



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**TIAGO FALCÃO EUBANK**

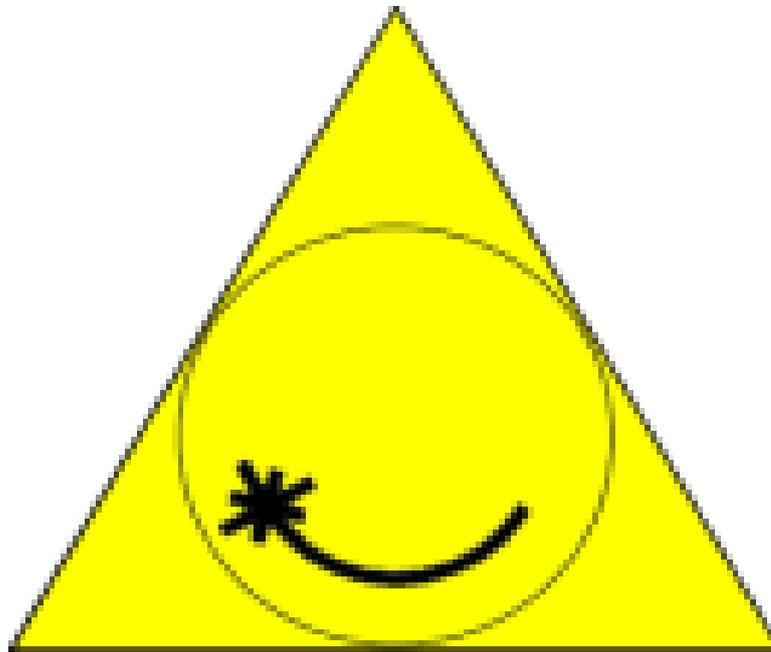
## **EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) EM SUPERFÍCIES ACRÍLICAS COM BIOFILME**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas  
Co-orientador: Prof. Dr. Renato Araujo Prates



2012



## AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe Marieunice, a meu pai Antônio Vicente (*in memorian*), aos meus irmãos Ricardo e Milene, meus cunhados Jean e Patrícia e demais familiares que permanecem unidos e fortalecidos.

Aos meus sogros Antônio e Leila, cunhados e esposas, Diogo e Manuela, Daniel e Rebeca, por todo estímulo dado.

À minha querida esposa Marina e à minha futura filha Isadora que estimularam nesta batalha educacional, com muita paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas, meu orientador, pelo apoio ao tema escolhido e toda orientação.

Ao Prof. Dr. Renato Araujo Prates, meu co-orientador, pela dedicação e apoio de supra importância para realização deste trabalho.

A Profa. Dr<sup>a</sup>. Martha Simões Ribeiro de Dr<sup>a</sup> Denise Zezell, pelos ensinamentos dados.

Aos amigos e colaboradores MSc. Claudio Suzuki e Dr<sup>a</sup>. Ilka Tiemy Kato que ajudaram muito no laboratório, durante a realização deste estudo.

Aos colegas e amigos do Curso Mestrado Profissionalizante em Lasers na Odontologia

Aos primos Cristiana e Eduardo, e aos amigos André Luiz e Karime que me ajudaram e me acolheram nos dias em São Paulo.

A todos os professores, professoras e funcionários, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), e da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo do Laboratório Especial em Lasers na Odontologia (LELO), pela dedicação e ensinamentos ao longo do curso.

## **EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) EM SUPERFÍCIES ACRÍLICAS COM BIOFILME**

**Tiago Falcão Eubank**

### **RESUMO**

Avaliamos o efeito da terapia fotodinâmica em superfícies de acrílico, como de próteses dentárias e placas de hawley, contendo células de *Candida albicans* em suspensão e em biofilme e interpretada por OCT – Tomografia de Coerência Óptica. O biofilme foi formado na superfície de placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, inicialmente incubadas com soro fetal bovino (SFB) e, posteriormente, com cerca de  $5 \times 10^5$  células de *C. albicans*. Observou-se redução microbiana do blastóporo de *C. albicans* na PDT após 6 minutos e principalmente 9 minutos de irradiação com potência de 100 mW , na concentração de Azul de Metileno a 50  $\mu$ M e 70  $\mu$ M. Posteriormente, nas concentrações de FS 1 mM, 0,5 mM e 0,05 mM, realizamos irradiações em biofilme de *C. albicans* com fluências de 80, 120, 160 J/cm<sup>2</sup>, que resultou em 4, 6 e 8 min. Houve inalteração do conteúdo do biofilme após a irradiação com todas as condições testadas. Os resultados sugerem que a PDT pode ser um importante mecanismo de redução fúngica em acrílicos e a OCT como técnica de interpretação em tempo real.

**EFFECTS OF PHOTODYNAMIC THERAPY ON BIOFILM FORMED ON  
ACRYLIC SURFACE**

**Tiago Falcão Eubank**

**ABSTRACT**

We evaluated the effect of photodynamic therapy in acrylic surfaces, such as dentures and plates Hawley containing *Candida albicans* cells in suspension and in biofilm, and interpreted by OCT – Optical Coherence Tomography. The biofilm was formed on the surface of 96 wells flat bottomed, initially incubated with fetal bovine serum (FBS) and then with approximately  $5 \times 10^5$  cells of *C. albicans*. A microbial reduction of the blastopore form of *C. albicans* was observed following 6 minutes and 9 minutes of laser irradiation, with output power  $P=100$  mW associated with 50 and 70  $\mu\text{M}$  methylene blue. Photosensitizer concentrations from 0.05 to 1 mM were tested under laser irradiation of 80, 120, 160  $\text{J}/\text{cm}^2$ , which resulted in fluences of 4, 6 and 8 min. on *C. albicans* biofilm. There were no killing effects on biofilm content after irradiation. However, it could be observed on OCT images that the biofilm structure was unstructured during the irradiation. The results suggest that PDT can be an important tool to break biofilm structure and it can reduce cell population in suspensions. In addition, OCT is an advanced technique to monitor changes on biofilm architecture during antimicrobial tests, and it can achieve real time data.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
2. OBJETIVO.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	17
5. RESULTADOS.....	22
6.DISSCUSSÕES.....	27
7. CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

cm - Centimetro

AM – Fotossensibilizador Azul de Metileno

FOUSP - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

g - Gramas

GaAlAs - Arsenieto de Gálio-Alumínio

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

J - Joule

$J/cm^2$

mJ - Mili-Joule

mm - Milímetros

mW - mili-Watt

nm - Nanometro

W - Watts

$W/cm^2$

TPI – tempo de pré irradiação

## INTRODUÇÃO

Os Aparelhos Ortodônticos Removíveis (AOR) são do tipo dento-muco-suportados, e na maioria dos casos, têm a função de ancoragem, suporte, retenção e podem ter função ativa. Os AOR são dispositivos destinados a interferir nas más oclusões e, em 1902, C.A. Hawley utilizou o aparelho palatal removível, que apresenta acrílico em sua estrutura, com o objetivo de conter dentes previamente movimentados ortodônticamente. Ainda hoje, a placa de contenção de Hawley tem esse uso, mas muitas modificações foram introduzidas para transformá-la num aparelho ativo (VELLINI, 2011).

