



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

GABRIELA SANTANA DE PAULA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS, LASER OU LED EM
BIOFILME DE MICRO-ORGANISMOS COLONIZADORES INICIAIS**

PIRACICABA

2019

GABRIELA SANTANA DE PAULA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS, LASER OU LED EM
BIOFILME DE MICRO-ORGANISMOS COLONIZADORES INICIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Steiner O. Alarcon

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA GABRIELA SANTANA DE PAULA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CAROLINA STEINER O. ALARCON.

PIRACICABA
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P281e Paula, Gabriela Santana de, 1996-
Efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associado à nanopartículas, laser ou LED em biofilme de micro-organismos colonizadores iniciais / Gabriela Santana de Paula. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Carolina Steiner Oliveira Alarcon.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilmes. 2. Fototerapia. 3. *Streptococcus sanguis*. 4. *Streptococcus oralis*. 5. *Streptococcus mitis*. I. Steiner-Oliveira, Carolina, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Phototherapy

Streptococcus sanguis

Streptococcus oralis

Streptococcus mitis

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos, minha madrasta e a Deus, por todo apoio, sem o qual, esse sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Carolina Steiner O. Alarcon pela orientação, dedicação e disponibilidade, uma profissional por quem tenho uma grande admiração.

Agradeço ao Ms. Mateus Cardoso Oliveira e a Ms. Luciana S. Sales pela orientação, paciência, disponibilidade e dedicação na condução do trabalho. A ajuda de vocês foi excepcional.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, a todo corpo docente pelo aprendizado, direção e administração.

Agradeço a meus pais, Mauro e Terezinha, a minha Madrasta, Eliane, e aos meus irmãos, Caroline, Isabella e Pedro, que me acompanharam e apoiaram, o que foi fundamental para chegar até aqui.

Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo, nos piores e melhores momentos, sempre ajudando e acompanhando de perto, sem eles eu não conseguiria chegar até aqui, em especial a Natalia, Beatriz, Emanuella, Laís, João Pedro e Giovana.

Agradeço ao PIBIC/ CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

RESUMO

A cárie dentária é uma doença bucal biofilme-dependente. Dessa forma, técnicas de controle do biofilme inovadoras são importantes para prevenir essa doença. Os efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) já demonstraram a suscetibilidade bacteriana à morte quando se utiliza agentes fotossensíveis ativados por uma fonte de luz; porém, a associação de nanopartículas ao agente fotossensível num biofilme inicial ainda não foi estudada. Assim, o objetivo deste estudo foi testar o efeito da TFDA em biofilme bucal formado com micro-organismos colonizadores iniciais utilizando azul de metileno associado à nanopartículas de β -ciclodextrina e fontes de luz laser ou LED vermelhos ($\lambda = 660 \text{ nm}$). Os grupos foram divididos em ($n = 6$): C- (Controle negativo, NaCl 0,9%), CX (controle positivo, clorexidina 0,2%), L (Laser), LED (*light emitting diode*), F (Fotossensibilizador/Nanopartícula), LF (Laser + Fotossensibilizador/Nanopartícula) e LEDF (LED + Fotossensibilizador/Nanopartícula). O biofilme multiespécies composto por *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis* foi cultivado em placa de 48 poços contendo BHI suplementado com sacarose a 1% por 24h. A redução dos micro-organismos foi avaliada pela contagem de micro-organismos viáveis do biofilme antes e após a TFDA em meios de cultura seletivos. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilks e os resultados foram submetidos às análises de variância Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, com nível de significância de 5%. Os grupos LF e LEDF foram capazes de reduzir a contagem de micro-organismos do biofilme, pois diferiram significativamente do grupo controle negativo e não diferiram estatisticamente do controle positivo. A TFDA mediada por azul de metileno conjugado à β -ciclodextrina irradiada por LASER ou LED foi eficaz na redução microbiana de biofilme multiespécie composto por micro-organismos colonizadores iniciais.

Palavras-chave: Biofilmes. Fototerapia. *Streptococcus sanguis*. *Streptococcus oralis*. *Streptococcus mitis*. *Streptococcus gordonii*.

ABSTRACT

Dental caries is a biofilm-dependent oral disease. Thus, innovative biofilm control techniques are important to prevent this disease. The effects of antimicrobial photodynamic therapy (ADHD) have already demonstrated bacterial susceptibility to death when using photosensitive agents activated by a light source; however, the association of nanoparticles with the photosensitive agent in an initial biofilm has not been studied. Thus, the aim of this study was to test the effect of PACT on the oral biofilm formed with early colonizing microorganisms using methylene blue associated with β -cyclodextrin nanoparticles and red light sources laser or LED ($\lambda = 660$ nm). The groups were divided into (n = 6): C- (negative control, 0.9% NaCl), CX (positive control, 0.2% chlorhexidine), L (Laser), LED (*light emitting diode*), P (Photosensitizer / Nanoparticle), LP (Laser + Photosensitizer / Nanoparticle) and LEDP (LED + Photosensitizer / Nanoparticle). Multispecies biofilm composed of *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* and *S. sanguinis* was grown in 48-well plates containing BHI supplemented with 1% sucrose for 24h. Microorganism reduction was assessed by counting viable biofilm microorganisms before and after PACT in selective culture media. Data normality was assessed by the Shapiro-Wilks test and the results were submitted to Kruskal-Wallis analysis, followed by Dunn's test, with a significance level of 5%. Groups LP and LEDP were able to reduce the biofilm microorganism counts because they significantly differed from the negative control group, and did not statistically differ from the positive control group. PACT mediated by β -cyclodextrin-conjugated methylene blue irradiated with LASER or LED- was effective in microbial reduction of multispecies biofilm composed of initial colonizing microorganisms.

