta é razão de termos escolhido o LED azul como fonte de luz para este trabalho, pois os profissionais da Odontologia não precisariam arcar com custos adicionais de aquisição de outros aparelhos. Haverá a necessidade de estudos futuros com fotossensibilizadores que sejam efetivos no comprimento de onda do LED azul, como a hematoporfirina IX.

Em resumo, os resultados de nosso estudo provaram a eficiência da hematoporfirina IX como fotossensibilizador para ser

utilizado na PDI com a cepa de *S. mutans* estudada, indicando que a terapia com este fotossensibilizador e LED azul poderá ser usada para a prevenção de lesões de mancha branca e cáries dentárias, em um futuro próximo. Novas concentrações do fotossensibilizador hematoporfirina IX e/ou outras dosimetrias devem ser testadas para se conseguir a inativação fotodinâmica da cepa UA 159. Outros fotossensibilizadores poderão ser modificados quimicamente para que possam ser associados ao LED azul.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a proposição e com os parâmetros e condições utilizados no presente estudo, podemos concluir que:

A PDI sobre células planctônicas de *S. mutans* com a associação de eritrosina e LED azul não reduziu o número de UFC/mL. No entanto, a PDI com a hematoporfirina IX e LED azul ocorreu efeito antimicrobiano de 100% sobre a cepa estudada de *S. mutans*.

A inativação fotodinâmica do biofilme de *S. mutans* com hematoporfirina IX e LED azul sobre bráquetes metálicos colados, em espécimes de dentes humanos, não reduziu o número de UFC/mL. Entretanto, sobre bráquetes cerâmicos houve redução significativa do número de *S. mutans* de 53%.

8 REFERÊNCIAS*

Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124(2):198-205.

Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *J Dent Res.* 2002;81(6):411-5.

Ahn SJ, Lee SJ, Lim BS, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132(6):815-21.

Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun.* 2008;76(9):4259-68.

Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14434-9.

Allaker RP, Douglas CW. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33(1):8-13.

Almeida PF, Franca MP, Santos SP, Moreira RS, Tunes UR. Streptococci microbiota associated with initial formation of dental plaque. *Rev Cienc Med Biol.* 2002;1(1):33-41.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Alves de Souza R, Borges de Araujo Magnani MB, Nouer DF, Oliveira da Silva C, Klein MI, Sallum EA, et al. Periodontal and microbiologic evaluation of 2 methods of archwire ligation: ligature wires and elastomeric rings. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;134(4):506-12.

Alves KM, Goursand D, Zenobio EG, Cruz RA. Effectiveness of procedures for the chemical-mechanical control of dental biofilm in orthodontic patients. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(2):41-8.

Atack NE, Sandy JR, Addy M. Periodontal and microbiological changes associated with the placement of orthodontic appliances. A review. *J Periodontol.* 1996;67(2):78-85.

Attin R, Thon C, Schlagenhauf U, Werner C, Wiegand A, Hannig C, et al. Recolonization of mutans streptococci on teeth with orthodontic appliances after antimicrobial therapy. *Eur J Orthod.* 2005;27(5):489-93.

Bahoum A, Bahije L, Zaoui F. [Enamel demineralization in orthodontics. Systematic use of fluoride in prevention and treatment]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2012;122(10):937-47. French, German.

Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004;9:1267-77.

Baptista A, Kato IT, Prates RA, Suzuki LC, Raelle MP, Freitas AZ, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):584-9.

Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, et al. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci.* 2001;109(6):388-92.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):1001-9.

Bello-Silva MS, de Freitas PM, Aranha AC, Lage-Marques JL, Simoes A, de Paula Eduardo C. Low- and high-intensity lasers in the treatment of herpes simplex virus 1 infection. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):135-9.

Benham AW, Campbell PM, Buschang PH. Effectiveness of pit and fissure sealants in reducing white spot lesions during orthodontic treatment. A pilot study. *Angle Orthod.* 2009;79(2):338-45.

Bensen P. Evaluation of white spot lesions on teeth with orthodontic brackets. *Semin Orthod* 2008;14:200–8

Benson PE, Pender N, Higham SM. An in situ caries model to study demineralisation during fixed orthodontics. *Clin Orthod Res.* 1999;2(3):143-53.

