



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA**

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES  
ORAIS CRESCIDOS *IN VITRO* E *IN SITU***

**FORTALEZA**

**2010**

**ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA**

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES  
ORAIIS CRESCIDOS *IN VITRO* E *IN SITU***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin

Co-orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

**FORTALEZA**

**2010**

T264a Teixeira, Alrieta Henrique

Ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre biofilmes orais crescidos *in vitro* e *in situ*/ Alrieta Henrique Teixeira. – Fortaleza, 2010.

53 f.

Orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Placa Dentária. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Fotoquimioterapia.  
I. Zanin, Iriana Carla Junqueira (orient.). II. Título.

CDD: 617.63

**ALRIETA HENRIQUE TEIXEIRA**

**AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES  
ORAIS CRESCIDOS *IN VITRO* E *IN SITU***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

*A Deus,*

*Por sempre me guiar e iluminar meu caminho, concedendo forças para continuar em busca das conquistas de minha vida*

*Aos meus pais, **Alberto e Marieta,***

*Pelo imensurável amor, pela constante torcida, pelas lições de vida, de superações e vitórias*

*Ao meu esposo, **Vicente,***

*Por existir em minha vida sendo meu complemento, meu equilíbrio. Por sua paciência, companheirismo e dedicação*

*Aos meus filhos, **Matheus e Rodrigo,***

*Por seus sorrisos e traquinagens, presentes de Deus em minha vida*

*Com muito carinho,*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*À minha orientadora, Profa. Dra. **Iriana Carla Junqueira Zanin,***

*Por sua competência e segurança na transmissão do conhecimento, por seu constante incentivo e dedicação dispensados ao longo deste convívio.*

*À minha co-orientadora, Profa. Dra. **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues,***

*Por seu exemplo de pesquisadora, pelo seu dinamismo e pioneirismo nos caminhos da pesquisa científica.*

*Aos **voluntários,***

*Por serem essenciais para a realização desta pesquisa; pela valiosa colaboração e presteza dispensadas durante a fase clínica.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. **Jesualdo Pereira Farias**.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, em nome de sua diretora Profa. Dra. **Neiva Fracenely Cunha Vieira**.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Prof. Dr. **Sérgio Lima Santiago**, a quem admiro por sua extrema competência, dedicação e entusiasmo para a consolidação do programa de pós-graduação.

À coordenadora do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará Prof. Dra. **Maria Eneide Leitão de Almeida**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Sobral, em nome do seu coordenador, Prof. Dr. **Edson Holanda Teixeira**, pela desbravadora tarefa de dar os primeiros passos da pós-graduação no interior do Ceará.

Ao coordenador do curso de Medicina da Universidade Federal do Ceará - *campus* Sobral, Prof. Dr. **Gerardo Cristino Filho**, por sua cordialidade e solicitude dispensadas na utilização dos laboratórios e equipamentos em Sobral.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, em nome dos professores **José Jeová Siebra Moreira Neto** e **Fabrcio Bitu**, por serem verdadeiros exemplos da essência do “ser mestre”.

À Secretaria de Saúde e Ação Social de Sobral, em nome de seu gestor **Carlos Hilton de Albuquerque Soares**, pela liberação concedida para realização do mestrado e por ceder seus espaços para realização dos exames de triagem dos voluntários.

Aos meus colegas de mestrado, **Ana Patrícia Souza de Lima**, **André Mattos Brito de Souza**, **Daniela da Silva Bezerra**, **Françoise Parahyba Dias**, **Gabriela Eugênio de Sousa Furtado**, **George Táccio Miranda Candeiro**, **Isabela Alves Pacheco**, **Jorgeana Abrahão**

**Barroso, José Luciano Pimenta Couto, Maria Denise Rodrigues de Moraes, Marília Mota Silva, Mirela Andrade Campos, Regina Cláudia Ramos Colares, Saulo Hilton Botelho Batista e Virgínia Régia Souza da Silveira**, pela amizade e carinho, pelos bons momentos compartilhados em meio à ansiedade do aprendizado.

Às amigas, **Kátia Linhares Lima Costa e Virgínia Régia Sousa da Silveira**, pela sincera amizade e constante disponibilidade em diversas ocasiões, pelo exemplo de garra e determinação.

Aos alunos do mestrado em Biotecnologia da UFC - *campus* Sobral, **Eliane dos Santos Pereira, Emanuela de Lima Rebouças, Ticiane Mont'Alverne Lopes Parente e Jackson do Nascimento Costa**, que em meio às suas tarefas acadêmicas contribuíram de maneira essencial na fase experimental desenvolvida em Sobral.

Ao amigo **Francisco Ruliglésio Rocha**, técnico do laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFC- *campus* Sobral, pela imensurável colaboração e apoio em todas as etapas desta pesquisa.

Às amigas, **Juliana Paiva Marques Lima, Mary Anne Sampaio de Melo e Fátima Maria Cavalcante Borges**, pelo constante auxílio sempre que necessário e pelos momentos compartilhados durante a instalação do laboratório de pesquisa da Pós-Graduação em Odontologia da UFC.

Ao colega **Diego Martins de Paula**, pela disponibilidade e ajuda no preparo dos espécimes de dentina.

À técnica em prótese dental, **Francisca Flaviana Bezerra**, pela preciosa parceria na confecção dos dispositivos orais.