Key words: Biofilms. Phototherapy. Streptococcus sanguis. Streptococcus oralis. Streptococcus mitis. Streptococcus gordonii.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Cárie dentária	11
2.2 Micro-organismos colonizadores iniciais	11
2.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)	12
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Delineamento experimental	16
4.2 Formação do biofilme bacteriano	16
4.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)	17
4.4 Análise do biofilme	18
4.5 Análise estatística	18
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	20
7 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXOS	
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	28
Anexo 2 – Iniciação Científica	29

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é um dos problemas bucais mais importantes e prevalentes na população e é biofilme-dependente (Koo et al., 2013). Essa doença é resultante de interações da dieta (açúcares), de micro-organismos e fatores do hospedeiro que modulam a dinâmica formação do biofilme nas superfícies dentárias, agravando-se na presença de sacarose, por tornar o biofilme mais espesso e virulento (Paes Leme et al., 2006, Koo et al., 2013). Os micro-organismos residentes e protegidos na matriz dos biofilmes são mais resistentes aos antimicrobianos e são altamente acidúricos e acidogênicos; esses micro-organismos também servem de reservatórios para agentes patogênicos e toxinas, tornando-os de difícil remoção da superfície dentária. Com isso, o controle do biofilme bucal é de extrema importância para a Odontologia, já que as consequências do seu estabelecimento constituem doenças bucais biofilme-dependentes dispendiosas em todo o mundo (Koo et al., 2013). A remoção mecânica do biofilme bacteriano por meio de uma boa higiene bucal é o tratamento mais comum disponível. No entanto, isoladamente, não é capaz de controlar as doenças bucais devido à falta de cooperação do paciente (Løe, 2000).

Assim, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) pode ser uma alternativa promissora para a redução e/ou desorganização de micro-organismos do biofilme dentário. A terapia fotodinâmica envolve agentes fotossensíveis que são ativados pela irradiação por uma fonte de luz de comprimento de onda específico para gerar espécies citotóxicas, incluindo oxigênio singlete e radicais livres. Esses produtos são capazes de danificar componentes essenciais das células ou modificar as atividades metabólicas de modo irreversível, podendo resultar em morte bacteriana (Castano et al., 2004). Além disso, esse mecanismo de ação de morte bacteriana mediado por agentes fotossensíveis ativados por luz dificulta o desenvolvimento de resistência bacteriana, já que essa é uma limitação dos antimicrobianos convencionais (Wilson, 2004).

Vários agentes fotossensíveis têm sido propostos para a TFDA no biofilme e mostrado bons resultados. Dentre eles, o azul de toluidina (O'Neill et al., 2002; Zanin et al., 2005, 2006; Qin et al., 2008; Teixeira et al., 2012) e o azul de metileno (Wood et al., 2006; Müller et al., 2007; Fontana et al., 2009, Leal et al., 2017; Nemezio et al., 2017; Vasconcelos et al., 2019). Uma consequência clínica importante da organização estrutural dos micro-organismos numa comunidade de biofilme é a reduzida susceptibilidade das células aos agentes fotossensíveis e antimicrobianos. Além disso, a idade do biofilme também pode restringir a penetração desses agentes e deixar as células mais profundas relativamente intocadas (O'Neill et al., 2002; Williams et al., 2004; Tonon et al., 2015). Dessa forma, a TFDA é menos propensa a funcionar em biofilmes devido à limitada penetração do agente

fotossensível dentro desta comunidade e devido à deficiente propagação da luz através dos tecidos mais organizados (Melo et al., 2013; Nogueira et al., 2013).

Sendo assim, novas abordagens inovadoras estão sendo desenvolvidas para manter os agentes terapêuticos no tecido alvo, de forma ativa, para terem duração suficiente para exercer seu efeito terapêutico completo. Uma delas é a associação do agente fotossensível à nanopartículas para potencializar seu efeito na TFDA. O azul de metileno é um agente fotossensível com significativa ação letal quando ativado por luz (absorção na região vermelha do espectro de luz visível $\lambda = \sim 660$ nm) em diferentes tipos de bactérias envolvidas nas doenças bucais (Wilson, 2004). Nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno e luz laser vermelho foi capaz de promover redução de *Streptococcus mutans* tanto em biofilme mono ou multiespécies e que a presença da nanopartícula β -ciclodextrina pode ter um papel importante em potencializar a TFDA (Vasconcelos et al., 2019). Em outro estudo, também encontramos que a TFDA mediada por azul de metileno associada à nanopartículas de β -ciclodextrina foi eficaz na redução de *S. mutans* no modelo dinâmico de biofilme e que tanto as fontes de luz laser e LED foram efetivas na redução de *S. mutans* (Moreira et al., 2018).

A TFDA objetiva promover a redução dos micro-organismos do biofilme dentário. Há evidências crescentes de que a microbiota bucal natural tem uma relação simbiótica ou de mutualismo com o hospedeiro. No entanto, em certas ocasiões como maior frequência de ingestão de açúcar ou uma redução no fluxo de saliva, essa simbiose do biofilme pode ser perturbada, provocando uma disbiose e a doença pode ocorrer (Marsh, 2015). A coagregação bacteriana promove uma sequência específica de colonização por bactérias bucais, sendo que no biofilme dentário, os *Streptococcus* spp., dentre outros, são considerados colonizadores primários e aderem à película adquirida (Nyvad e Kilian 1987; Diaz et al. 2006; Periasamy e Kolenbrander 2010). Dessa forma, torna-se de grande relevância estudar os efeitos da TFDA, na presença de nanopartículas de β -ciclodextrina, em biofilmes multiespécies de micro-organismos colonizadores iniciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cárie dentária

A cárie dentária surgiu devido ao acesso universal aos carboidratos fermentáveis e, juntamente com a doença periodontal, têm causado sofrimentos, destruições e perda dentária para a população (Löe, 2000). A cárie dentária tem como principal fator ambiental envolvido no seu desenvolvimento a exposição frequente aos carboidratos (Fejerskov, 2004). Entretanto, entre os carboidratos, a sacarose é considerada a mais cariogênica, por sintetizar polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares que geram mudanças na composição da matriz do biofilme tornando-o mais cariogênico (Paes Leme et al., 2006). “Os biofilmes são comunidades microbianas heteromórficas ligadas à superfície incorporada em um material de matriz exopolimérica composto principalmente de extensos polissacarídeos” (Donlan, 2002). Essa matriz facilita a montagem de estruturas multicelulares tridimensionais, a formação de microambientes e adesão à estrutura dentária; também, a atividade metabólica presente nessa matriz leva a acidificação do meio e, consequentemente, a dissolução do esmalte (Koo et al., 2013). A inibição dessa matriz impediria a formação de biofilme e, consequentemente, a acidificação do meio (Koo et al., 2013).