As desarmonias do sistema estomatognático, quando bem diagnosticados, podem ser corrigidas com o uso dos AOR e esta correção depende de um bom conhecimento das potencialidades mecânicas, controle de utilizações e conhecimento das limitações da técnica de movimentação. Portanto o profissional deve conhecer bem as estruturas anatômicas, morfologia, histologia, neurofisiologia da região, além de apresentar experiência clínica. Um dos desafios da utilização da Placa de Hawley é a possibilidade de agregação de biofilme na sua estrutura acrílica, o que pode gerar infecções bacterianas e fúngica, pelo acúmulo e colonização de patógenos que podem colocar em risco a saúde do paciente. Dentre as condições infecciosas podemos citar a hiperplasia palatal e gengival, candidíase, halitose e acometimentos sistêmicos em pacientes

imunodeprimidos como HIV/AIDS e submetidos a tratamentos de radioterapia e quimio-terápicos (NEVILLE, 2009).

O fungo *Candida spp.*, principalmente da espécie *C. albicans*, encontra-se em cerca de 60% do hospedeiro humano, como comensal nos tratos digestivo e vaginal. Logo, a candidose oral é denominação dada quando a *C. albicans* representa uma infecção fúngica oportunista na cavidade oral ocasionado por próteses não higienizadas e mal adaptadas, resultando em palato eritematoso, hiperplasia gengival, odor fétido e dor sintomática (ASSAD, 2004).

A Estomatite de dentadura é a forma mais comum de candidose oral, com incidência global de 11-65% em pacientes portadores de prótese total. Esta doença é caracterizada por diferentes graus de inflamação da mucosa. Embora possa haver comprometimento sistêmico, fatores locais também desempenham um importante papel na etiologia desta doença, como: o aumento da idade da prótese, trauma de prótese, desgaste contínuo da prótese e má higienização. No entanto, a interface prótese-palatal oferece um nicho ecológico propício para colonização fúngica e bacteriana, por causa do ambiente relativamente anaeróbico e ácido. Espécies fúngicas de *Candida spp.* tem alta afinidade por aderir a superfícies e colonizar acrílico, como *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, sendo esta última a mais comumente descrita (MIMA, 2011).

Os tratamentos convencionais para a candidose incluem os derivados poliênicos como a nistatina, que apresenta comprovada eficácia contra *C. albicans*. Este fármaco está disponível na forma de suspensão para bochechos e pomada, na primeira ao ser deglutida pode causar náusea e vômito; desta forma a pomada tópica é bastante empregada. A anfotericina B, de uso parenteral, é um derivado poliênico reservado para casos sistêmicos graves e possui efeitos

colaterais como febre, calafrios, náusea, diminuição da função renal com elevação da concentração de uréia e creatinina e redução dos níveis de potássio. (NEVILLE, 2009).

Porém, novas técnicas estão sendo pesquisadas, como a terapia fotodinâmica (PDT) na qual células-alvo são coradas com um fotossensibilizador (FS) e irradiadas por luz de comprimento de onda ressonante ao FS (GONZALES, 2011). Esse processo fotoquímico gera espécies reativas de oxigênio, como peróxidos, radicais hidroxila, ânions superóxido e oxigênio singlete, o que resulta em um método bastante eficaz para eliminar diferentes patógenos, incluindo microrganismos resistentes a antimicrobianos. É uma técnica que sugere aplicação *in vivo*, em infecções localizadas, de pouca profundidade. Apresenta baixo custo, baixa toxicidade comprovada ao azul de metileno, simplicidade de uso e diminuição de probabilidade de recorrência infecciosa (PEREIRA, 2009).

A Tomografia de Coerência Óptica é uma técnica eficaz com resposta uniforme numa zona larga do espectro capaz de interpretar imagens em tempo real. O seccionamento é semelhante à biópsia de tecidos biológicos, comum em citologia, que é comum referirem OCT como biópsia óptica (ROSA, 2010).

O paradoxo de um biofilme de infecções crônicas é que algumas vezes não há resposta à terapia antimicrobiana, mesmo quando causada por patógeno que não é resistente ao agente antimicrobiano. A explicação simples é que o agente não consegue efetivamente alcançar algumas células *in vivo*, resultando em recidiva da infecção. Desta forma, um efeito combinado entre agentes antimicrobianos e terapia fotodinâmica resultaria em estratégia eficaz no combate de patógenos que permanecem resistentes (VERA, 2011).

## **OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de biofilme de *C. albicans* formado sobre placa de 96 poços, e comparar, com a inativação deste fungo em suspensão.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 - Métodos químicos de controle de microrganismos

CATÃO et al., em 2007 propuseram um estudo para avaliar, comparativamente, três substâncias empregadas na higienização química de próteses totais. A amostragem constou de 93 próteses provenientes de 54 pacientes portadores de dentaduras dupla ou simples. As peças foram submetidas à evidenciação do biofilme, para posterior imersão nas substâncias químicas avaliadas: grupo 1- hipoclorito de sódio a 2,25%, 2- perborato de sódio e 3- clorexidina a 2%, aos quais foram aplicados escores pós-evidenciação e pós-higienização para quantificar o biofilme e avaliar a sua remoção após cada método químico. Estas análises foram realizadas por dois avaliadores previamente calibrados, os quais efetuaram um estudo comparativo entre os casos. Concluiu-se que o grupo do hipoclorito obteve maior eficácia na remoção do biofilme e que nenhum método isolado consegue eliminar todo o biofilme da superfície das próteses.

A *Candida albicans* é um organismo comensal e está presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Pode colonizar o trato intestinal, oral, vaginal, respiratório, urinário, sanguíneo, além de outras partes do corpo. (NEVILLE, 2009).

Em 2007, UCAR et al. realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a efetividade de agentes químicos na eliminação de *C. albicans* sobre próteses de dentadura. Os agentes hipoclorito de sódio a 2 %, ácido acético a 5 %, peróxidos alcalinos, gluconato de clorexidina a 0,12 % foram testados e os autores

concluíram que todos os agentes de desinfecção foram efetivos na eliminação da *C. albicans*.

Embora as infecções nas mucosas sejam a forma de doença mais comum, as infecções sistêmicas provocadas por esta levedura aumentaram particularmente em doentes com o sistema imunológico comprometido, em particular doentes infectados com o vírus HIV (CHANDRA, 2001).

Em 2007, PIRES *et al.* reportaram que diversas substâncias antisépticas têm sido utilizadas juntamente aos procedimentos mecânicos rotineiros de higiene oral, com base em seus efeitos antimicrobianos. Neste estudo avaliou-se, *in vitro*, a eficiência antimicrobiana de um enxaguatório bucal contendo Triclosan/Gantrez e bicarbonato de sódio, em comparação a controles positivos e negativos. Linhagens de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces viscosus* e *Bacillus subtilis* foram testadas. Os resultados mostraram que a solução teste inibiu o crescimento de microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos da saliva dos voluntários, bem como das linhagens padrão.

Para YÉVENES *et al.*, 2009 enxaguatórios contendo clorexidina parecem ser os mais eficazes agentes químicos para controle de placa, em uma concentração de 0,12% ou 0,20%. Este estudo teve por objetivo comparar a eficácia do gel de clorexidina a 0,1% com enxaguatórios contendo 0,12% e 0,05%.