Aos bolsistas de iniciação científica, alunos do curso de Odontologia da UFC - *campus* Sobral, **Bárbara Gressy Carneiro e Fauzer Deison Araújo** pela colaboração no trabalho.



A todo o grupo do **Laboratório de Microbiologia e Parasitologia** (LAMP) da UFC - *campus* Sobral, em especial a **Ana Paula Andrade, Rafaela Aragão dos Santos e Joséires Lira de Sousa Fontenelle**, pela colaboração durante a fase experimental.

Aos funcionários da pós-graduação, **Lúcia e Germano**, pela toda atenção e presteza dispensadas.

Aos funcionários da **Clínica Integrada**, pelos bons momentos revividos dos anos da graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram, com uma palavra amiga, um abraço fraterno, um sorriso franco, meu sincero agradecimento.

*“Conceda-nos Senhor a serenidade necessária para aceitar aquilo que não podemos modificar; coragem para modificar o que podemos, e sabedoria para distinguirmos uma situação da outra”*

*Reinhold Niebuhr*

## RESUMO

O tratamento das doenças ocasionadas por biofilmes orais envolve basicamente a remoção mecânica e o uso de antibióticos e agentes anti-sépticos os quais podem originar cepas resistentes aos antimicrobianos tradicionais. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) apresenta-se como uma opção alternativa ao tratamento clássico, promovendo a morte bacteriana por meio da fotossensibilização dos componentes microbianos. Este estudo verificou a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais produzidos *in vitro* e *in situ* utilizando um diodo emissor de luz (LED) associado ao fotossensibilizador azul de orto-toluidina (TBO). No estudo *in vitro*, biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159, foram formados sobre discos de hidroxiapatita utilizando um modelo de banhos de cultura e submetidos à TFDA após 5 dias. Para o estudo *in situ*, vinte e um voluntários foram previamente selecionados para utilizar dispositivos intra-orais palatinos contendo 8 blocos de dentina humana durante 7 dias. Solução de sacarose 10% foi gotejada sobre os blocos dentais 8 vezes ao dia. O biofilme formado em um dos lados do dispositivo recebeu tratamento da TFDA, e o lado oposto serviu como grupo controle. O material coletado passou por um processo de ruptura para a dispersão das células e diluição em série decimal de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Em ambos os experimentos, meios de cultura específicos para o crescimento de estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans foram inoculados e incubados em condições ideais para o crescimento desses microrganismos. Reduções significativas acima de 99,99% ( $p < 0.05$ ) foram observadas na viabilidade das colônias de *S. mutans* UA159 quando expostos ao TBO e LED no estudo *in vitro*. Entretanto, nos biofilmes formados *in situ* e submetidos às mesmas condições experimentais, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ( $p \geq 0.05$ ) da contagem microbiana quando comparadas ao grupo controle. Portanto, podemos concluir que a TFDA foi efetiva na redução microbiológica de *S. mutans* UA159 crescidos em modelo de formação de biofilme *in vitro*, mas, pouco efetiva sobre biofilmes de estreptococos orais formados *in situ*.

**Palavras-chave:** Biofilme Oral. *Streptococcus mutans*. Terapia Fotodinâmica. Estudo *in situ*.

## ABSTRACT

The treatment of diseases caused by oral biofilms involves mechanical removal and use of antibiotics and antiseptics which can lead to problems of bacterial resistance. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) represents an alternative option to conventional treatment, promoting bacterial killing by photo-sensitization of microbial components. This study assessed the antimicrobial action of photodynamic therapy on oral biofilms produced *in vitro* and *in situ* using a light emitting diode (LED) associated with the photosensitizer toluidine blue O (TBO). Biofilms of *Streptococcus mutans* UA159 were grown on hydroxyapatite discs immersed in bathing culture and submitted to PACT after 5 days. For the *in situ* study, twenty-one volunteers were previously selected to use intra-oral palatal appliances containing eight blocks of human dentin during 7 days. Sucrose solution (10%) was dripped onto the dental blocks 8 times a day. The biofilm formed on one side of the device received treatment (PACT), and the opposite side acted as control. The collected material has gone through a process of disruption to the dispersion of cells and diluted in decimal series ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ). In both experiments, specific culture media for the growth of total streptococci and mutans streptococci were inoculated and incubated under optimal conditions for growth of these microorganisms. Significant reductions in excess of 99.99% ( $p < 0.05$ ) were observed in the viability of colonies of *S. mutans* UA159 when exposed to TBO and LED on *in vitro* study. However, the biofilms formed *in situ* and subjected to the same experimental conditions showed no statistically significant differences ( $p \geq 0.05$ ) in the microbiological counting when compared with control group. Therefore, we conclude that PACT was effective in microbiological reduction of *S. mutans* UA159 grown in an *in vitro* biofilm model, but very little effective on oral streptococci biofilms produced *in situ*.