2.2 Micro-organismos colonizadores iniciais

Em 2011, uma revisão de literatura de Takahashi e Nyvad mostrou que, de acordo com a hipótese ecológica, a cárie é dividida em 3 etapas reversíveis. (1) A microflora em superfícies de esmalte é composta por *Streptococcus* não mutans e *Actinomyces*, cuja capacidade de produzir ácidos é relativamente baixa, produzindo um biofilme compatível com a saúde bucal. (2) Já na presença de açúcar, o processo de acidificação se torna frequente, aumentando a acidogenicidade das bactérias não mutans, e, por meio dos processos de seleção e adaptação induzidos por ácidos, podem mudar o equilíbrio no sentido da desmineralização e consequente início do processo da cárie. (3) Sob condições severas de acidez, bactérias como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, bem como cepas acidúricas de *Streptococcus* não mutans, *Actinomyces*, Bifidobactérias, e leveduras podem se tornar dominantes. Portanto, esse estudo mostra que a cárie é um processo causado por uma mudança de uma simbiose mutualística para uma simbiose parasitária com adaptação e seleção do ambiente induzida por ácido. Desta forma, todos os micro-organismos acidogênicos e acidúricos estão envolvidos, não apenas os *Streptococcus mutans*. Em resumo, um controle ambiental que evite a acidificação do ambiente deve ser alcançado, por meio de mecanismos de redução de biofilme, diminuição de ingestão de açúcares e técnicas

da neutralização do pH, como a estimulação salivar. Dessa forma, estudos futuros devem preocupar-se em buscar entender mecanismos fisiológicos para manter a dinâmica de estabilidade em biofilmes dentais.

Em 2013, Koo et al. demonstraram que a matriz de PEC é um determinante essencial para a virulência de um biofilme. Sabe-se que os *Streptococcus mutans* não precisam dominar numericamente os biofilmes, pois as enzimas glicosiltransferases (Gtfs) liberadas, mesmo no início da formação do biofilme, são incorporadas à película dentária e absorvidos por outros micro-organismos. Portanto, a matriz extracelular fornece um arcabouço para o biofilme em crescimento, promovendo adesão e coesão dos micro-organismos na superfície. Assim, a inibição dessa matriz impediria o desenvolvimento do biofilme, ou até mesmo uma inibição parcial da atividade das Gtfs da superfície poderia reduzir o desenvolvimento da cárie sem prejudicar a microflora oral.

2.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)

A terapia fotodinâmica é abordada na odontologia como uma terapia para reduzir micro-organismos em biofilmes orais (Zanin et al., 2005). Concomitantemente, outros tratamentos são propostos aos pacientes que possuem a doença cárie dentária, tais como a remoção mecânica do biofilme ou uso de antissépticos. Os antissépticos são soluções químicas, baratas e simples de serem encontradas, com um potencial antimicrobiano eficaz (clorexidina, por exemplo). As bactérias organizadas em biofilme apresentam maior resistência microbiana e, no estudo realizado em 2007 por Müller et al., foi constatado que a eliminação de bactérias por meio dos agentes antimicrobianos depende da dose e da idade do biofilme; quanto mais maduro o biofilme mais resistente. Por isso, diferentes terapias inovadoras têm sido utilizadas, como a terapia fotodinâmica, em que foi feita aplicação única, associando azul de metileno com laser de baixa intensidade ($\lambda = 665 \text{ nm}$, 75 mW) em biofilmes formados por multiespécies. Porém, foi observado que mesmo a TFDA não foi capaz de diminuir ou eliminar as bactérias do biofilme totalmente. Levando-se em conta que foi um dos primeiros estudos que testou a terapia fotodinâmica em biofilmes multiespécie, os autores concluíram que a técnica de aplicação da terapia fotodinâmica não foi eficiente na redução microbiana e que outros estudos deveriam ser realizados para melhorar os parâmetros empregados.

Em 2012, Teixeira et al., testaram o efeito da terapia antimicrobiana, utilizando biofilme de *S. mutans* in vitro e in situ, em que 21 voluntários utilizaram dispositivos intraorais para formação de biofilme. Foi utilizado uma luz LED ($\lambda = 665 \text{ nm}$, 40 mW, 55

J/cm²) associada ao fotossensibilizador azul de orto-toluidina. A conclusão desse trabalho foi de que a mesma dose de TFDA foi capaz de eliminar biofilmes cultivados in vitro, porém não eliminou os biofilmes multiespécies cultivados in situ. Portanto, mais estudos devem ser conduzidos detalhando os mecanismos da TFDA e suas dosagens, para então ser utilizados clinicamente.

Em 2014, Cieplik et al., em uma revisão tiveram como objetivo escrever sobre o estado atual das técnicas da TFDA para inativar os biofilmes formados em vitro. Foram revisados 22 estudos, porém todos são de difícil comparação entre si devido a diferentes protocolos de cultivos de micro-organismos, o que leva a formação de biofilmes distintos. Outro ponto foi que em alguns estudos que tratam de inativação de biofilme não foi verificada a presença de polissacarídeos extracelulares, fazendo com que alguns biofilmes não fossem considerados verdadeiramente cariogênicos. Notou-se também que há uma grande diferença entre biofilmes formados em vitro e in vivo, e que a espessura de biofilmes formados em vitro e a quantidade de PEC alteram a eficácia da inativação pela terapia fotodinâmica. Em suma, os achados revisados têm como conclusão que a terapia fotodinâmica é eficaz para inativação de biofilmes formados in vitro, no entanto a aplicação oral ainda está em fase inicial, utilizada em alguns casos como ferramenta de suporte para tratamento de periodontite, peri-implantite ou infecção endodôntica.