MOREIRA *et al.* em 2009, avaliaram a atividade antimicrobiana de antissépticos bucais sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 115442, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e sobre bactérias obtidas de uma amostra de saliva de 10 indivíduos. Foram analisados enxaguatórios com os seguintes antissépticos: gluconato de clorexidina a 0,12 por cento; gluconato de clorexidina a 0,2 por cento; cloreto de

cetilpiridínio com e sem flúor; timol; triclosan com flúor. A técnica utilizada foi por difusão em agar, método da placa com orifício, com incubação a 37° C em aerobiose e microaerofilia. Após incubação, observou-se a presença ou a ausência de halo de inibição de crescimento em torno dos orifícios. A formação de halo demonstrou atividade antimicrobiana. Nos enxaguatórios com timol e com flúor associado ao xilitol, não foi evidenciada atividade sobre as bactérias utilizadas. Os outros enxaguatórios apresentaram eficácia sobre as bactérias, com exceção dos que continham cloreto de cetilpiridínio, que não apresentaram atividade sobre *Pseudomonas aeruginosa*, e do enxaguatório com malva associada ao flúor e xilitol, sem atividade sobre *P. aeruginosa*, *S. mutans* e bactérias da saliva. Os enxaguatórios com triclosan com flúor, peróxido de hidrogênio e clorexidina foram os mais efetivos, de acordo com o diâmetro dos halos de inibição formados e a metodologia utilizada. Este estudo vem a sugerir que substâncias antissépticas podem constituir-se em opção complementar para o controle do biofilme dental.

Em 2010, BORGES et al. analisaram 40 placas de Petri com meio de cultura de ágar sangue com seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Avaliou-se neste estudo o Periogard, o CEPACOL, Plax Classic e o ORAL-B. O Periogard com álcool e o sem álcool apresentaram os melhores resultados, sugerindo que os enxaguatórios sem álcool não têm a mesma eficácia antimicrobiana comparada aos enxaguatórios com álcool.

A nistatina está disponível na forma de suspensão para bochechos e pomada, na primeira ao ser deglutida pode causar náusea e vômito; dessa forma que a pomada tópica é bastante empregada (NEVILLE, 2009).

## 2-Terapia Fotodinâmica

Agentes químicos antibacterianos são cada vez mais usados em regimes profiláticos e terapêuticos, segundo WILSON, 2004. Bactérias e micróbios podem ser sensibilizados por um fotossensibilizador como Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina, Lipopolissacádeo (PLS). A Terapia Fotodinâmica é uma abordagem para doenças periodontais, infecções de canais radiculares, doenças cariogênicas e fúngicas.

MAISCH, 2006, relatou os princípios fundamentais e aplicações clínicas da Terapia Fotodinâmica (PDT). Busca delinear novas aplicações que podem tornar-se útil no futuro na prática clínica. O aumento na resistência a antibióticos em todo o mundo tem impulsionado a pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas, doenças cutâneas, infecções repetidas, na qual a terapia fotodinâmica tende a ser eficaz em cicatrização de feridas. O uso do fotossensibilizador e luz como um agente antimicrobiano contra microrganismos da doença periodontal deve igualmente constituir um atrativo método de eliminação de bactérias orais. A PDT antimicrobiana pode ser uma opção terapêutica alternativa na prática clínica, dependendo da farmacocinética e o tempo de iluminação.

KONOPKA *et al.*, em 2007 descreveu a funcionalidade da PDT, também conhecido Terapia Fotodinâmica que envolve o uso de corante fotoativo (Fotossensibilizador), que é ativado pela exposição à luz de um comprimento de onda específico na presença de oxigênio.

BEVILACQUA *et al.*, em 2007 investigaram o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) com azul de toluidina (TBO). O agente sensibilizador

empregado com a adição de um diodo emissor de luz (LED) na viabilidade de células de *Streptococcus mutans*, em condições ideais e controladas, em uma cultura plantônica. Crescimento de *Streptococcus mutans* é o primeiro passo no desenvolvimento da cárie dentária. A PDT tem grande aplicabilidade na odontologia, a luz e corantes promovem a morte celular de uma forma não invasiva, reduzindo o tempo de tratamento e ganhando em eficiência. O LED utilizado neste estudo tinha potência de 116 mW, sua energia foi de 12 J, e fluência de 2,18 cm<sup>2</sup>. Cem por cento das bactérias foram mortas após irradiação com LED e TBO. Concluiu-se que a PDT foi eficiente em matar os microrganismos e evitar a formação de biofilmes.

PEREIRA *et al.*, em 2009, avaliaram o efeito antimicrobiano da PDT em biofilmes formados por *C. albicans* (GI), *S. aureus* (GII) e *S. mutans* (GIII), isolados e em associações (GIV-VII). Os biofilmes foram formados em discos de resina acrílica esterilizados imersos em caldo de infusão com 5% de sacarose, inoculados com a suspensão microbiana e incubados por 5 dias. Após o período de incubação, os discos foram lavados com solução fisiológica esterilizada para remover as células não-aderidas. Foram avaliados os efeitos do fotossensibilizador azul de metileno (AM) na concentração de 0,1 mg/mL por 5 min. e laser AsGaAl (660 nm) por 98 s. Concluiu-se que a PDT pode ser uma abordagem útil no controle de biofilmes bucais.

### 3 – Tomografia de Coerência Óptica OCT

A OCT prevê uma resolução axial e lateral no ar de 6,0 µm. As imagens geradas têm 1 Mpixel (2000x512) correspondendo a um alcance lateral de 6 mm

e uma profundidade axial de 1,5 mm, permitindo avaliar a qualidade e a profundidade atingida pela irradiação laser (SANTOS, 2009).

Em 2011, SHARMA realizou uma revisão de Literatura a respeito da Terapia Fotodinâmica (PDT). Relata a importância dos estudos em modelos de ratos, em patógenos sensíveis a luz e análise da infecção e tratamento em tempo real com Tomografia de Coerência Óptica (OCT).

Em 2010, ROSA descreve o funcionamento da OCT e ilustra a aplicabilidade do mesmo, principalmente na oftalmologia. Na prática, os sistemas OCT são um pouco mais complexos que a simples montagem de Michelson, sendo necessário atender a questões específicas ligadas à utilização de sistemas ópticos com resposta espectral uniforme numa zona larga do espectro e à necessidade de adquirir imagens em tempo real. Comum em citologia, referirem OCT como biópsia óptica de tecidos biológicos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Microrganismo e cultivo

Os experimentos foram conduzidos com amostras da levedura patogênica *Candida albicans* (ATCC90028), gentilmente cedida do estoque do Laboratório de Leveduras Patogênicas do ICB-USP, e armazenada no laboratório de Fotoprocessos Não Térmicos em Biociências sob temperatura de -80°C em meio de cultura líquido com 6% de glicerol.

As células foram crescidas em placas de Petri contendo 6 mL de caldo Sabouraud (Sb) e novamente incubada (24h a 37°C)

### Crescimento de biofilme de *C. albicans*

O biofilme foi formado na superfície de placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano. Os poços receberam 150µL de soro fetal bovino (SFB) e foram incubados por 24h a 37°C para formar uma película protéica. Decorrido este período o SFB foi removido e 200µL de meio de cultura caldo Sb contendo aproximadamente  $5 \times 10^5$  células de *C. albicans* foi adicionado aos poços. As placas foram incubadas em estufa à 37°C.

**Tabela 1 - PDT em suspensão de células - Experimento com os grupos irradiados**

GRUPOS	SIGLAS
Controle	L-FS-
AM	L-FS+
L	L+FS-
L+ AM	L+FS+

*C. albicans* crescida em caldo sabouraud (Sb) foi centrifugada e lavada com solução tampão de fosfato (PBS) com pH ajustado em 7,2 e por fim foram suspensas em PBS. A transmitância da suspensão (546nm) foi ajustada a 70% que corresponde a concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (ufc/mL). A suspensão foi dividida em 4 grupos experimentais (Tabela 1): a) Grupo controle sem aplicação de laser (L) ou fotossensibilizador (FS) (L-FS-); b) grupo sem irradiação e com AM (L-FS+), ou seja, tempo de irradiação igual a 0; c) grupo laser (L+FS-), irradiado por 9min sem AM; e d) grupo PDT (L+FS+). Este grupo foi subdividido para avaliação de diferentes parâmetros de irradiação, com intensidade constante de  $333 \text{ mW/cm}^2$  em uma área de  $0,3 \text{ cm}^2$  e variando-se as fluências de 60,120,180  $\text{J/cm}^2$  (Tabela 2), que resultou em 3, 6 e 9 min de irradiação. Para tanto foi utilizado um laser de diodo InGaAl (Photolase III, DMC, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de  $\lambda=660 \text{ nm}$ , de emissão contínua e potência ajustada em 100mW.