**Keywords:** Oral Biofilm. *Streptococcus mutans*. Photodynamic Therapy. *In situ* study.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>3 CAPÍTULOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Capítulo 1: The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy effect on in vitro and in situ biofilms .....</b>	<b>19</b>
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cavidade oral é amplamente colonizada por uma variedade relativamente complexa e altamente inter-relacionada de micro-organismos, incluindo espécies bacterianas aeróbicas e anaeróbicas, Gram positivas e Gram negativas, além de fungos e vírus (AVILA; OJCIUS; YILMAZ, 2009). Esses micro-organismos crescidos de forma planctônica ou organizados em biofilmes e associados a fatores de riscos sócio-comportamentais, ao meio-ambiente e a componentes genéticos, podem, potencialmente, causar doenças bucais sendo a cárie dental e doença periodontal as mais comumente relatadas (KOLENBRANDER, 2000; SBORDONE; BORTOLAIA, 2003).

Nos últimos anos, tem sido observado que bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fisiológicas distintas que resultam no aumento de resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos quando comparadas às mesmas bactérias crescidas de forma planctônica (MAH; O'TOOLE, 2001; GILBERT *et al.*, 2002; MARSH, 2004). Entre essas mudanças temos alterações nos padrões de expressão gênica entre os dois modelos de crescimento bacteriano (WEN; BURNE, 2002; LI *et al.*, 2001; MARSH, 2004; SHEMESH; TAM; STEINBERG, 2007).

Atualmente está bem estabelecido que o crescimento dos biofilmes de forma organizada sobre a superfície dos dentes pode funcionar como uma proteção contra as forças mecânicas da mastigação, contra os mecanismos de defesa inata e adquirida do hospedeiro, bem como contra agentes agressores externos (BOWDEN, 1999; KOLENBRANDER *et al.*, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002; SPRATT; PRATTEN, 2003). Além disso, os mecanismos de defesa dos micro-organismos podem incluir a formação de uma barreira física constituída especialmente por polissacarídeos, que dificultam a difusão dos agentes antimicrobianos no interior dos biofilmes, a transição para uma taxa de crescimento mais lento decorrente das limitações nutricionais no interior dos biofilmes, a ativação de mecanismos gerais de resposta ao estresse, bem como a expressão de fenótipos específicos para micro-organismos organizados na forma de biofilmes (MAH; O'TOOLE, 2001; SVENSATER *et al.*, 2001; MARSH, 2004).

Apesar da complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental, existem evidências consideráveis de que a presença de *Streptococcus mutans* esteja diretamente relacionada aos estágios iniciais da formação das lesões de cárie em humanos (van HOUTE, 1994). Isso se dá devido a sua presença em altos níveis imediatamente antes do

surgimento das lesões, a sua habilidade em rapidamente degradar carboidratos fermentáveis promovendo a formação abundante de ácido, além da sua capacidade de tolerar ambientes com baixo pH (SVENSATER *et al.*, 2003). Os principais fatores de virulência que envolvem a cariogenicidade destes micro-organismos estão relacionados à adesão à superfície dentária por meio de adesinas de alta afinidade, a habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis que promovem o aumento e o acúmulo destes micro-organismos sobre as superfícies dentárias, a acidogenicidade e a tolerância ácida, além da capacidade de alterar a estrutura físico-química do biofilme (BURNE, 1998).

Atualmente, o tratamento proposto para evitar que estas manifestações se instalem envolve a remoção mecânica do biofilme e o uso de antissépticos e antibióticos. Entretanto, com o notório aumento de desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos aos agentes antimicrobianos tradicionais, estratégias visando terapêuticas antimicrobianas alternativas vêm sendo pesquisadas, onde se destaca a retomada da Terapia Fotodinâmica (TFD). Essa terapia, baseada na associação de drogas fotossensíveis e fontes de luz, foi descrita no início do século XX por Oscar Raab, o qual observou a morte de micro-organismos quando expostos à luz em baixa intensidade, na presença do corante hidrocloreto de acridina (RAYMOND, 1999). Apesar dos resultados positivos, a utilização da TFD para obtenção de efeito antimicrobiano caiu em desuso devido ao surgimento dos antibióticos e à popularização da penicilina e sulfonamidas (MAISCH, 2007).

No entanto, a TFD recebeu especial atenção na área da saúde, sendo estudada por seu efeito na destruição eletiva de tumores e empregada atualmente na clínica médica (BIEL, 2002; PLAETZER *et al.*, 2003; HAMBLIN; HASAN, 2004; KUBLER, 2005). Nas últimas décadas, a ação antimicrobiana dessa terapia voltou a ser motivo de interesse científico sendo denominada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana – TFDA (WAINWRIGHT, 1998; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

O princípio da TFDA baseia-se em uma reação fotoquímica, não térmica, local, envolvendo concomitantemente, fotossensibilizador, fonte de luz e oxigênio (MACROBERT; BOWN; PHILLIPS, 1989). Isoladamente, nem a droga e nem a luz tem a capacidade de produzir o efeito deletério ao sistema biológico (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995; KOMERIK; WILSON, 2002), o que pode ser uma vantagem em relação ao uso dos antimicrobianos convencionais que podem apresentar efeitos colaterais, toxicidade celular, não seletividade, tempo de tratamento mais prolongado e a possibilidade de selecionar micro-organismos resistentes.