Em 2017, de Freitas et al., fizeram uma revisão sobre o efeito da TFDA nos biofilmes monoespécie e multiespécies. Foram revisados 11 artigos, pesquisados nos bancos de dados do Pubmed, usando descritores como terapia fotodinâmica, quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana e fotoinativação, todos associados à palavra biofilme. Alguns trabalhos compararam os fotossensibilizadores, azul de metileno, Photofrin e eritrosina, tendo como resultado a eritrosina como a mais eficaz. A curcumina também foi utilizada como um fotossensibilizador, porém, entre todos, o mais utilizado foi a orto-toluidina. Os resultados mostraram que a terapia fotodinâmica foi eficaz na redução de contagem de *S. mutans* para biofilmes monoespécie, e que os biofilmes multiespécies são mais resistentes à ação da terapia antimicrobiana devido a espessura e complexidade desses biofilmes. Esses resultados podem estar associados ao fotossensibilizador utilizado, ou ao tempo de exposição da terapia, já que o efeito antimicrobiano parece ser dependente da dose. A conclusão foi de que uma solução seria o uso de abordagens de diferentes fotossensibilizadores capazes de penetrar na matriz do biofilme ou ondas fotomecânicas capazes de levar o fotossensibilizador a camadas mais profundas do biofilme.

Em 2018, de Oliveira et al., avaliaram a eficácia da TFDA em micro-organismos de biofilmes em microcosmos dentários a partir de superfícies oclusais dos primeiros molares

permanentes ainda em fase de irrompimento. Para este estudo, foi coletado biofilme dentário do primeiro molar permanente inferior direito parcialmente irrompido. Os biofilmes foram cultivados em ambiente microcosmo sobre blocos de esmalte bovino em meio de cultura acrescido de 1% de sacarose e a TFDA foi aplicada com luz LED ($\lambda = 625 \text{ nm}$, 40 mW, $18,75 \text{ J/cm}^2$ ou $37,5 \text{ J/cm}^2$). Os resultados mostraram que a terapia fotodinâmica mediada por azul de orto-toluídina (TBO) diminuiu significativamente a contagem de micro-organismos em biofilmes de microcosmos dentários. Já o uso de azul de orto-toluídina isolado não afetou a viabilidade bacteriana. As contagens de micro-organismos do grupo com TFDA irradiado com 75 J/cm^2 foram estatisticamente inferiores às contagens do grupo controle. Em suma, a terapia mediada por TBO mostrou-se eficaz para a redução dos micro-organismos, com uma tendência de efeito dose-dependente, sendo assim, eficaz contra os biofilmes em microcosmos dentários de primeiros molares em fase de irrompimento.

Em 2019, Vasconcelos et al., avaliaram se nanopartículas de β -ciclodextrina potencializariam o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em biofilmes orais monoespécie e em microcosmos usando azul de metileno e laser vermelho. A metodologia utilizada foi o cultivo de biofilme em bloco de esmalte contendo *Streptococcus mutans*, ou modelo de microcosmos contendo sacarose. A PACT foi realizada contendo $50 \mu\text{M}$ MB associado ou não a β -ciclodextrina encapsulada com MB a $32 \mu\text{M}$ por 5 min, seguida de irradiação com laser vermelho ($\lambda = 660 \text{ nm}$, 320 J/cm^2). Para avaliação da viabilidade microbiana, foram feitas contagens de microrganismos e os resultados obtidos revelam que os grupos tratados com PACT com ou sem a β -ciclodextrina foram eficazes na redução de *S. mutans*; porém, apesar de a redução microbiana ter sido numericamente substancial, a presença da nanopartícula β -ciclodextrina não potencializou significativamente ($p > 0,05$) o efeito antimicrobiano. Alguns fatores podem ter interferido nesses resultados, dentre eles a densidade de energia utilizada durante a irradiação, o tempo de irradiação, a concentração do fotossensibilizador, além da idade do biofilme (biofilmes maduros) e presença de glicose. A luz isolada também mostrou resultados satisfatórios e isso se deve ao fato de que ela pode desempenhar reações metabólicas e fisiológicas nas células bacterianas. Concluiu-se que a PACT mediada por MB associada a β -ciclodextrina foi capaz de reduzir significativamente *S. mutans* nos biofilmes de microcosmos e, no modelo de biofilme de monoespécie, foi encontrado uma redução significativa de *S. mutans* para todos os grupos quando a luz estava presente. Não houve potencialização do PACT com a adição de nanopartículas β -ciclodextrina, sendo necessárias mais investigações para obtenção de parâmetros de potencialização do efeito da terapia fotodinâmica, na presença da nanopartícula.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno associado à nanopartículas de β -ciclodextrina, laser e LED vermelhos em biofilme bucal formado por micro-organismos colonizadores iniciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Os micro-organismos colonizadores iniciais do biofilme bucal *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* foram padronizados a uma densidade ótica de 0,03A e, posteriormente, cultivados em placas de 96 poços durante 24h. Os grupos de estudo foram divididos da seguinte forma (n = 6): C- (Controle negativo, NaCl 0,9%), CX (controle positivo, clorexidina 0,2%), L (Laser), LED (light emitting diode), F (Fotossensibilizador/Nanopartícula), LF (Laser + Fotossensibilizador/Nanopartícula) e LEDF (LED + Fotossensibilizador/Nanopartícula).

A redução microbiana foi avaliada pela contagem de micro-organismos viáveis em meio seletivo após tratamento, os quais foram conduzidos nos grupos descritos na Tabela 1 (n=3), em triplicata:

Tabela 1 - Divisão dos grupos de acordo com cada tratamento realizado.