**Tabela 2 - Fluências e tempo de irradiação**

<b>L+ = 60 <math>\text{J/cm}^2</math></b>	<b>3'</b>
<b>L+ = 120 <math>\text{J/cm}^2</math></b>	<b>6'</b>
<b>L+ = 180 <math>\text{J/cm}^2</math></b>	<b>9'</b>

**Tabela 3 - Concentrações do AM**

<b>AM - 50 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>AM - 70 <math>\mu\text{M}</math></b>

A solução de azul de metileno foi preparada pela diluição do pó (Sigma Ltda, Poole, UK) em água destilada na concentração de 10 mM. Este estoque foi filtrado em uma membrana estéril (0,22 $\mu\text{m}$ , Milipore, São Paulo, Brasil). O fotossensibilizador foi diluído e adicionado à suspensão microbiana para

proporcionar concentrações finais de 50 e 70  $\mu\text{M}$  (Tabela 3). Sua aplicação foi através de pipeta calibrada, sobre a *C. albicans*, aguardou-se o TPI de 10 minutos, removeu-se cuidadosamente o AM, para posteriormente realizar a terapia fotodinâmica.

**Tabela 4 - PDT em biofilme de células**

<b>GRUPOS</b>	<b>SIGLAS</b>
<b>Controle</b>	<b>L-FS-</b>
<b>AM</b>	<b>L-FS+</b>
<b>L</b>	<b>L+FS-</b>
<b>L+ AM</b>	<b>L+FS+</b>

Quatro grupos experimentais (Tabela 4), compostos por 3 amostras em cada grupo, foram divididos em: Grupo controle (L-FS-); grupo sem irradiação e com AM (L-FS+), grupo AM (L-FS+), grupo Laser (L+FS-) , grupos submetidos à PDT (L+FS+). O grupo L+FS+ foi subdividido para avaliação de diferentes parâmetros de irradiação com intensidade constante de 333  $\text{mW}/\text{cm}^2$  em uma área de  $0,3\text{cm}^2$  e variando-se as fluências de 80, 120, 160  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Tabela 5), que resultou em 4, 6 e 8 min de irradiação. A região da superfície do poço onde o biofilme foi formado possui área de  $0,3\text{cm}^2$  e o feixe laser foi ajustado em arranjo óptico para iluminar toda esta superfície. O biofilme foi incubado com AM em concentrações de 50, 500, e 1000  $\mu\text{M}$  (Tabela 6). A concentração mais alta foi testada com tempos de pré-irradiação (TPI) iguais a 0 e 10 min.

**Tabela 5 - Fluências e tempo de irradiação**

<b>L+ = 80 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>4'</b>
<b>L+ = 120 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>6'</b>
<b>L+ = 160 J/cm<sup>2</sup></b>	<b>8'</b>

**Tabela 6 - Concentrações do AM**

<b>AM – 50 µM</b>
<b>AM – 500 µM</b>
<b>AM – 100 µM</b>

### **Análise Microbiológica**

Após a irradiação, os poços contendo tanto biofilme quanto blastóporo foram desestruturados mecanicamente com o movimento de remoção e inserção 200 µL de PBS pH7,2 em cada poço e então, alíquotas de 20 µL foram colhidas e submetidas à diluição seriada em placas de microtitulação de 96 poços, para fornecer concentrações de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> vezes do original. Cada diluição foi plaqueada, em duplicata, em placas de Petri com agar Sb, que foram incubadas por 24h a 37°C para permitir a formação de colônias.

As colônias foram contadas nas diluições pertinentes e o resultado foi convertido em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL para a análise dos dados.

## **Análise Morfológica por Tomografia de Coerência Óptica**

Amostras de células de *C. albicans* em suspensão foram introduzidas em placa de petri estéril e fechada, para análise de leitura óptica durante PDT das mesmas.

Foi usado no experimento o OCT (OCT930SR, Thorlabs, EUA) com emissão em  $\lambda=930$  nm e potência de 2 mW , de resolução lateral e longitudinal no ar de 6,2 $\mu$ m. Foi feita uma análise morfológica do experimento com 2000 X 512 pixels, com índice de refração de 1,35, pré-irradiação de 10 minutos e posteriormente removido o excesso de Azul de Metileno. O aparelho de coerência óptica emitiu um sinal intenso inicialmente e fez a leitura da mudança dos índices de refração da água e do ar, originado pela reflexão. O índice de refração da profundidade foi de 1,30. Desta forma os dados foram analisados e interpretados pelo Labview (desenvolvido pelo Prof. Anderson Zanardi de Freitas do Centro de Lasers e Aplicações, IPEN / CNEN-SP).

## RESULTADOS

### 1 - Crescimento microbiano nos grupos controle

O crescimento das células de *C. albicans* em suspensão e em biofilme mostrou-se eficiente. Mantiveram acima de  $10^5$  ufc/mL, assegurando uma importante técnica para futuros estudos *in vitro*. A irradiação com o laser na ausência do fotossensibilizador não provocou nenhuma alteração de morte celular, como esperado, e também nenhum outro efeito detectável na metodologia empregada.

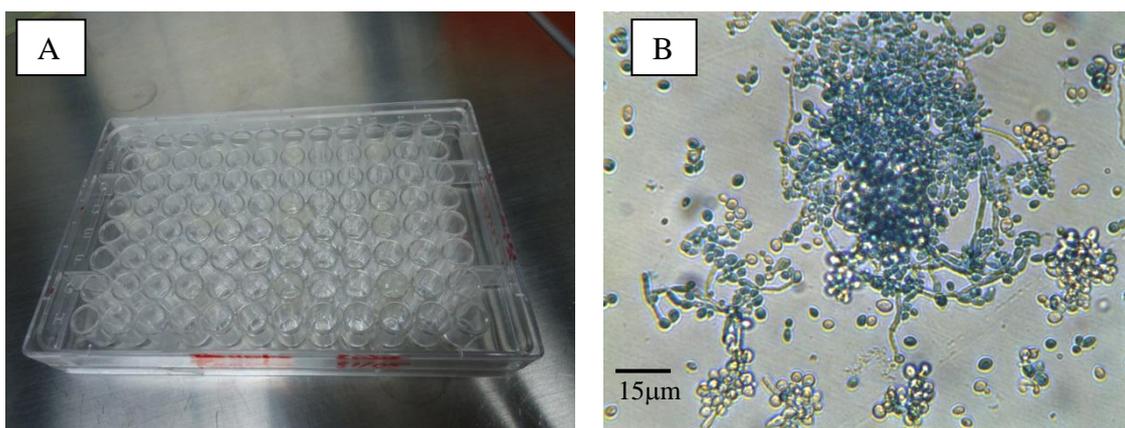


Figura 1– A) placa de 96 poços utilizada para a formação do biofilme; e B) Biofilme de *C. albicans* corado com azul de metileno na concentração de 1 mM.

O biofilme foi formado na superfície acrílica de placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano, contendo inicialmente soro fetal bovino (SFB) e posteriormente cerca de  $5 \times 10^5$  células de *C. albicans*, permanecendo com características micro e macroscópicas semelhantes em todas as amostras, assegurando uma análise e quantificação dos resultados obtidos.