O mecanismo de ação baseia-se na irradiação de luz visível em comprimento de onda complementar ao fotossensibilizador promovendo a excitação da molécula do corante, que ao absorver luz sai do seu estado fundamental migrando para um estado mais energético, porém menos estável. Devido à grande instabilidade deste nível de energia, a molécula tem um tempo de vida muito curto e tende a voltar para um nível de energia mais baixo ou mesmo para seu estado inicial. Nesta transição, o excesso de energia pode ser transferido por meio de fluorescência, onde o fotossensibilizador emite energia em forma de fótons, ou pode passar a um nível de energia intermediário chamado estado tripleto. Nesta condição, dois tipos de reações podem ocorrer: (a) Foto-processo Tipo I, onde há transferência de elétrons para níveis superiores de energia que podem interagir com outras moléculas aceptoras de elétrons, causando excitação de componentes do meio, gerando rapidamente formas tóxicas à célula, como peróxidos, radicais hidroxila e íons super-óxidos; (b) Foto-processo Tipo II, onde ocorre transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto altamente reativo, que é responsável pela oxidação de moléculas biológicas, alterando sua estrutura e atividade, além de provocar a desnaturação de proteínas e lipídios da membrana e modificar a estrutura do DNA celular (MACROBERT; BOWN; PHILLIPS, 1989; MALIK; HANANIA; NITZAN, 1990; BHATTI *et al.*, 1997; WAINWRIGHT, 1998; HAMBLIN; HASAN, 2004). Uma estreita relação entre absorção do corante e comprimento de onda utilizado deve ser observada, pois a ação fotoquímica só ocorre quando a banda de absorção do fotossensibilizador é ressonante com a radiação emitida, absorvendo bem o comprimento de onda emitido (PLAETZER *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm avaliado a utilização dos corantes, suas propriedades e picos de absorção (PRATES *et al.*, 2007; PELOI *et al.*, 2008). Dentre os fotossensibilizadores mais usados sobre micro-organismos orais estão: o azul de metileno e azul de orto - toluidina (KOMERIK *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2003; ZANIN *et al.*, 2005; 2006); derivados da fitalacionina, como fitalacionina dissulfonado alumínio (AIPcS2) e fitalacionina catiônica com Zn(II) (WILSON *et al.*, 1995); porfirinas (HAMBLIN; HASAN, 2004), derivados das clorinas (WILSON, 2004; GARCEZ *et al.*, 2007); assim como, rosa bengal (PAULINO *et al.*, 2005), verde de malaquita (PRATES *et al.*, 2007), e azuleno (HAYEK *et al.*, 2005; GARCEZ *et al.*, 2006). O corante azul de orto - toluidina faz parte dos corantes fenotiazínicos; estes corantes azuis são potentes sensibilizantes para uma faixa de micro-organismos e para emissões de laser na faixa vermelha do espectro visível, possuindo um espectro de absorção que varia de 600 e 660nm. A dose de luz necessária para eliminar micro-organismos tratados com TBO é menor do que a necessária para causar toxicidade em células humanas. As



concentrações de TBO geralmente utilizadas na TFDA variam de  $12.5\mu\text{g mL}^{-1}$  a  $100\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estudos em animais não têm verificado dano sobre os tecidos do hospedeiro, mesmo quando foram usadas doses de luz e concentrações do corante maiores do que as necessárias para causar efeito bactericida (MILSON *et al.*, 1997). Para a escolha do fotossensibilizador, além da toxicidade, outros fatores também devem ser considerados como, por exemplo, o tempo de pré-irradiação, a concentração do corante, a fase de crescimento bacteriano, bem como o seu pH (BHATTI *et al.*, 1997; WAINWRIGHT, 1998).

Para a determinação da fonte de luz adequada é imprescindível observar o pico de absorção do corante escolhido, a fim de buscar a complementaridade necessária para a efetiva ação da TFDA (FISCHER *et al.*, 1998). Nos últimos anos, a utilização dos lasers convencionais tem sido substituída pelo uso dos diodos emissores de luz (LEDs), em função das suas características de não apresentarem boa colimação e coerência, resultando em bandas de emissão de luz mais largas, o que favorece a complementaridade com o fotossensibilizador. Além disso, são equipamentos portáteis e de menor custo (ZANIN *et al.*, 2005; 2006; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; PELOI *et al.*, 2008; GIUSTI *et al.*, 2008)

Diversas vantagens da TFDA têm potencializado seu uso clínico, tais como: a delimitação do efeito ao local da aplicação tópica do fotossensibilizador e a irradiação restrita à área de interesse, oferecendo baixo risco a outras células do hospedeiro (HAMBLIN; HASAN, 2004; ZANIN *et al.*, 2005); dano ou morte bacteriana obtido em curto período de tempo, reduzindo a possibilidade de surgimento de resistência microbiana (WAINWRIGHT *et al.*, 2003); e, finalmente, a inexistência de reações sistêmicas ou mutagênicas, mesmo após repetido uso (MAISCH, 2007).