	Grupos	LED	Laser	Fotossensibilizador/ Nanopartícula
C	Controle Negativo	-	-	-
CX	Controle Positivo	-	-	-
F	Fotossensibilizador/ nanopartícula	-	-	+
L	Laser	-	+	-
LF	Laser + Fotossensibilizador/ nanopartícula	-	+	+
LED	LED	+	-	-
LEDF	LED + Fotossensibilizador/ nanopartícula	+	-	+

4.2 Formação do biofilme bacteriano

Para indução do biofilme multiespécie foram preparados inicialmente 5 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth, Cat. # 53286 Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), com 500 µL de suspensão de cada micro-organismo cultivado individualmente por 24h. Após o período de incubação, esses micro-organismos foram padronizados a uma concentração D.O 0,03A e cultivados em 24 mL de BHI acrescidos de sacarose a 1% (Sucrose, Cat. # 84100 Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), respectivamente (Stipp et al. 2013). Em seguida, 200 µL do pool de micro-organismos foram

transferidos para os poços da placa de microtitulação com 96 poços (Costar Corning, New York, EUA). A placa foi incubada durante 24h à 37°C em uma condição atmosférica de 10% de CO₂ (Cole-Parmer, Vernon Hills, EUA). Subsequentemente à incubação, as suspensões foram então aspiradas e os poços foram lavados duas vezes com 50 µL de solução salina, para remoção de células fracamente aderidas.

4.3 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA)

A concentração do fotossensibilizador utilizada foi baseada na concentração inibitória mínima do fotossensibilizador associado à nanopartícula de β-ciclodextrina de 32 µM que foi eficaz na TFDA encontrada em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Vasconcelos et al., 2019; Moreira et al., 2018). O fotossensibilizador associado à nanopartícula foi adicionado ao biofilme durante 5 minutos, como tempo de pré-irradiação.

Após a formação do biofilme, o meio de cultura foi retirado dos poços, ficando apenas o biofilme, que foi submetido aos tratamentos (Figura 1). Foi então adicionado fotossensibilizador associado à nanopartícula na quantidade de 20 µM para cada biofilme por 5 minutos aos grupos LEDF, LF, F, e clorexidina 0,2%, na quantidade de 20 µM para cada biofilme por 5 minutos no grupo CX. Em seguida, tanto o fotossensibilizador como a clorexidina foram removidos para que o biofilme pudesse ser irradiado (L, LED, LF, LEDF) ou não para continuar os procedimentos (CX e F). Havia 2 placas de 96 poços para cada tipo de fonte de luz: uma que só recebeu irradiação laser e outra que recebeu LED.

Os grupos que receberam irradiação com luz laser (L e LF) foram expostos à luz laser de baixa potência de GaAlAs (Laser duo – MM Optics, São Carlos – SP), com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 320 J/cm², 100 mW de potência, 9 J de energia, 90 s, modo contínuo e área do feixe de 0,03 cm² (Steiner-Oliveira et al., 2015).

Os grupos que receberam irradiação com luz LED (LED e LEDF) foram expostos a um dispositivo com 12 LEDs de 1000 mW cada, com comprimento de onda de 660 nm (Bridgelux, São Paulo - SP). A área iluminada foi de 1,278 cm x 0,855 cm (tamanho padrão das microplacas). A irradiação teve densidade de energia de 8,1 J / cm², potência de 90 mW/cm² e energia de 8,1 J por 90 s. A distância entre o LED e a placa permitiu uma distribuição uniforme de luz em cada poço (Moreira et al., 2018).

Após os respectivos tratamentos, 50 µM de solução salina a 0,9% foram adicionados aos poços contendo o biofilme.

4.4 Análise do biofilme

O volume de 50 μ M de biofilme de cada poço foi adicionado a 450 μ M de solução salina a 0,9% em microtubos. A suspensão obtida foi diluída em série decimal de 10^{-1} a 10^{-8} em solução salina (NaCl 0,9%) e inoculada, em triplicata, em placas de BHI agar para determinação do número de micro-organismos viáveis (UFC/mL) do biofilme. As placas ficaram incubadas durante 48 h a 37° C em uma atmosfera parcial de 10% de CO₂. Colônias representativas foram contadas utilizando-se um contador de colônias e os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por peso de biofilme (UFC/mL) (Figura 1).

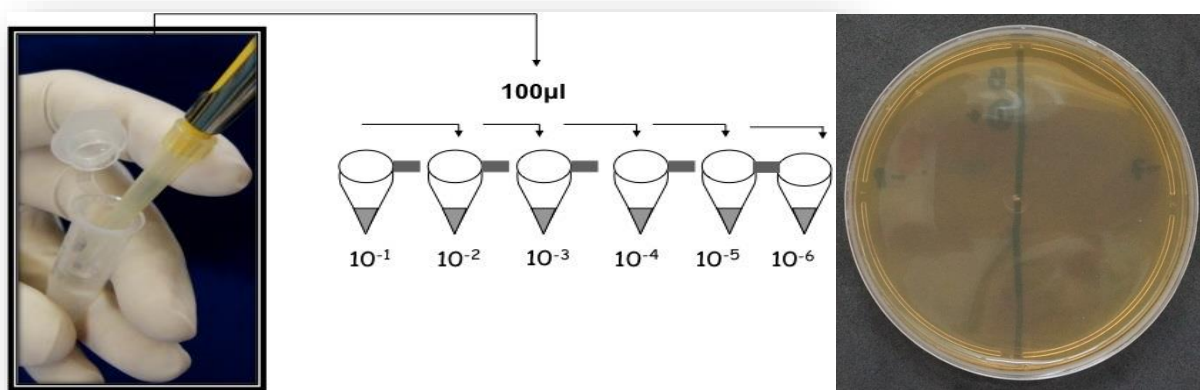


Figura 1 - Diluição seriada dos micro-organismos do biofilme em solução salina; placa de petri ilustrativa do meio de cultura BHI agar em que os micro-organismos foram semeados.