O fotossensibilizador azul de metileno não apresentou toxicidade nos parâmetros empregados.

### Efeito da PDT em suspensão de *C. albicans*

A irradiação de *C. albicans* em suspensão com fotossensibilizador, promoveu redução microbiana nas duas concentrações testadas, 50  $\mu\text{M}$  e 70  $\mu\text{M}$ . Com 70  $\mu\text{M}$  não foi possível verificar inativação até atingir 6 min, porém, não foram recuperadas células viáveis após 9 min. Na concentração de 50  $\mu\text{M}$  foi possível observar uma leve tendência de inativação após 3 min, e depois de 6 min houve 1 log de redução. Novamente, após 9 min foi observada completa inativação das células de *C. albicans*.

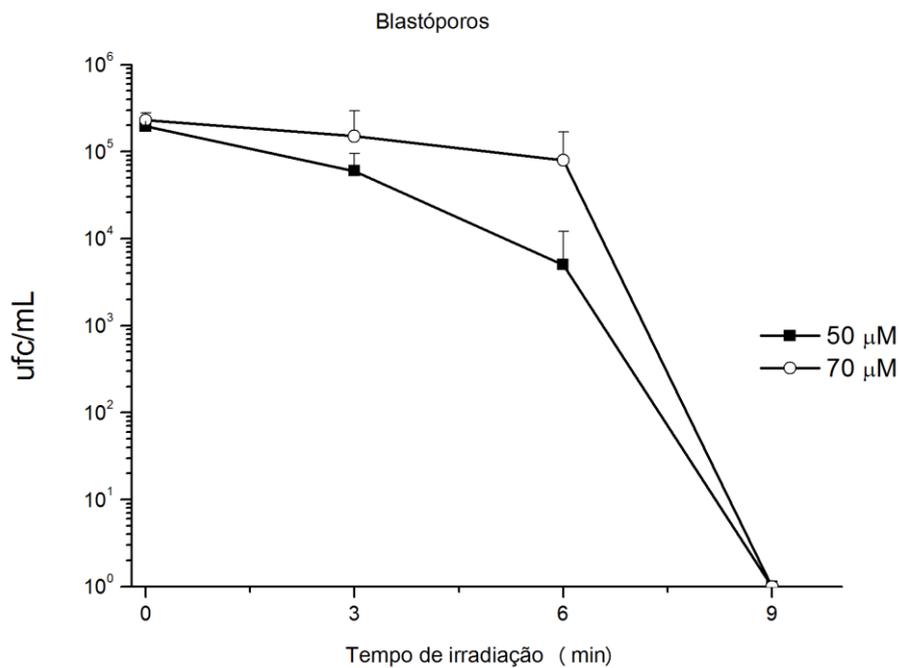


Figura 2 - Inativação de *C. albicans* em suspensão com concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 70  $\mu\text{M}$ . Barras de erros são os desvios padrão.

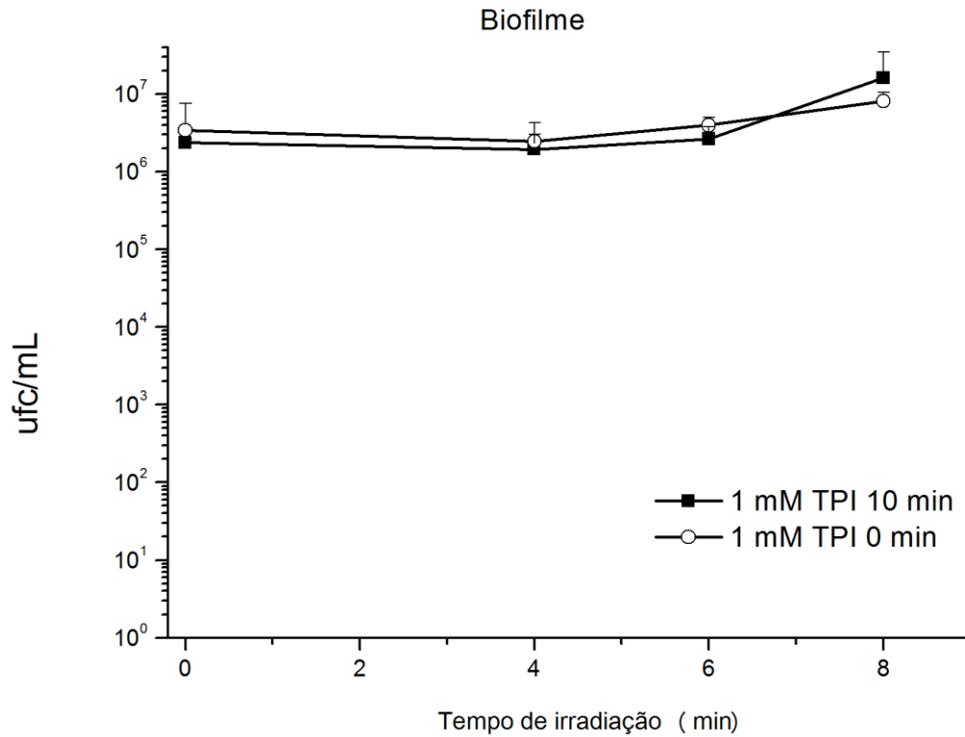


Figura 3 – Fração de sobrevivência de *C. albicans* em biofilme com tempo de pré-irradiação de 10 minutos e 0 minuto, ambos com concentração de 1 mM. Há aumento de células após o tempo de irradiação de 6 minutos.

A terapia fotodinâmica, nas condições testadas com 1 mM e dentro dos limites da metodologia empregada, não promoveu inativação das células fúngicas organizadas em biofilme. Mesmo depois de 8 min. de irradiação, nenhum efeito pode ser observado (figura 3).

As células submetidas à PDT com fotossensibilizador AM a 0,05mM e 0,5mM, e TPI de 10 minutos não foram inativadas. Neste experimento nenhuma redução microbiana ocorreu após 8 min. de irradiação.

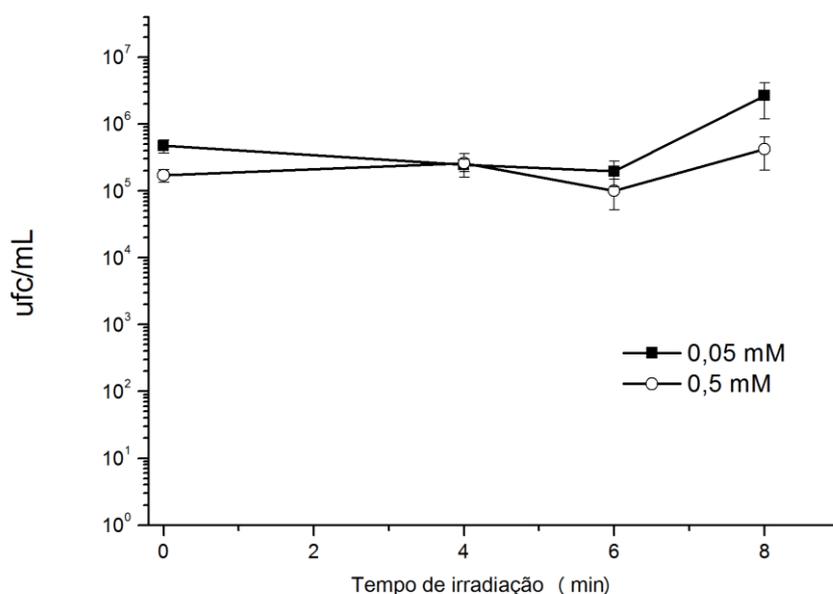


Figura 4 – Ação da PDT sobre o número de células de *C. albicans* em biofilme com concentrações de 0,05 mM e 0,5 mM de Azul de Metileno. Os dados representam a contagem média e as barras são o desvio padrão. Observa-se aumento do número de células após 6 minutos.