Benson PE, Shah AA, Millett DT, Dyer F, Parkin N, Vine RS. Fluorides, orthodontics and demineralization: a systematic review. *J Orthod.* 2005;32(2):102-14.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J.* 2008;41(3):227-39.

Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera Jr A, Teodoro GR, Zangaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(6):513-8.

Beyth N, Redlich M, Harari D, Friedman M, Steinberg D. Effect of sustained-release chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(3):345-8.

Birang R, Shahaboui M, Kiani S, Shadmehr E, Naghsh N. Effect of Nonsurgical Periodontal Treatment Combined With Diode Laser or Photodynamic Therapy on Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Split-Mouth Clinical Trial. *J Lasers Med Sci.* 2015;6(3):112-9.

Boersma JG, van der Veen MH, Lagerweij MD, Bokhout B, Prahl-Andersen B. Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: influencing factors. *Caries Res.* 2005;39(1):41-7.

Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 1995;24:10-33.

Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. London: Gordon and Breach Science Publishers 2000. 305 p.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.

Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ. Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem J.* 1989;261(3):887-96.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005;2(1):1-23.

Chadwick BL, Roy J, Knox J, Treasure ET. The effect of topical fluorides on decalcification in patients with fixed orthodontic appliances: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;128(5):601-6; quiz 70.

Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. Enamel demineralization during orthodontic treatment. Aetiology and prevention. *Aust Dent J.* 1997;42(5):322-7.

Chang HS, Walsh LJ, Freer TJ. The effect of orthodontic treatment on salivary flow, pH, buffer capacity, and levels of mutans streptococci and lactobacilli. *Aust Orthod J.* 1999;15(4):229-34.

Chapman JA, Roberts WE, Eckert GJ, Kula KS, Gonzalez-Cabezas C. Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(2):188-94.

Chatterjee R, Kleinberg I. Effect of orthodontic band placement on the chemical composition of human incisor tooth plaque. *Arch Oral Biol.* 1979;24(2):97-100.

Chen H, Liu X, Dai J, Jiang Z, Guo T, Ding Y. Effect of remineralizing agents on white spot lesions after orthodontic treatment: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;143(3):376-82. e3.

Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5:141-7.

Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187-97.

Corbett JA, Brown LR, Keene HJ, Horton IM. Comparison of *Streptococcus mutans* concentrations in non-banded and banded orthodontic patients. *J Dent Res.* 1981;60(12):1936-42.

Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araujo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(1):67-74.

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

Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame Jr M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida*

albicans and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011;56(11):1299-305.

Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochem Photobiol.* 1987;46(3):345-52.

Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6(3-4):170-88.

Derks A, Kuijpers-Jagtman AM, Frencken JE, Van't Hof MA, Katsaros C. Caries preventive measures used in orthodontic practices: an evidence-based decision? *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132(2):165-70.

DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 2002; 233-234:351-71

Devulapalle KS, Goodman SD, Gao Q, Hemsley A, Mooser G. Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci.* 1997;6(12):2489-93.

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

Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent.* 1992;68(4):683-91.

Edgerton M, Lo SE, Scannapieco FA. Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(4):443-9.

Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on

bracket materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;108(4):351-60.

Engelmann FM, Mayer I, Gabrielli DS, Toma HE, Kowaltowski AJ, Araki K, et al. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39(2):175-85.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131(7):887-99.

Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J Dent Res.* 1960;39:923-35.

Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960;61:9-19.

Forsberg CM, Brattstrom V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli*. *Eur J Orthod.* 1991;13(5):416-20.

Fournier A, Payant L, Bouclin R. Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;114(4):414-7.

Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(4):e193-8.

George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8(6):788-95.

Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):281-7.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973;18(11):1357-64.

Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod.* 1982;81(2):93-8.

Grande R, Pacella S, Di Giulio M, Rapino M, Di Valerio V, Cellini L, et al. NF- κ B mediated down-regulation of collagen synthesis upon HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) treatment of primary human gingival fibroblast/*Streptococcus mutans* co-cultured cells. *Clin Oral Investig.* 2015;19(4):841-9.

Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47722.

Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4121-8.

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

Guzman-Armstrong S, Chalmers J, Warren JJ. Ask us. White spot lesions: prevention and treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(6):690-6.

Gwinnett AJ, Ceen RF. Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study. *Am J Orthod.* 1979;75(6):667-77.

Habiboallah G, Mahdi Z, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Sina F, Majid Z. Bactericidal effect of visible light in the presence of erythrosine on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* compared with diode laser, an in vitro study. *Laser Ther.* 2014;23(4):263-71.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):331-84.

Ishiyama K, Nakamura K, Ikai H, Kanno T, Kohno M, Sasaki K, et al. Bactericidal action of photogenerated singlet oxygen from photosensitizers used in plaque disclosing agents. *PLoS One.* 2012;7(5):e37871.

Jordan C, LeBlanc DJ. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(2):65-71.

Jordan CN. Prevention of white spot enamel formation during orthodontic treatment. *Gen Dent.* 1998;46(5):498-502.

Jorge AOC. *Microbiologia e imunologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. 384 p.

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(5):468-81.

Julien KC, Buschang PH, Campbell PM. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2013;83(4):641-7.

Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):877-84.

Jurela A, Repic D, Pejda S, Juric H, Vidakovic R, Matic I, et al. The effect of two different bracket types on the salivary levels of *S mutans*

and *S. sobrinus* in the early phase of orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2013;83(1):140-5.

Kalesinskas P, Kacergius T, Ambrozaitis A, Peciuliene V, Ericson D. Reducing dental plaque formation and caries development. A review of current methods and implications for novel pharmaceuticals. *Stomatologija.* 2014;16(2):44-52.

Kimura M, Miyajima K, Kojika M, Kono T, Kato H. Photodynamic Therapy (PDT) with Chemotherapy for Advanced Lung Cancer with Airway Stenosis. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25466-75.

Kirschneck C, Christl JJ, Reicheneder C, Proff P. Efficacy of fluoride varnish for preventing white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment with fixed appliances-a prospective randomized controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2016 Jan 30. [Epub ahead of print]

Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One.* 2010;5(10):e13478.

Knosel M, Attin R, Becker K, Attin T. External bleaching effect on the color and luminosity of inactive white-spot lesions after fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2007;77(4):646-52.

Knosel M, Forslund L, Jung K, Ziebolz D. Efficacy of different strategies in protecting enamel against demineralization during fixed orthodontic treatment. *J Orofac Orthop.* 2012;73(3):194-203.

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

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013;92(12):1065-73.

Krishnan V. Orthodontic pain: from causes to management--a review. *Eur J Orthod.* 2007;29(2):170-9.

Kübler AC. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application* 2005;20:37-45.

Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida NM, Sanchez-Perez L, Alanis-Tavira J. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(6):e924-9.

Lee SJ, Kho HS, Lee SW, Yang WS. Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;119(1):59-66.

Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci*. 2012;4(4):196-201.

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

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.

Longo JP, Leal SC, Simioni AR, de Fatima Menezes Almeida-Santos M, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):575-84.

Lovrov S, Hertrich K, Hirschfelder U. Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment - Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters. *J Orofac Orthop*. 2007;68(5):353-63.

Lucchese A, Gherlone E. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod*. 2013;35(5):664-8.

Mahajan A, Singh B, Kashyap D, Kumar A, Mahajan P. Interspecies communication and periodontal disease. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:765434.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*. 2007;22(2):83-91.

Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(10):907-17.

Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies RM, et al. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol*. 2009;107(5):1569-78.

Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Lasers Surg Med*. 2012;44(7):588-96.

Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P, Ribeiro MS. Photodynamic therapy can be effective as a treatment for herpes simplex labialis. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):357-63.

Marotti J, Sperandio FF, Fregnani ER, Aranha AC, de Freitas PM, Eduardo Cde P. High-intensity laser and photodynamic therapy as a treatment for recurrent herpes labialis. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):439-44.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-94.

Marsh PD, Bevis RA, Newman HN, Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA. Antibacterial activity of some plaque-disclosing agents and dyes. *Caries Res*. 1989;23:348-50.

Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*. 2011;55(1):16-35.

Mattingly JA, Sauer GJ, Yancey JM, Arnold RR. Enhancement of *Streptococcus mutans* colonization by direct bonded orthodontic appliances. *J Dent Res*. 1983;62(12):1209-11.

Maxfield BJ, Hamdan AM, Tufekci E, Shroff B, Best AM, Lindauer SJ. Development of white spot lesions during orthodontic treatment: perceptions of patients, parents, orthodontists, and general dentists. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(3):337-44.

Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B*. 2005;79(2):159-70.

Melrose CA, Appleton J, Lovius BB. A scanning electron microscopic study of early enamel caries formed in vivo beneath orthodontic bands. *Br J Orthod*. 1996;23(1):43-7.

Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(1):190-2.

Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(10):e380-8.

Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):522-7.

Mitchell L. Decalcification during orthodontic treatment with fixed appliances: an overview. *Br J Orthod*. 1992;19(3):199-205.

Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(3):219-30.

Mizrahi E. Enamel demineralization following orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1982;82(1):62-7.

Mizrahi E. Surface distribution of enamel opacities following orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1983;84(4):323-31.

Muhammad OH, Rocca JP, Fornaini C, Medioni E. Evolution of the role of phototherapy during endodontic decontamination. *Laser Ther.* 2015;24(4):291-302.

Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012;9(2):122-31.

Nalbantgil D, Oztoprak MO, Cakan DG, Bozkurt K, Arun T. Prevention of demineralization around orthodontic brackets using two different fluoride varnishes. *Eur J Dent.* 2013;7(1):41-7.

Nishimura J, Saito T, Yoneyama H, Bai L, Okumura K, Isogai E. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and related bacteria. *Adv Microbiol.* 2012;2:208-15.

Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z, Ehrenberg B. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochem Photobiol.* 1992;55(1):89-96.

Noro Filho GA, Casarin RC, Casati MZ, Giovani EM. PDT in non-surgical treatment of periodontitis in HIV patients: a split-mouth, randomized clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2012;44(4):296-302.

Núñez S, Ribeiro M, Garcez A. Terapia fotodinâmica antimicrobiana na Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 312 p.

O'Reilly MM, Featherstone JD. Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: an in vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1987;92(1):33-40.

O'Riordan K, Sharlin DS, Gross J, Chang S, Errabelli D, Akilov OE, et al. Photoinactivation of Mycobacteria in vitro and in a new murine model of localized Mycobacterium bovis BCG-induced granulomatous infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(5):1828-34.

Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39(1):1-18.

Ogaard B. Prevalence of white spot lesions in 19-year-olds: a study on untreated and orthodontically treated persons 5 years after treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1989;96(5):423-7.

Ogaard B, Larsson E, Henriksson T, Birkhed D, Bishara SE. Effects of combined application of antimicrobial and fluoride varnishes in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(1):28-35.

Ogaard B, Rolla G, Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988a;94(1):68-73.

Ogaard B, Rolla G, Arends J, ten Cate JM. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 2. Prevention and treatment of lesions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988b;94(2):123-8.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006;85(10):878-87.

Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Ultrastructure of the intact surface zone of white spot and brown spot carious lesions in human enamel. *J Oral Pathol.* 1986;15(1):28-35.

Pandis N, Papaioannou W, Kontou E, Nakou M, Makou M, Eliades T. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *Eur J Orthod.* 2010;32(1):94-9.

Pandis N, Vlachopoulos K, Polychronopoulou A, Madianos P, Eliades T. Periodontal condition of the mandibular anterior dentition in patients with conventional and self-ligating brackets. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(4):211-5.

Papapioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod.* 2007;77(6):1090-5.

Paschoal MA, Moura CM, Jeremias F, Souza JF, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study. *Lasers Med Sci.* 2015;30(8):2059-65.

Paschoal MA, Santos-Pinto L, Lin M, Duarte S. *Streptococcus mutans* photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(3):175-80.

Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(3):313-9.