4.5 Análise estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram avaliadas pelos testes Shapiro-Wilks e Levene, respectivamente e, como não houve distribuição normal, os dados da viabilidade bacteriana em log₁₀ foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguida de teste de Dunn com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados de viabilidade bacteriana no biofilme estão expressos na Figura 2, de acordo com cada tratamento. Os micro-organismos formaram grande quantidade de biofilme no controle negativo, assim como no grupo do fotossensibilizador/nanopartícula F ($p > 0,05$). Por outro lado, o grupo controle positivo não demonstrou crescimento bacteriano, mas sem diferenças estatísticas em relação aos grupos LF e LEDF. Os grupos irradiados com LASER (L) e LED (LED) isoladamente apresentaram uma tendência de redução na contagem dos micro-organismos, pois se assemelharam aos grupos da TFDA, porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle negativo.

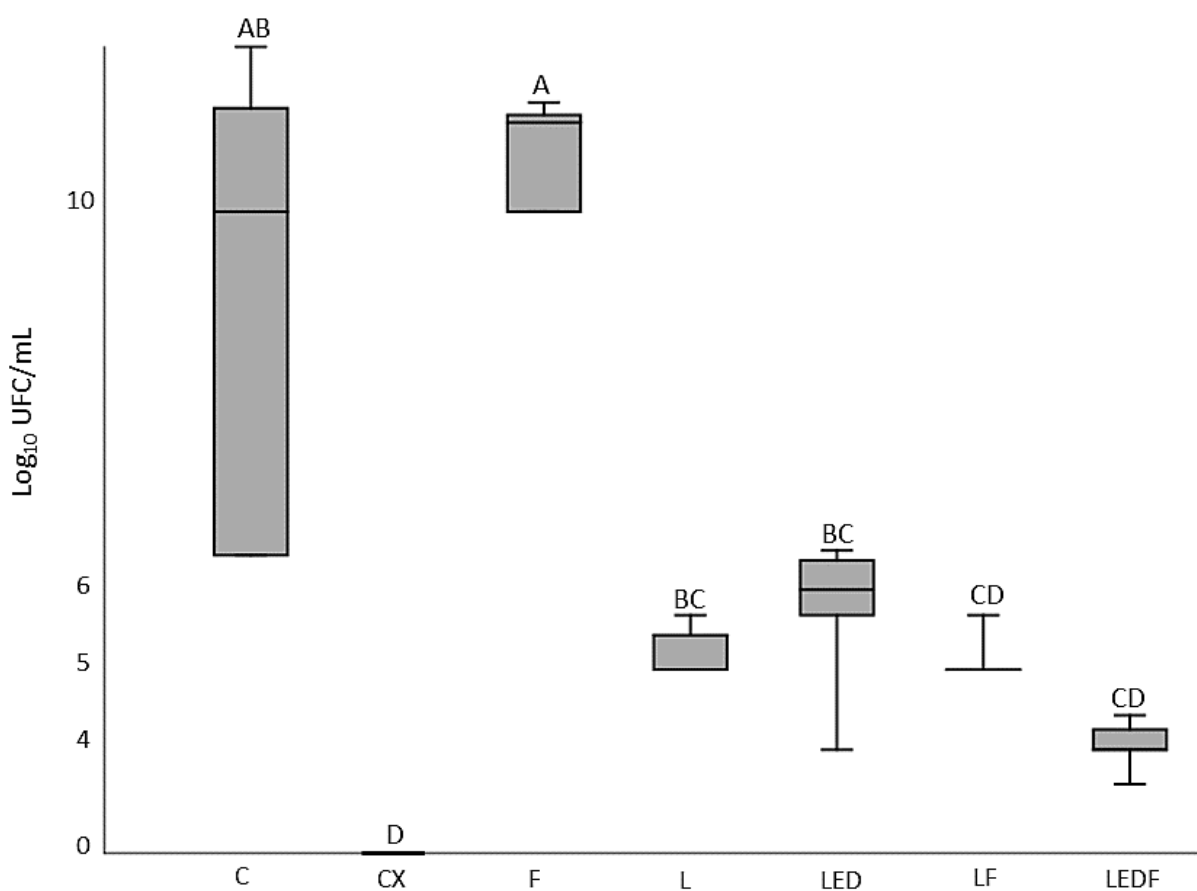


Figura 2 - Viabilidade bacteriana em log₁₀ UFC/mL em biofilme inicial formado para cada grupo.

6 DISCUSSÃO

Uma das indicações da TFDA é seu uso no tratamento adjuvante minimamente invasivo para o controle de doenças bucais biofilme-dependentes como a cárie dentária, pela inativação de micro-organismos envolvidos nesses processos, provocado por dano oxidativo (Reis et al., 2019). O presente estudo mostrou a redução significativa de micro-organismos colonizadores iniciais (*S. gordonii*, *S. oralis*, *S. mitis* e *S. sanguinis*), organizados em biofilme, quando o fotossensibilizador azul de metileno, associado à nanopartícula β -ciclodextrina foi irradiado com a fonte de luz LASER e LED (grupos LF e LEDF). Da mesma maneira, Vasconcelos et al. (2019) encontraram redução significativa na contagem de *S. mutans* formados em biofilme monoespécie para os grupos de TFDA utilizando azul de metileno como agente fotossensível irradiado com luz LASER ($\lambda = 660$ nm, 100 mW, 320 J/cm²) na presença ou ausência da nanopartícula β -ciclodextrina. Também observaram redução significativa de *S. mutans* para o grupo de TFDA associando a β -ciclodextrina ao azul de metileno em modelo de biofilme em microcosmo (micro-organismos provenientes de saliva humana). Oliveira et al. (2018) avaliaram a eficácia da TFDA em biofilmes multiespécies cultivados em microcosmos a partir de micro-organismos coletados das superfícies oclusais dos primeiros molares permanentes ainda em fase de irrompimento. Os biofilmes foram cultivados em ambiente microcosmo sobre blocos de esmalte bovino em meio de cultura acrescido de 1% de sacarose e a TFDA foi realizada com luz LED ($\lambda = 625$ nm, 40 mW, 18,75 J/cm² ou 37,5 J/cm²). Os resultados mostraram diminuição significativa da contagem microbiana em biofilme microcosmos a partir de micro-organismos de dentes em irrompimento. Méndez et al. (2018), também observaram redução de micro-organismos totais, estreptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos totais após tratar um biofilme multiespécie formado em modelo de biofilme em microcosmo com azul de metileno (0,01%) irradiado por luz LED (630 nm) a 75 J/cm².