### Tomografia por coerência óptica

Foi possível obter imagens estruturais do biofilme por tomografia por coerência óptica. Na figura 5 podemos observar imagens antes, durante e após a irradiação. Observe que a estrutura do biofilme foi alterada e o índice de refração se altera com o tempo de irradiação.

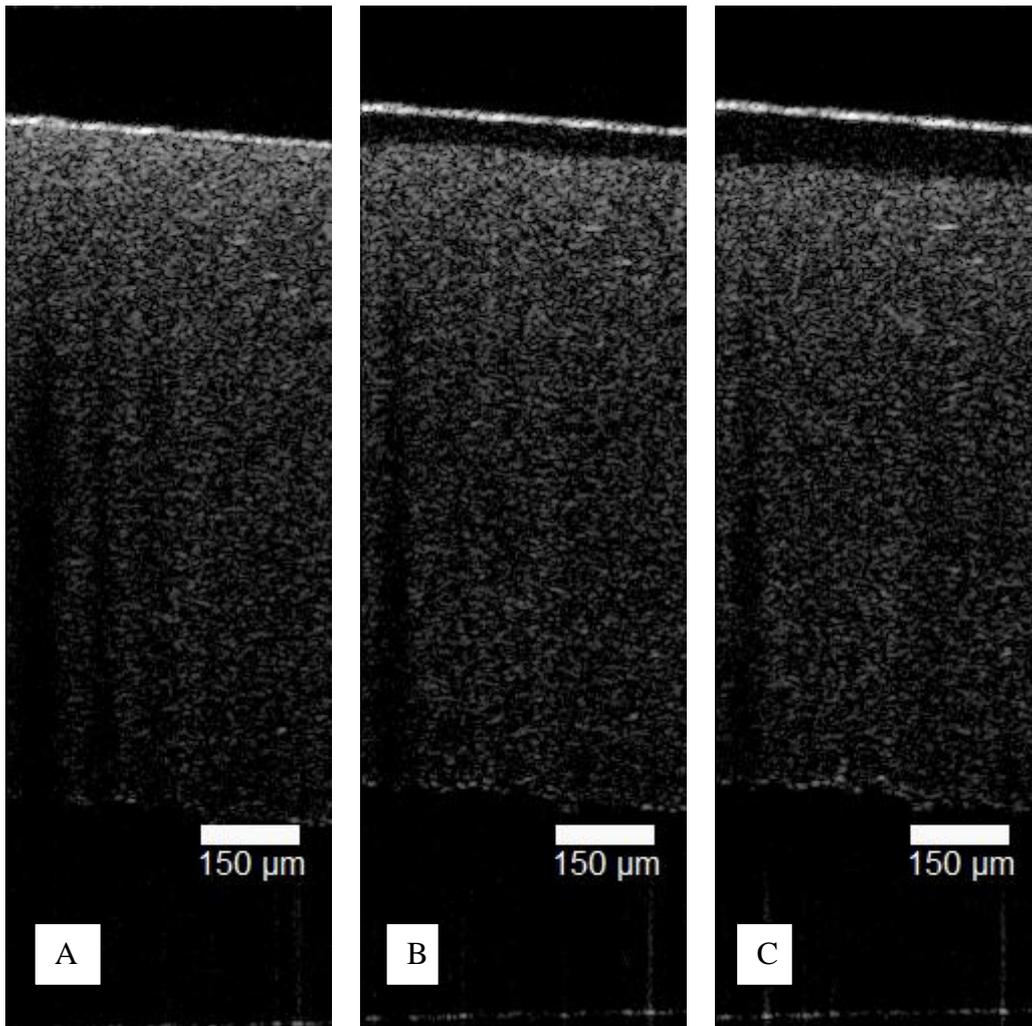


Figura 5 – Imagem obtida por de Tomografia de Coerência Óptica de biofilme durante o processo de PDT em onde: A) Biofilme íntegro e sem realização de PDT, B) desorganização do biofilme após 4 min. de irradiação e C) biofilme desorganizado após 8 min. de irradiação. A barra representa 150  $\mu\text{m}$ .

Nas imagens analisadas por Tomografia de Coerência Óptica, foi identificada inicialmente a estrutura do biofilme sem alteração estrutural com os limites bem definidos e organizados. Após o período de irradiação de 4 minutos, evidencia-se a perda da organização da membrana celular da *C. albicans*, bem provável pelo início da terapia fotodinâmica. Aos 8 minutos, a PDT torna-se mais efetiva tem-se a desorganização do biofilme.

## DISCUSSÕES

A candidose bucal pode afetar a qualidade de vida e dificultar a alimentação devido à presença de sangramento, exsudação, sensação de queimação, dor, halitose, gosto desagradável e secura da boca. Além disso, a infecção por *Candida spp.* é de difícil controle, devido à sua natureza multifatorial e ao pequeno número de drogas disponíveis para seu tratamento (MAEKAWA, 2010).

Biofilme são estruturas microbianas caracterizadas por células sésseis que estão ligadas às superfícies naturais ou abióticas e incorporada numa matriz de substância polimérica extracelular, tais como glicoproteínas e polissacarídeos, e seu desenvolvimento em estudos *in vitro* é viável e utilizado em diversos estudos (GONZALES, 2011). O crescimento acentuado de células de *C. albicans* após período de PDT, sugere-se alteração de técnica durante metodologia.

Os antimicrobianos auxiliam a remoção química do biofilme, porém o uso prolongado de tais agentes pode levar à seleção de espécies resistentes. A estrutura do biofilme e as características das células que o constituem conferem resistência aos agentes antimicrobianos. Desta forma, vê-se a necessidade de se desenvolver tratamentos alternativos com potente atividade antimicrobiana, capazes de interferir no desenvolvimento do biofilme (ZAMBRANA, 2009). O uso combinado de agente antimicrobiano e PDT podem ser sugeridos para tratamentos adversos.

O tempo de pré-irradiação corresponde ao tempo decorrido entre a aplicação do fotossensibilizador no alvo e a ativação por luz. É um ponto crítico para o sucesso da PDT, uma vez que, se o fotossensibilizador não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela luz irá resultar na formação de espécies tóxicas em local não desejado. A morfologia microbiana pode variar com as

espécies, causando diferenças na localização do fotossensibilizador. O tempo necessário para absorção do corante antes da iluminação é importante para o sucesso na PDT. Nas aplicações da PDT antimicrobiana, espera-se que o corante se una ao microrganismo ou chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular e neste período o fotossensibilizador não sofra degradação antes da ativação pela fonte de luz (AMARAL, 2010). Logo, a inserção e remoção do AM devem ser com muita cautela.

O fotossensibilizador azul de metileno tem ação antimicrobiana quando adequadamente irradiado e pode promover a fotoativação de microrganismos (PRATES, *et al.*, 2009; SUZUKI, *et al.*, 2009). Porém, em contato com o biofilme pode desencadear um comportamento de dimerização, que muda as propriedades ópticas deste FS e pode reduzir sua capacidade de fotossensibilização por desativação de estados excitados, quando irradiado em 660nm (USACHEVA, 2003 a e b). Desta forma que neste estudo, diferentes parâmetros foram testados para identificação do melhor resultado.