Pellegrini P, Sauerwein R, Finlayson T, McLeod J, Covell Jr DA, Maier T, et al. Plaque retention by self-ligating vs elastomeric orthodontic brackets: quantitative comparison of oral bacteria and detection with adenosine triphosphate-driven bioluminescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;135(4):426 e1-9; discussion -7.

Pender N. Aspects of oral health in orthodontic patients. *Br J Orthod.* 1986;13(2):95-103.

Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):859-64.

Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. *New Microbiol.* 1997;20(1):55-62.

Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(4):187-95.

Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100(1):35-7.

Rossi LM, Silva PR, Vono LL, Fernandes AU, Tada DB, Baptista MS. Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties, and singlet oxygen generation. *Langmuir.* 2008;24(21):12534-8.

Rossoni RD, Junqueira JC, Santos EL, Costa AC, Jorge AO. Comparison of the efficacy of Rose Bengal and erythrosin in photodynamic therapy against Enterobacteriaceae. *Lasers Med Sci.* 2010;25(4):581-6.

Salva KA. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol.* 2002;20(5):571-81.

Sandham HJ, Nadeau L, Phillips HI. The effect of chlorhexidine varnish treatment on salivary mutans streptococcal levels in child orthodontic patients. *J Dent Res.* 1992;71(1):32-5.

Savellano MD, Hasan T. Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates. *Photochem Photobiol.* 2003;77(4):431-9.

Schachtele CF, Nobbs A, Zhang Y, Costalonga M, Herzberg MC. Oral streptococci comensals and opportunistic pathogens. Norfolk, VA: Horizon Scientific Press; 2007.

Schachtele CF, Jensen ME. Comparison of methods for monitoring changes in the pH of human dental plaque. *J Dent Res.* 1982;61(10):1117-25.

Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Scheie AA, Arneberg P, Krogstad O. Effect of orthodontic treatment on prevalence of *Streptococcus mutans* in plaque and saliva. *Scand J Dent Res.* 1984;92(3):211-7.

Schindl A, Neumann R. Low-intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Invest Dermatol.* 1999;113(2):221-3.

Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1998;25(1):52-8.

Shinaishin SF, Ghobashy SA, El-Bialy TH. Efficacy of light-activated sealant on enamel demineralization in orthodontic patients: an atomic force microscope evaluation. *Open Dent J.* 2011;5:179-86.

Shungin D, Olsson AI, Persson M. Orthodontic treatment-related white spot lesions: a 14-year prospective quantitative follow-up, including bonding material assessment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(2):136. e1-8; discussion -7.

Silva JR, Cardoso G, Maciel RR, de Souza NC. Morphological alterations on *Citrobacter freundii* bacteria induced by erythrosine dye and laser light. *Lasers Med Sci.* 2015;30(1):469-73.

Silva PC, De Fatima Zanirato Lizarelli R, Moriyama LT, De Toledo Porto Neto S, Bagnato VS. Temperature analysis during bonding of brackets using LED or halogen light base units. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):41-6.

Smiech-Slomkowska G, Jablonska-Zrobek J. The effect of oral health education on dental plaque development and the level of caries-related *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *Eur J Orthod.* 2007;29(2):157-60.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology* 2000. 2011;55(1):143-66.

Sperandio FF, Marotti J, Aranha AC, Eduardo Cde P. Photodynamic therapy for the treatment of recurrent herpes labialis: preliminary results. *Gen Dent.* 2009;57(4):415-9.

Suci P, Kang S, Gmur R, Douglas T, Young M. Targeted delivery of a photosensitizer to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2489-96.

Sudhakara Reddy R, Ramya K, Ramesh T, Subbarayudu G, Sai Madhavai N, Sai Kiran Ch. Photo dynamic therapy in oral diseases *Int J Biol Med Res.* 2012;3(2):1875-83.

Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod.* 2001;23(5):475-84.

Susila AV, Sugumar R, Chandana CS, Subbarao CV. Combined effects of photodynamic therapy and irrigants in disinfection of root canals. *J Biophotonics.* 2015 Aug 3. doi:10.1002/jbio.201500112. [Epub ahead of print]

Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205(1):139-46.

Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol* 2000. 2009;51:109-40.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1028-37.

Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LH, Baptista MS. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(4):528-31.

Tavares A, Carvalho CM, Faustino MA, Neves MG, Tome JP, Tome AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010;8(1):91-105.

Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(1):1-6.

Trindade FZ, Pavarina AC, Ribeiro AP, Bagnato VS, Vergani CE, Costa CA. Toxicity of photodynamic therapy with LED associated to Photogem(R): an in vivo study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(2):403-11.

Tufekci E, Dixon JS, Gunsolley JC, Lindauer SJ. Prevalence of white spot lesions during orthodontic treatment with fixed appliances. *Angle Orthod.* 2011;81(2):206-10.

Turkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 2005;75(2):231-6.

Uchoa AF, Oliveira CS, Baptista MS. Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. *J Porphyr Phthalocyanines.* 2010;14:832-45

Ulukapi H, Koray F, Efes B. Monitoring the caries risk of orthodontic patients. *Quintessence Int.* 1997;28(1):27-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):165-73.

Uzuner FD, Kaygisiz E, Cankaya ZT. Effect of the bracket types on microbial colonization and periodontal status. *Angle Orthod.* 2014;84(6):1062-7.

van Dijk J, Herkstroter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. An in vivo study in beagle dogs. *J Clin Periodontol.* 1987;14(5):300-4.

van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res.* 1994;73(3):672-81.

Wainwright M, Crossley KB. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother.* 2002;14(5):431-43.

Wainwright M, Giddens RM. Phenothiazinium photosensitizers: choice in synthesis application. *Dyes Pigm.* 2003;57:245-57.

Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;160(2):177-81.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(1):13-28.

Weerakoon AT, Meyers IA, Symons AL, Walsh LJ. Pulpal heat changes with newly developed resin photopolymerisation systems. *Aust Endod J.* 2002;28(3):108-11.

Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 2008;53(9):R61-109.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993;75(4):299-306.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(5):412-8.

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

Yassunaka NN, de Freitas CF, Rabello BR, Santos PR, Caetano W, Hioka N, et al. Photodynamic Inactivation Mediated by Erythrosine and its Derivatives on Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria. *Curr Microbiol.* 2015;71(2):243-51.

Zach L, Cohen G. Pulp Response to Externally Applied Heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;19:515-30.

Zachrisson BU. Fluoride application procedures in orthodontic practice, current concepts. *Angle Orthod.* 1975;45(1):72-81.

Zachrisson BU, Zachrisson S. Caries incidence and oral hygiene during orthodontic treatment. *Scand J Dent Res.* 1971;79(6):394-401.

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

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

Zvanych R, Lukenda N, Li X, Kim JJ, Tharmarajah S, Magarvey NA. Systems biosynthesis of secondary metabolic pathways within the oral

human microbiome member *Streptococcus mutans*. *Mol Biosyst.* 2015;11(1):97-104.

ANEXO A – Termo de doação de dentes



TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP.

Declaro que doei 40 terceiros molares à pesquisadora Maria Ângela Lacerda Rangel Esper a fim de viabilizar a execução da pesquisa intitulada "Inativação Fotodinâmica de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre bráquetes metálicos e cerâmicos – um estudo *in vitro*". Igualmente declaro que estes dentes foram extraídos previamente ao meu conhecimento da pesquisa supracitada, por indicação clínica e independente da mesma, sendo armazenados em frasco único, o que impossibilita a identificação dos indivíduos dos quais os dentes foram extraídos.

São José dos Campos, 30 de outubro de 2014

Eduardo Rennó Teixeira

Dr. Eduardo Rennó Teixeira - CRO - SP 63599 - Rua Ten. Aécio Lemes de Souza, 20 - Jardim Paulista - São José dos Campos - Fone 12- 3922-5804- CPF: 251 308 868-75.