Estudos sobre o efeito da TFDA associada à fotossensibilizadores específicos sobre bactérias orais crescidas em cultura planctônica já demonstraram sua expressiva ação (WILSON, 1993; BURNS; WILSON; PEARSON, 1994; SOUKOS *et al.*, 1998; SOUKOS *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2005). Da mesma forma, os efeitos desse tratamento, sobre biofilmes bacterianos organizados em mono ou multi-espécies, também foram relatados na literatura (WOOD *et al.*, 1999; O'NEILL; HOPE; WILSON, 2002; ZANIN *et al.*, 2005, 2006; WOOD *et al.*, 2006, METCALF *et al.*, 2006; MULLER; GUGGENHEIM; SCHMIDLIN, 2007; GIUSTI *et al.*, 2008). Entretanto, a maioria das pesquisas retrata estudos com células planctônicas ou com biofilmes formados *in vitro*, onde as condições geradas não são semelhantes às que ocorrem na cavidade oral. Desse modo, o delineamento de um estudo *in situ* torna-se fundamental por simular de forma mais efetiva as

condições de formação do biofilme que ocorrem *in vivo*, tais como: temperatura, pH e fluxo salivar encontrados na cavidade oral dos humanos (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995).

A aplicação da TFDA sobre bactérias presentes no biofilme oral deve ser bem estabelecida, uma vez que sua efetividade pode ser reduzida, tanto pela diminuição de penetração do corante, quanto pela dificuldade de propagação da luz (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995). Diante do exposto, este estudo teve por meta avaliar a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais crescidos *in vitro* e *in situ*.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais produzidos *in vitro* e *in situ* utilizando um diodo emissor de luz (LED) associado ao fotossensibilizador azul de orto-toluidina (TBO).

### 3 CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (Anexo A), que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato. Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, e por ter sido realizado no município de Sobral – CE, o presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética da Universidade Estadual Vale do Acaraú – Sobral, CE tendo sido aprovado sob protocolo nº 669 (Anexo B). Assim sendo, esta dissertação de mestrado é composta de um capítulo que contém um artigo científico, que será submetido à publicação no periódico “Caries Research” conforme descrito abaixo.

#### ***3.1 Capítulo 1: The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy effect on in vitro and in situ biofilms***

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LKA, Saxena D, Duarte S, Zanin ICJ

Title: The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy effect on *in vitro* and *in situ* biofilms

**Authors:**

Teixeira AH, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Pereira ES, Medical School, Federal University of Ceará, Sobral, Brazil

Rodrigues LKA, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Saxena D, Department of Basic Sciences, New York University College of Dentistry, New York, USA

Duarte S, Department of Basic Sciences, New York University College of Dentistry, New York, USA

Zanin ICJ, Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, Brazil

**Running head:** PACT action on *in vitro* and *in situ* biofilms

**Keywords:** oral biofilm, *Streptococcus mutans*, photodynamic therapy, *in situ* study.

**Corresponding author:**

Iriana Carla Junqueira Zanin

Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, Brazil

100 Cel. Maurocélvio Ponte Av., Derby, Sobral, CE, Brazil

Zip Code: 62041-380

Phone/Fax: ++ 55 88 3613 26 03

E-mail: [iriana.zanin@ufc.br](mailto:iriana.zanin@ufc.br) and [irianaz@yahoo.com.br](mailto:irianaz@yahoo.com.br)

**Declaration of Interests:** There are no potential conflicts of interest identified in this study.

## ABSTRACT

This study evaluated the effect of PACT on oral biofilms formed *in vitro* and *in situ*. The antimicrobial effect of PACT was obtained using the association of  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  TBO and a LED light (620-660nm) with an energy density of  $55 \pm 2 \text{ Jcm}^{-2}$ . For the *in vitro* study, *Streptococcus mutans* UA159 biofilms were formed on standard hydroxyapatite discs using the bath cultures method and incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ . After 5 days, the biofilms were treated as following: without sensitizer and without light (S<sup>-</sup>L<sup>-</sup>); with sensitizer and without light (S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>); without sensitizer and with light (S<sup>-</sup>L<sup>+</sup>) and with sensitizer and light (S<sup>+</sup>L<sup>+</sup>). For the *in situ* study, 21 volunteers wore intra-oral devices containing human dentine slabs that were treated 8 times a day with a 10% sucrose solution. After 7 days, biofilm formed on one side of the device was submitted to PACT, and the opposite side was used as control (no treatment). In both *in situ* and *in vitro* experiments, the collected material was disrupted, diluted and plated for counting of oral streptococci. Significant decreases of up to 99.99% ( $p<0.05$ ) in the viability of *S. mutans* biofilms growth *in vitro* were observed when biofilms were exposed to TBO and LED. However, the exposure of *in situ* biofilms to the same experimental conditions not promoted neither mutans streptococci nor total streptococci reductions. In conclusion, PACT was effective in killing oral microorganisms present in *S. mutans* biofilms growth *in vitro* but was not capable to reduce oral streptococci growth *in situ*.

## INTRODUCTION

The oral cavity is largely colonized by a variety of microorganisms organized in ecosystems relatively complex, including aerobic and anaerobic bacterial species, both Gram positive and Gram negative as well as fungi and virus [Avila et al., 2009]. Biofilms are highly structured and spatially organized, and are often composed by microbial consortia [Donlan and Costerton, 2002; Marsh, 2004].

The accumulation of bacterial biofilms on tooth surfaces results in some of the most prevalent bacterial-induced human diseases, caries and inflammatory periodontal diseases [Sbordone and Bortolaia, 2003] representing a worldwide health problem that affects, without distinction, children and adults, especially in developing countries [Petersen, 2003]. Etiologically, it represents complex interactions among oral microbiota, diet, dentition, and the oral environment [Marsh, 2005]. Decades of epidemiological, biochemical, and animal studies reported that streptococci generally comprise the majority of dental plaque microorganisms [Pratten et al., 2003] and have implicated *Streptococcus mutans* as the principal causative agent of dental caries [van Houte, 1994; Colby and Russell, 1997; Svensater et al., 2003; Lemos and Burne, 2008].