Várias possibilidades de redução microbiana podem ser usadas como, agentes químicos, antimicrobianos, ação mecânica e terapia fotodinâmica. Podendo neste último, resultar numa desorganização do biofilme, e desta forma auxiliar no tratamento antimicrobiano, assim como na ação mecânica da escovação dental (UCAR, 2007).

A educação em saúde tem como objetivo maior causar uma mudança de atitude do paciente em relação aos hábitos com a saúde bucal, que é alcançada através da criação ou mudança de percepção do paciente. A motivação humana é muito complexa e está baseada numa combinação de expectativas, ideais, e atitudes que mantêm e regulam o comportamento de higiene. Um fundamento

básico de controle de placa dental, e subsequente biofilme bucal (DITTERICH, 2007)

## CONCLUSÕES

A PDT em células de *C. albicans* organizadas em biofilme mostrou-se ineficaz nos parâmetros testados. No entanto, a terapia deste fungo em suspensão mostrou-se eficiente.

Embora não ter sido observado a inativação das células em biofilme, a PDT promoveu a desorganização desta estrutura.

A OCT mostra-se importante técnica para identificação em tempo real das alterações que a terapia promove em biofilme.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSAD, ROBERLEY ARAUJO. Estudo da Prevalência de *Cândida* spp. e de outras Variáveis Relacionada à Estomatite Protética em pacientes geriátricos Institucionalizados. Dissertação de Mestrado em Odontologia Estomatologia. Curitiba. 2004.
2. BERTOLINI, GIULIO, REDDI, ELENA, GATTA, MATILDE, BURLINI, CLAUDIA, JORI, GIULIO. Factors influencing the Haematoporphyrin-sensitized Photoinactivation of *Candida albicans*. Journal of General Microbiology.1989.
3. BEVILACQUA, I. M, NICOLAU, S. KHOURI, A. BRUGNERA, G. R. TEODO-RO, R.A. ZÂNGARO, M.T.T. The Impact of Photodynamic Therapy on the Viability of *Streptococcus mutans* in a Planktonic Culture Photomedicine and Laser Surgery. Vol 25.2007.
4. BETTANIN, FERNANDA, COUTINHO-NETO, MAURÍCIO D., HOMEM-DE-MELLO, PAULA. Estudo teórico sobre a formação de dímeros de azul de metileno. Sociedade Brasileira de Química.34 ed. 2010.
5. BORGES, ÁLVARO HENRIQUE, PEDRO, FÁBIO LUIS DE MIRANDA, SEMENOFF, TEREZA DELLE VEDOVE, PORTO, ALESSANDRA NOGUEIRA, SEMENOFF-SEGUNDO, ALEX, BUZELLE, SAMYRA LOPES. Antimicrobial effectiveness of different trademarks mouthwashes with and without alcohol against different organisms: *in vitro* study. Rev odonto cienc.2010.
6. BLISS, JOSEPH M. BIGELOW, CHAD E., FOSTER, THOMAS H., HAIDARIS, CONSTANTINE G. Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of Photofrin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.2004.
7. CATÃO, CARMEM DOLORES DE SÁ; RAMOS, IRMA NEUMA COUTINHO; SILVA NETO, JOSÉ MOREIRA DA; DUARTE, SYLVANA MARIA ONOFRE; BATISTA, ANDRÉ ULISSES DANTAS; DIAS, ALEXANDRE HENRIQUE DE MOURA. Eficiência de substâncias químicas na remoção de biofilme em próteses total ,Rev. odontol. UNESP.2007.
8. CHABRIER-ROSELLÓ, YEISSA, GIESSELMAN BENJAMIN R., JESÚS-ANDINO, FRANCISCO J. DE, FOSTER, THOMAS, MITRA, SOUMYA, HAIDARIS, CONSTATINE G. Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of *Candida*. J Photochem Photobiol B. 2010.
9. CHABRIER-ROSELLÓ, YEISSA, FOSTER, THOMAS H., PÉREZ-NAZARIO, NELISSA, MITRA, SOUMYA, HAIDARIS, CONSTANTINE G.

Sensitivity of *Candida albicans* Germ Tubes and Biofilms to Photofrin-Mediated Phototoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.2005

10. DEMIDOVA, TATIANA N., HAMBLIN, MICHAEL R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.2005.
11. DI POTO, ANTONELLA, SBARRA, MARIA S., PROVENZ, GIULIO, VISAI LIVIA, SPEZIALE, PIETRO. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms.2009.
12. DITTERICH, RAFAEL GOMES, PORTERO, PRISCILA PAIVA, PILATTI, GIBSON LUIZ, SANTOS, FÁBIO ANDRÉ. Oral care habits and the role of motivation in mechanic control of dental biofilm. *Clín-Científ.Recife*.2007.
13. DOVIGO, LÍVIA NORDI, PAVARINA, ANA CLÁUDIA, RIBEIRO, DANIELA GARCIA, ADRIANO, CYNTHIA SANCHEZ, BAGNATO, VANDERLEI SALVADOR. Photodynamic Inactivation of four *Candida* species induced by photogem. *Brazilian Journal of Microbiology*41.2010.
14. FREITAS, ANDERSON ZANARDI DE FREITAS. Caracterização de tecidos biológicos através de tomografia por coerência óptica. Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção de Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais. 2007.
15. GALINDO, DE C., MELO, C. B. DE, MORAES, L. J., ROCHA, R. G. Planejamento clínico integrado: adequação do meio bucal. *J Bras Clin Odontol Int - Edição Especial* 2006.
16. GERALDO, DEBORA SOARES. Aderência bacteriana à superfície de esmalte dental irradiado por lasers com parâmetros para prevenção de cárie . Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia para obtenção do grau de Mestre São Paulo.2009.
17. GONZALES, FERNANDA PEREIRA, MAISCH, TIM. Photodynamic Inactivation for Controlling *Candida Albicans* Infections.*Fungal Biology*.2011.
18. YÉVENES, ISMAEL; ALVAREZ, SONIA RIVERA; JARA, MIGUEL NEIRA; WOLFENSON, PAULA MASS; SMITH, LJUBICA PETRASIC ,Comparison of mouthrinses containing chlorhexidine and other active agents with chlorhexidine mouthrinse-gel: effects on de novo plaque formation, *Rev. odonto ciência*.2009.