ANEXO B - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

<p>INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP</p> 										
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA										
Título da Pesquisa: INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE BIOFILME DE STREPTOCOCCUS MUTANS SOBRE BRÁQUETES METÁLICOS E CERÂMICOS - um estudo in vitro										
Pesquisador: MARIA ÂNGELA LACERDA RANGEL ESPER										
Área Temática:										
Versão: 2										
CAAE: 44832215.0.0000.0077										
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP										
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio										
DADOS DO PARECER										
Número do Parecer: 1.190.860										
Apresentação do Projeto:										
A utilização da PDT para o tratamento de infecções apresenta vantagens sobre os tratamentos terapêuticos convencionais. Ela promove uma ação antimicrobiana efetiva sem o desenvolvimento de resistência microbiana, podem ser utilizadas repetidas doses sem a necessidade de limitação da dose total, não ocorrendo resistência com a repetição do tratamento.										
Objetivo da Pesquisa:										
O objetivo deste estudo in vitro é avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica com eritrosina (ER) e a hematoporfirina IX (HP) usando um diodo emissor de luz (LED) em culturas planctônicas e biofilme de S. mutans.										
Avaliação dos Riscos e Benefícios:										
Não existem riscos pois será realizado um estudo in vitro. Benefícios: Verificar a eficácia de novo fotossensibilizador que poderá ser utilizado na clínica em várias áreas da Odontologia (Dentística, Ortodontia, Prótese, Periodontia) para a prevenção de manchas brancas, cáries, prevenção de doença periodontal.										
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:										
O projeto é viável e sua execução pode trazer importantes benefícios a pesquisadores e clínicos em odontologia. A pesquisadora esclareceu a dúvida quanto à quantidade de dentes a serem empregados, que										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777</td> <td>CEP: 12.245-000</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Jardim São Dimas</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO JOSE DOS CAMPOS</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (12)3947-9078</td> <td>Fax: (12)3947-9010</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: ceph@fosjc.unesp.br</td> </tr> </table>	Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777	CEP: 12.245-000	Bairro: Jardim São Dimas		UF: SP	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS	Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010		E-mail: ceph@fosjc.unesp.br
Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777	CEP: 12.245-000									
Bairro: Jardim São Dimas										
UF: SP	Município: SAO JOSE DOS CAMPOS									
Telefone: (12)3947-9078	Fax: (12)3947-9010									
	E-mail: ceph@fosjc.unesp.br									
Página 01 de 03										

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 1.190.880

foi descrita no escopo do trabalho. Enviou o termo de doação de 40 dentes e, elaborou o cronograma de atividades porém, não detalhou neste todas as etapas até a conclusão final da pesquisa. Isto é fundamental ao CEPH pois, será necessário o envio de relatórios parcial e final ao comitê e, portanto é importante a ciência deste do cronograma completo de atividades.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não cabe pois, como relatado pela pesquisadora, não se trata de pesquisa em indivíduos.

Recomendações:

Recomendo a aprovação do projeto entretanto, a pesquisadora deve atualizar o cronograma de atividades para que este possibilite uma visão de todas as etapas da pesquisa. Solicita-se que para o relatório parcial seja apresentado o referido cronograma de atividades devidamente adequado conforme explicitado acima.

A pesquisadora deverá apresentar relatórios parciais ou final, de acordo com o seu cronograma, lembrando que os parciais são a cada seis meses. Os relatórios deverão ser anexados na plataforma Brasil, sobre a forma de notificação, de acordo com o modelo da CONEP.

No caso de não cumprimento da obrigação, ficará impedido de submeter novos projetos via plataforma Brasil, até que a pendência seja sanada

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu às solicitações do relator e, o mesmo recomenda a aprovação por este comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	6 Projeto 2013.docx	17/02/2015 12:37:52		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298721.pdf	17/02/2015 15:10:26		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto Plat Brasil.pdf	04/05/2015 20:57:51		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_298721.pdf	04/05/2015 20:58:35		Aceito

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** caph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 1.190.880

Declaração de Pesquisadores	Termo doação de dentes 2.pdf	18/06/2015 14:15:33		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_298721.pdf	26/06/2015 20:22:50		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo doação de dentes 1.pdf	18/06/2015 14:14:56		Aceito

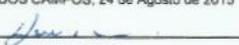
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 24 de Agosto de 2015


Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

Endereço: Av Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimes CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-3076 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cepn@focp.unesp.br

Página 03 de 03