The knowledge about biofilms has been advanced over the last decade mainly by application of novel techniques including qualitative analysis using non-invasive and non-destructive microscopic techniques (e.g. scanning confocal laser microscopy) [Dige et al., 2007] and molecular tools which have expanded new fields on biofilm microflora research. These approaches have shown that cells growing in biofilms can alter gene expression, resulting in many organisms having a radically different phenotype following attachment to a surface [Marsh, 2005; Shemesh et al., 2007].

An important clinical consequence of both the structural organization of biofilms and the subsequent altered pattern of gene expression is the reduced susceptibility of cells to antimicrobial agents [Ceri et al. 1999, Stewart and Costerton, 2001]. The minimum inhibitory concentration (MIC) of an organism growing on a surface can range from two- to 1000- fold greater than the same cells grown planktonically [Stewart and Costerton, 2001]. The age and the structure of a biofilm may restrict the penetration of the antimicrobial agent and leads cells in the depths of the biofilm relatively unaffected. In addition, disruption of the oral microflora and the difficulty of maintaining therapeutic concentrations of antimicrobials in the oral cavity are also problems associated with the use of these agents [Socransky and Haffajee, 1991; Zaura-Arite et al., 2001; Wilson, 2004].



Alternative tools such as photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) have entered the dentistry field as a therapeutic option to killing bacteria in oral biofilms or dental caries [Hamblin and Hasan, 2004; Zanin et al., 2005, 2006; Konopka and Goslinski, 2007; Fontana et al., 2009; Fimple et al., 2009; Lima et al., 2009]. PACT is a process in which microorganisms are treated with a photosensitizing drug and then irradiated with low-intensity visible light of the appropriate wavelength. The resulting photochemical reactions generate cytotoxic reactive oxygen species, such as singlet oxygen and free radicals, which are able to exert bactericidal effect [Jori et al, 2006; Wilson and Paterson, 2008; Plaetzer et al., 2009].

Several studies have reported the photodynamic inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria and oral fungi using the association of different photosensitizers and light sources [Wainwright, 1998] in planktonic cultures [Wilson, 1993; Burns et al., 1995; Soukos et al., 1998; Williams et al., 2003; Paulino et al., 2005], in oral biofilms [Wood et al., 1999; 2006; O'Neill et al., 2002; Zanin et al., 2005, 2006; Metcalf et al., 2006; Muller et al., 2007] as well as dental caries [Williams et al., 2004; Giusti et al., 2008; Lima et al., 2009]. However, few of these studies were performed using *in situ* models which allows the development of complex biofilms under naturally varying intra-oral conditions that cannot be replicated using even the most sophisticated *in vitro* approaches [Zero, 1995; Watson et al., 2005]. Thus, the purpose of this study was to evaluate the susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms produced *in vitro* and *in situ* to the action of PACT.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental Design**

For the *in vitro* experiment, 36 hydroxyapatite (HA) sterile discs were randomly allocated into 4 groups, with 12 experimental units per set of group. Biofilms of *Streptococcus mutans* UA159 were grown on hydroxyapatite discs immersed in bath culture and submitted to PACT after 5 days. The experimental design was performed in triplicate. To minimize the inherent bias related to microbiological procedures, three independent experiments were performed at different time points. In order to isolate the microorganism ability in biofilm production, one group was only exposed to a non-inoculated brain heart infusion (BHI, Difco, Kansas City, Missouri) broth. As expected, since no bacterial growth was observed this group was not included in the evaluation. In addition, this study involved 4 set conditions in which biofilms were exposed as follows:

- ✓ (S-L-) Biofilms were not exposed to sensitizer or light (negative control). Discs received sterile water instead of TBO and waited 15 minutes in the environment in order to simulate the LED irradiation time.
- ✓ (S+L-) Biofilms were exposed only to sensitizer. Discs received TBO solution and waited 15 minutes in the environment in order to simulate the LED irradiation time.
- ✓ (S-L+) Biofilms were exposed only to light. Discs received sterile water instead of TBO followed by  $55 \pm 2 \text{ J.cm}^{-2}$  irradiation using a LED light.
- ✓ (S+L+) Biofilms were exposed to both TBO and light. Discs received TBO solution followed by  $55 \pm 2 \text{ J.cm}^{-2}$  irradiation using a LED light.

For the *in situ* experiment, a simple-blind, split mouth design was conducted in one phase of 7 days, during which 21 volunteers wore palatal devices containing 8 human dental coronal dentine slabs. At the end of the clinical phase, the mouth was randomly split and each half was allocated into one of the following treatments: biofilms not exposed to sensitizer or light (S-L-) and biofilms exposed to TBO followed by irradiation with  $55 \pm 2 \text{ Jcm}^{-2}$  using a LED light (S+L+).

### ***Ethical Aspects***

This study was approved by the Research and Ethics Committee of Vale do Acaraú State University (protocol number # 669). All donors of saliva, donors of teeth and volunteers that wore the oral appliance in the *in situ* study signed informed consent according to Resolution no. 196 of the National Health Council, Health Ministry, Brasília, DF, from 10/03/1996.