19. KOMERIK, NULGUL. In vivo Killing of porphyromonas gingivalis by Toluidine Blue Mediated Photosensitization in na Animal Model. American Society for Microbiology.2003.
20. KONOPKA, KRYSZYNA., GOSLINSKI, TOMASZ. Photodynamic Therapy in Dentistry. J Dent Res.2007.
21. BLISS, JOSEPH, FOSTER, CONSTANTINE G. Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of. Antimicrobial Agents And Chemotherapy.2004.
22. LEE, SEONKYUNG, ISABELLE, MARTIN E., GABALLY-KINNEY, KRISTIN L., POGUE, BRIAN W., DAVIS, STEVEN J. Dual-channel imaning system for singlet oxygen and photosensitizer for PDT. Biomedical Optics Express. 2011.
23. LIMA, ADRIANA, GRACETTO, AUGUSTO C., GEROLA, ADRIANA P., HIOKA, NOBORU, BONACIN, JULIANO A., BAPTISTA, MAURÍCIO S., MACHADO, ANTÔNIO E. H., RODRIGUES, MÁIRA R., CODOGNOTO, LÚCIA, OLIVEIRA, HUEDER P. M. DE. Fotofísica do Azul de Metileno induzidos por auto-agregação causada por misturas de solventes. Sociedade Brasileira de Química.33 ed.2010.
24. MAEKAWA, LILIAN EIKO, BRIGHENTI, FERNANDA LOURENÇÃO, LAMPING, ROBERTA, OLIVEIRA, LUCIANE DIAS DE, MARCACCI, SIDNEY, KOGA-ITO, CRISTIANE YUMI. Atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais sem álcool à base de clorexidina sobre *Candida albicans*. Rev Odonto UNESP, Araraquara.2010.
25. MAISCH, TIM. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? Lasers Med Sci.2006.
26. MARINHO, SANDRA APARECIDO. A. Efeito da Terapia Fotodinâmica(PDT) sobre culturas de *Candida sp*. E de células epiteliais: estudo *in vitro*.2006
27. MIMA, EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA, PAVARINA, ANA CLÁUDIA, RIBEIRO, DANIELA GARCIA, DOVIGO, LIVIA NORDI, VERGANI, CARLOS EDUARDO, BAGNATO, VANDERLEI SALVADOR. Effectiveness of Photodynamic Therapy for the Inactivation of *Candida spp*. On Dentures: In Vitru Study. Photomedicine and Laser Surgery. Volume X. Number X. 2011.
28. MIZUNO, KAZUE, ZHIYERNTAYEV, TIMUR, HUANG, LIYI, KHALIL, SARWAT, NASIM, TEGOS, GEORGE P., GALI, HARIPRASAD, JAHNKE, WHARTON, TIM, HAMBLIN, MICHAEL R. Antimicorbial Photodynamic Therapy with Functio-nalized Fullerenes: Quantitative Structure-activity Relationships. J Nanomed Nanotechnol.2011.

29. MOREIRA, ANA CRISTINA AZEVEDO; PEREIRA, MARLUS HENRIQUE QUEIROZ; PORTO, MARIANA RIBEIRO; ROCHA, LEANDRO ANTONIO PALMEIRA DA; NASCIMENTO, BRUNO CAMPOS; ANDRADE, PÉRICLES MAIA. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais, Rev. ciênc. méd. biol. 2009.
30. NEVILLE, BRAD W. Patologia Oral e Maxilofacial 3 ed. 2009.
31. OLIVEIRA, JANE REZENDE, PARADELLA, THAÍS CACHUTÉ, REGO, MARCOS AUGUSTO, KOGA-ITO, CRISTIANE YUMI, JORGE, ANTONIO OLAVO CARDOSO. Evaluation of microbial adherence and superficial roughness of chemically activated acrylic resin after cycling with different disinfectant solutions. Cienc Odonto Bras. 2007.
32. PELOI, LS, SOARES, RAFAEL R. S., BIONDO, CARLOS E. G., SOUZA, VAGNER R., HIOKA, NOBORU, KIMURA, ELZA. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. Biosci. 2008
33. PEREIRA, CRISTIANE APARECIDA. Efeitos da terapia fotodinâmica in vitro em biofilmes formados por Candida albicans, Staphylococcus aureus e Streptococcus mutans Apresentada a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos para obtenção do grau de Mestre São José dos Campos. 2009.
34. PIRES, JULIANA RICO; ROSSA JUNIOR, CARLOS; PIZZOLITTO, ANTONIO CARLOS , In vitro antimicrobial efficiency of a mouthwash containing triclosan/gantrez and sodium bicarbonate. Braz. oral res. 2007.
35. PRATES, RENATO ARAUJO, SILVA, ERIQUES G, DA, SUZUKI, LUIS C., PAULA, CLAUDETE R., RIBEIRO, MARTHA S. Light Parameters Influence Cell Viability in Antifungal Photodynamic Therapy in a Fluence and Rate Fluence-Dependent Manner. Laser Physics. 2009.
36. PRATES, RENATO ARAUJO. Avaliação dos Efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre leveduras patogênicas. Dissertação de Doutorado e, Tecnologia Nuclear-Materiais. IPEN. 2010.
37. ROSA, CARLA CARMELO. Biópsia Óptica OCT. INESC-Porto, Faculdades de Ciências, Universidade do Porto. 2010.
38. SANTOS, MOISÉS OLIVERIRA DOS, GOULART, VIVIANE PEREIRA, ROSSI, WAGNER DE, FREITAS, ANDERSON ZANARDI, CORREA, PAULO ROBERTO, SAMAD, RICARDO ELGUL, JÚNIOR, NILSON DIAS VIEIRA, ZEZELL, DENISE MARIA. Skin ablation using high intensity femtosecond laser. IPEN, 2009.
39. SHARMA, SULBHA K., DAI, TIANHONG, KHARKWAL, GITIKA B., HUANG, YING-YING, HUANG, LIYI, DE ARCE, VIDA J. BIL, TEGOS,

- GEORGE P., HAMBLIN, MICHAEL R. Drug Discovery of Antimicrobial Photosensitizers Using Animal Models. Current Pharmaceutical Design. 2011.
40. SELITRENNIKOFF, CLAUDE. P. Antifungal Proteins Applied and Environmental Microbiology. 2001.
41. SILVA, PAULO MAURÍCIO BATISTA DA. Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru para obtenção do grau de Mestre. Bauru; s.n; 2009.
42. SOUKOS, NIKOLAOS, MULHOLLAND, STEPHEN, SOCRANSKY SIGMUND S, DOUKAS APOSTOLOS G. Photodestruction of Human Dental Plaque Bacteria: Enhancement of the Photodynamic Effect by Photomechanical Waves in an Oral Biofilm Model Lasers in Surgery and Medicine. 2003.
43. SUZUKI, LUIS CLÁUDIO. Desenvolvimento de biofilme formado por *Cândida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Nuclear-Materiais. IPEN. 2009
44. SUZUKI, LUIS CLÁUDIO, PRATES, RENATO ARAUJO, RAELE, MARCUS PAULO, FREITAS, ANDERSON ZANARDI DE, RIBEIRO, MARTHA SIMÕES. Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. Nuclear and Energy Research Institute (IPEN). 2009
45. UCAR, ADRIANA BARROETA, ROJAS, GLADYS DE MÉNDEZ, BALLESTER, ANTONIO LELIS. Acción de agentes químicos em la eliminación de *cândida albicans* sobre prótesis dentales. Acta Odontológica Venezolana. v 45 n<sup>o</sup> 2. 2007.
46. USACHEVA, MARINA N., TEICHERT, MATTHEW C., BIEL, MERRILL A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. Journal of Photochemistry and Photobiology. 2003.
47. USACHEVA, MARINA N., TEICHERT, MATTHEW C., BIEL, MERRILL A. The Interaction of Lipopolysaccharides With Phenothiazine Dyes. Lasers in Surgery and Medicine. 2003.
48. VELLINI, FLÁVIO. ORTODONTIA: DIAGNÓSTICO E PLANEJAMENTO. 6 ed. Artes Médicas. 2011.
49. VERA, D. MARIANO A., HAYNES, MARK H., BALL, ANTHONY R., DAI, D., ASTRACAS, CHRISTOS, TIANHONG, KELSO, MICHAEL J, HAMBLIN, MICHAEL R., TEGOS, GEORGE P. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. Photochemistry and Photobiology. 2011.

50. ZAMBRANA, JÉSSICA RABELO MINA, PEREIRA, CRISTIANE APARECIDA, COSTA, ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA, JUNQUEIRA, JULIANA CAMPOS, JORGE, ANTONIO OLAVO CARDOSO. In vitro photosensitization of isolated and associated biofilms formed by *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Rev Odonto São José dos Campos*. 2006.
51. ZANIN, IRIANA CARLA JUNQUEIRA, GONÇALVES, REGINALDO BRUNO, JUNIOR, ALDO BRUGNERA, HOPE, CHRISTOPHER KEITH, PRATTEN, JONATHAN. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005.