O uso das fontes de luz laser e LED nos grupos LF e LEDF não diferiram estatisticamente do grupo controle positivo (clorexidina 0,2%), demonstrando a eficácia da TFDA quando comparada ao grupo padrão ouro. A fonte de luz LED associada à TFDA foi capaz de reduzir a carga bacteriana no biofilme em 3,8 log₁₀ vezes e uma hipótese para isso é que a luz LED possui características físicas como ausência de colimação e coerência, o que resulta em bandas mais largas de emissão da luz, podendo fornecer emissão de luz durante toda a absorção do espectro sensibilizador (Zanin et al., 2006). Dessa forma, ocorre a otimização de processos fotodinâmicos, com redução microbiana clínica significativa, acima de 3 log₁₀ (Melo et al., 2015). O grupo de TFDA irradiado com luz LASER também produziu diminuição de micro-organismos em 3,1 log₁₀ vezes, mostrando que os protocolos

de terapia fotodinâmica antimicrobiana propostos neste estudo foram eficazes contra biofilmes multiespécies de micro-organismos colonizadores iniciais. Alguns estudos encontraram dificuldade em mostrar inativação microbiana em biofilmes multiespécies, como Teixeira et al., (2012) que utilizaram um modelo in situ de formação de biofilme, associando o fotossensibilizador azul de orto-toluidina com irradiação por LED (55 J/cm²) e não encontraram redução significativa nas contagens tanto de *Streptococcus* totais como para *Streptococcus mutans*. Além disso, Fontana et al. (2009), também testaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em suspensões de biofilmes multiespécies e observaram que bactérias orais são pouco afetadas pela TFDA. Isso ocorreu pela menor susceptibilidade antimicrobiana quando os micro-organismos estão organizados em biofilme, principalmente quando comparados com suas formas planctônicas. Biofilmes são mais resistentes e diferem das células planctônicas de várias maneiras, incluindo a taxa de crescimento, o metabolismo e a expressão gênica (Zanin et al., 2005; Teixeira et al., 2012). Ademais, em biofilmes expostos à sacarose, como é o caso do nosso estudo, as bactérias ficam entremeadas por uma matriz de polissacarídeos que as protege de riscos externos (de Melo et al., 2013; Leal et al., 2017).

Os grupos com o uso das fontes de luz LASER (L) ou LED (LED) isoladas apresentaram uma tendência ($p > 0,05$) de promover redução microbiana do biofilme, pois tiveram comportamento semelhante aos grupos da TFDA, porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle negativo. Uma explicação é que a irradiação isolada pode desempenhar um papel fisiológico e metabólico com inibição de citocromos que participam do transporte de elétrons para a fosforilação oxidativa (Robertson et al, 2013), podendo provocar morte celular. Os micro-organismos colonizadores iniciais, que se aderem a superfícies dentárias limpas, são formados por uma microbiota oral específica, principalmente composta por *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis* (Nyvad e Kilian, 1987), além de *Actinomyces* (Dige et al., 2009). Com o amadurecimento da microbiota, outros grupos mais cariogênicos como os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus* colonizam o biofilme, pela sua capacidade de produzir e sobreviver em meio ácido (Harper e Loesche, 1984). No entanto, já foi demonstrado que, na ausência de *S. mutans* e *Lactobacillus*, a dissolução do esmalte pode ocorrer por micro-organismos da microflora inicial, exclusivamente (Boyar et al., 1989), pois essas últimas bactérias também são consideradas acidúricas e acidogênicas, (Sansone et al., 1993; van Houte et al., 1996), quando são expostas a açúcares fermentáveis e, por consequência, podem promover a diminuição do pH do biofilme (Takahashi e Yamada, 1999a). Dessa forma, é importante que esse biofilme inicial seja controlado, pois os micro-organismos colonizadores iniciais estão mais envolvidos com o início das lesões de cárie, já que estão presentes em biofilmes associados a lesões de

mancha branca (van Ruyven et al., 2000), além de dificultar a sucessão microbiana de um biofilme inicial para um biofilme maduro, mais cariogênico.

Novos estudos são necessários para se aperfeiçoar ainda mais as técnicas de TFDA, a fim de promover morte bacteriana em micro-organismos de biofilmes específicos mais maduros ou mesmo em microbiota periodontopatogênica.

3 CONCLUSÃO

A TFDA mediada por azul de metileno conjugado à β -ciclodextrina irradiada por LASER ou LED foi eficaz na redução microbiana de biofilme multiespécies composto por micro-organismos colonizadores iniciais.

REFERÊNCIAS*

Boyar RM, Thylstrup A, Holmen L, Bowden GH. The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands in vivo in children living in a fluoridated-water area. *J Dent Res*. 1989 Dec;68(12):1734-8.

Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004 Dec;1(4):279-93. doi: 10.1016/S572-00(05)00007-4.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014 Aug 12; 5:405. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.

de Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomed Laser Surg*. 2017 May;35(5):239-245. doi: 10.1089/pho.2016.4108.

de Oliveira FS, Cruvinel T, Cusicanqui Méndez DA, Dionísio EJ, Rios D, Machado MAAM. The in vitro effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on dental microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018 Mar; 21:163-167. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.005.

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr., et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2837-48.

Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology*. 2009 Jul;155(Pt 7):2116-26. doi:10.1099/mic.0.027706-0.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90. doi: 10.3201/eid0809.020063.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):182-91.

Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res*. 2009 Dec;44(6):751-9. doi: 10.1111/j.600-0765.2008.01187.x.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol.* 1984;29(10):843-8.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 2013 Dec;92(12):1065-73. doi:10.1177/0022034513504218.

Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, Ribeiro MS, Prates RA. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 pii: S1572-1000(16)30273-3. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.04.004.

Loe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J.* 2000 Jun;50(3):129-39.

Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* 2015;49(Suppl 1):46-54. doi: 10.1159/000377732.

Melo MA, Rolim JP, Passos VF, Lima RA, Zanin IC, Codes BM, Rocha SS, Rodrigues LK. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Dec;12(4):581-6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.09.005.

Melo MA, Rolim JP, Zanin IC, Silva JJ, Paschoal AR, Ayala AP, et al. A comparative study of the photosensitizer penetration into artificial caries lesions in dentin measured by the confocal Raman microscopy. *Photochem Photobiol.* 2013 Oct 15;15(10):12186.

Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, Machado MAAM, Cruvinel T. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci.* 2018 Apr;33(3):479-487. doi: 10.1007/s10103-017-2379-3.

Moreira KMS, Sales LL, Graziano TA, Joia F, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM, Stipp RN, Rodrigues LKA, Steiner-Oliveira C. Photodynamic antimicrobial therapy mediated by methylene blue associated with nanoparticles of cyclodextrin and red laser or LED in oral biofilm flow-cell system. Unpublished data, 2018.

Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007 Feb;115(1):77-80.

Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017 Dec; 20:234-237. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.10.025.

Nogueira AC, Graciano AX, Nagata JY, Fujimaki M, Terada RS, Bento AC, et al. Photosensitizer and light diffusion through dentin in photodynamic therapy. *J Biomed Opt.* 2013 May;18(5):55004. doi: 10.1117/1.JBO.18.5.055004.

Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.* 1987 Oct;95(5):369-80.

O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 2002;31(2):86-90.

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 Oct;85(10):878-87.

Periasamy S, Kolenbrander PE. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol.* 2010 Jun;192(12):2965-72. doi: 10.1128/JB.01631-09.

Qin Y, Luan X, Bi L, He G, Bai X, Zhou C, et al. Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci.* 2008 Jan;23(1):49-54.

Reis ACM, Regis WFM, Rodrigues LKA. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019 Jun;26:179-189. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.03.012.

Robertson JB, Davis CR, Johnson CH (2013) Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(52):21130–21135.

Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC (1993). The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 72:508-516.

Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha AC, Ramalho KM, Mayer MP, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015 Oct;20(10):108003. doi: 10.1117/1.JBO.20.10.108003.

Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Höfling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 2013;8(3):e58271. doi: 10.1371/journal.pone.0058271.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011 Mar;90(3):294-303. doi: 10.1177/0022034510379602.

Takahashi N, Yamada T (1999a). Acid-induced acidogenicity and acid tolerance of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 14:43-48.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res.* 2012;46(6):549-54. doi: 10.1159/000341190.

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 Jan 1;16(1):1-6.

van Houte J, Lopman J, Kent R (1996). The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 75:1008-1014.

van Ruyven FO, Lingström P, van Houte J, Kent R (2000). Relationship among mutans streptococci, "low-pH" bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res* 79:778-784.

Vasconcelos MeOC, Cardoso AA, Silva J. N., Alexandrino FJR, Stipp RN, Nobre-dos-Santos H, Rodrigues LKA, Steiner-Oliveira C. Photobiomodul Photomed Laser Surg. 2019 Sep; 37 (9): 567-573. doi: 10.1089 / photob.2019.4669.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. *Caries Res.* 2004 Nov-Dec;38(6):530-6.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 May;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 Apr;57(4):680-4.

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 Aug;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 Feb;114(1):64-9.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

TCC Gabriela Santana			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
22%	17%	4%	14%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	7%	
2	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	3%	
3	www.sbpqo.org.br Fonte da Internet	2%	
4	www.bv.fapesp.br Fonte da Internet	2%	
5	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	2%	
6	www.biblionline.ufpb.br Fonte da Internet	1%	
7	www.metodista.br Fonte da Internet	1%	
8	www.ppgorgsistem.ics.ufba.br Fonte da Internet	<1%	

Anexo 2 – Iniciação Científica



← → ↻ 🏠 [pip.unicamp.br/sys_pibic/orientador/relatorio_parecer.php](#) 🔍 ⚙️

Apps Gmail Google Agenda Facebook FOP-Unicamp Google Tradutor Plataforma Lattes PubMed XXVI JOP Programa JOP 2019

Outros favoritos

2019 pibiti
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica

UNICAMP PPG (Pós-Graduação) CNPq

PIBIC - Área do Docente [quota: 2018]

[Início](#)
[Alterar quota](#)
[Termo de Compromisso](#)
[Relatório](#) <
[Alterar Senha](#)
[Sair](#)

Relatório Final

Efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica associado à nanopartículas, laser ou LED em biofilme de micro-organismos colonizadores iniciais

Versão enviada em 12/08/2019 12:32:08 [ver relatório](#)

— Parecer do orientador emitido em 12/08/2019 12:39:55
Desempenho do aluno no projeto: A aluna cumpriu todas as etapas laboratoriais propostas no estudo e apresentou o relatório final escrito. Os resultados foram discutidos entre nós e a discussão fosse feita adequadamente.
Desempenho acadêmico do aluno: A aluna manteve seu bom rendimento acadêmico com uma discreta redução do coeficiente de rendimento (0.8038 inicial, 0.7921 parcial e 0.7953 final). Vai apresentar os dados do projeto no congresso do Pibic-Unicamp e demais da nossa área.

— Parecer do Assessor dado em 24/09/2019 16:48:14
A aluna foi capaz de concluir que a terapia fotodinâmica irradiada por laser foi eficaz na redução microbiana de biofilme em comparação às outras fontes de luz. O projeto contou com os controles apropriados, o que beneficiou o aprendizado da aluna. A aluna teve bom desempenho escolar.

● Aprovado