### **Photosensitizer and light sources**

The photosensitizer (PS) chosen in this study was Toluidine blue O – TBO (Sigma Chemicals, Poole, UK), dissolved in deionized water ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and stored at  $4^\circ\text{C}$  in the dark. A red light-emitting diode (LED; Laserbeam, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) with spectrum of emission ranging from 620 to 660 nm and predominant wavelength of 638.8 nm was used as light source. A fiber optic spot with a 9.5-mm cylindrical diffusing tip distributed the light. Irradiation was performed in a noncontact mode with a focused beam at 2.0 mm of working distance. A power meter Lasermate (Coherent Inc, Santa Clara, CA, USA) was used to measure the peak power, and a maximum output power of 40 mW was determined. Biofilms were exposed to  $55 \pm 2 \text{ Jcm}^{-2}$  energy density after 15 minutes of irradiation.

## ***In vitro* Experiment**

### ***Specimens preparation***

Thirty-six HA discs (Clarkson Chromatography Products Inc.) were used in this study. A wire apparatus were developed in order to support the HA discs in the vertical position simulating the gravitation forces founded in biofilms formed in the mouth (fig.1). The HA discs were held in place, dipped on Milli Q water and submitted to a ultrasonic bath for 10 minutes in order to remove the HA powder and after autoclaved (121°C, 15 min) [Duarte et al., 2008].

### ***In vitro* biofilm formation**

The microorganism used in this study was *S. mutans* UA159 (ATCC 700610). To prepare the inoculum, *S. mutans* was first grown in an overnight culture of Tryptone-Yeast Broth- TYB (Difco, Kansas City, Missouri) containing final concentration of 1% of glucose at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). After sterilization, the HA discs were kept immersed in miliQ water for 1h at room temperature in order to promote the discs humidification. Following, discs were allocated into 24 wells polystyrene plates containing clarified human saliva diluted 1:1 ration (v/v) with adsorption buffer AB (50 mM KCl; 1.0 mM CaCl; 0.1mM MgCl<sub>2</sub> at pH 6.5) and 0,1M phenylmethsulfonyl fluoride (PMSF) at 1:1000 ratio. HA discs were than incubated at 37°C for 1h on an orbital shaker in order to simulate the acquired pellicle formation. Following, HA discs were transferred to another 24 wells polystyrene plate with 2mL of TYB media containing 1% of sucrose and 100 µL of the *S. mutans* overnight culture. The biofilms were then formed in the HA discs for 120h and the culture medium was replaced at each 24 hours [Duarte et al., 2008]. At the end of the experimental culture, the biofilms were dipped thrice in saline solution of NaCl 0.89% and submitted to photodynamic antimicrobial chemotherapy.

### ***Photodynamic antimicrobial chemotherapy of in vitro* biofilms**

After 5 days of biofilm formation, HA discs containing the biofilms were transferred to another 24 wells polystyrene plates containing TBO (groups S+L- and S+L+) or sterile miliQ water (groups S-L- and S-L+) during the pre-irradiation time of 5 minutes in the dark. Following this time, the biofilms were exposed 15 min to a LED light (groups S-L+ and S+L+) or maintained at room temperature during the same period (groups S+L- and S-L-). The biofilms were then placed into 1 mL of saline solution of NaCl 0.89% and sonicated

using 2 pulses of 10 seconds with 1 min of interval between them at an output of 7W (Branson Sonifier 150; Branson Ultrasonics, Danbury, CT) in order to disperse the biofilms. Ten-fold serial dilutions (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) were carried out and aliquots were plated onto Blood agar which were then incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours before enumerate the viable microorganisms.

## ***In situ* Experiment**

### ***Study Population***

21 healthy volunteers (11 females and 10 males), aged 19-38 years, able to comply with the experimental protocol, were selected to participate of this study. All participants received oral and written instructions about the experimental design. The inclusion criteria were normal salivary flow rate, normal buffering capacity of saliva, and *S. mutans* units forming colony (UFC/mg) in biofilms of at least 10<sup>5</sup> after 36 hours of hygiene suspension. Exclusions criteria included active caries lesions, use of antibiotics within the past 3 months prior to the study, use of fixed or removable orthodontic devices and the use of antimicrobial dentifrice.

### ***In situ specimen preparation***

Ninety sound third molars, extracted for other reasons not related with this research and previously stored in 0.01% (v/v) thymol solution at 4°C for 30 days [Strawn et al., 1996] were used to manufacture one-hundred and sixty-eight dentine slabs according Lima et al. 2009 with slight modifications in the slabs dimensions (4 x 4 x 2 mm). The slabs were autoclaved 121°C, 15 min [Yamamoto et al., 2005] and stored in 100% humidity until being inserted into the palatal appliances. An acrylic palatal device was constructed for each volunteer, in which two cavities (18 x 5 x 3 mm<sup>3</sup>) were prepared on the left and right sides; four slabs were attached with wax in each cavity. In order to allow biofilm accumulation, and to protect it from mechanical disturbance, a plastic mesh was positioned on the acrylic resin, leaving 1 mm space from the slab surface [Cury et al., 1997; Hara et al., 2003].

### ***In situ bacterial biofilm formation***

A simple-blind *in situ* design was conducted in one phase of 7 days during which 21 volunteers wore palatal devices consisting of two cavities containing 4 slabs of human dentine in each one (fig 2). Biofilms were formed under a cariogenic challenge determined by the use of a drop of 10% sucrose solution [Aires et al., 2008] onto each dentine slabs 8 times per day, according to a predetermined schedule (at 08.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, and

22.00 h). The volunteers were instructed to place the appliance back into the mouth after 5 minutes past sucrose exposition [Duggal et al., 2001; Ccahuana-Vasquez et al., 2007; Aires et al., 2008]. No restriction was made with regards to volunteer's diet, but they were instructed to remove the appliances during meals, when consuming acid drinks or performing oral hygiene. When removed, the devices were kept moist in plastic boxes to keep the bacterial biofilm viable [Cury et al., 2000]. Throughout the entire experiment, volunteers used a dentifrice containing 1,450  $\mu\text{g}$  fluoride (F)  $\text{g}^{-1}$ , as MFP (Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brazil) and consumed optimally fluoridated water (0.7 mg F  $\text{l}^{-1}$ ). At the end of the clinical phase, the two cavities of each device were randomly allocated as control group - without sensitizer and light (S- L-) and treatment group – exposed to sensitizer and light at the same time (S+ L+).

### ***Photodynamic antimicrobial chemotherapy of in situ biofilms***

After clinical phase the plastic meshes of the device were removed with a scalpel blade (#15C) and the biofilm formed *in situ* was exposed. To investigate the effect of PACT, 50 $\mu\text{l}$  of TBO were homogeneously distributed on the biofilm formed in one side of the palatal device in a pre irradiation time of 5 minutes in the dark. The other side was used as control group and received 50 $\mu\text{l}$  of sterile water for the same period time. TBO-treated biofilms were irradiated during 15 minutes while control biofilm were submitted to a 15 min waiting period in order to simulate the irradiation conditions. Biofilms were then scraped carefully and weighed, placed in 0.89% NaCl (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) and sonicated as previously described. Treated and untreated samples were serially diluted (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) and inoculated in triplicate on Mitis Salivarius Agar (MSA) containing 15% sucrose to determine total streptococci and Mitis Salivarius Agar containing 0.2 units of bacitracin  $\text{mL}^{-1}$  (MSB) to determine mutans streptococci. Plates were incubated for 48h at 37°C, 10%  $\text{CO}_2$ , representative colonies of mutans streptococci and total streptococci were counted using a colony counter, and the results were expressed as colony forming units (CFU)  $\text{mg}^{-1}$  of biofilm.

### **Statistical analysis**

The normality distribution of the *in vitro* data was checked using the Kolmogorov–Smirnov statistical test. The mean and the standard deviation of numbers of surviving microorganisms for each treatment in the *in vitro* and *in situ* experiments were calculated. Colony forming units (CFU) were transformed in  $\log_{10}$  CFU in order to reduce variance

heterogeneity. For *in vitro* study, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey–Kramer test was applied to establish the differences between the experimental treatments. To determine the differences between test and control values in *in situ* experiment, the paired *t*-test was used. Significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ) using the software BIOSTAT 3.0 (Belém, PA, Brazil).

## RESULTS

To determine the antimicrobial activity of PACT applications *in vitro* we compared the numbers of CFU mL<sup>-1</sup> obtained from negative control and test groups. Lethal photosensitization (S+L+) of *in vitro* *S. mutans* UA159 biofilms with 100µg mL<sup>-1</sup> TBO and light energy density of  $55 \pm 2$  Jcm<sup>-2</sup> resulted in a mean viable counting of  $1.40 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> comparing with control group of  $4.14 \times 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> performing an expressive reduction in microbiology counting. In the test group S+L+ were observed reductions around 5 log<sub>10</sub> ( $p < 0.01$ ) in the viability of *S. mutans* UA159 (fig 3).

Data obtained from volunteers' selection showed normal patterns of salivary flow rate and normal buffering capacity of saliva in all volunteers. The analysis of biofilm formed after 36h without brushing confirmed a regular mean counting of mutans streptococci (tab 1). The effect of PACT on viability of *in situ* biofilms showed just short reductions in the microbiological counting of both total and mutans streptococci without statistical significance ( $p > 0.100$ ) as can be seen in fig.4. The counting for total streptococci observed in the control group were  $2.22 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> comparing with  $1.45 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> observed in the PACT group. The results for mutans streptococci showed reductions from  $7.27 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> observed in the control group to  $5.48 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> obtained in the PACT group.

## DISCUSSION

In the present study, we investigated the antimicrobial photodynamic effect of a LED associated with TBO (100µg mL<sup>-1</sup>) on *in vitro* and *in situ* biofilms. Initially, *S. mutans* UA159 biofilms was used as a standard model before the *in situ* experiment be performed, simulating the conditions found in oral cavity. The choice of a LED light, instead of a laser device, was determined by its physical characteristics that associated with its lower cost and portability made it more desirable to be used in PACT. In addition, the lack of collimation and coherence of LEDs, which result in wider bands of emission (620-660 nm), provide light emission throughout the entire absorption spectrum of sensitizer, which may promote optimisation of photodynamic processes [Kubler, 2005]. Furthermore, Zanin et al. [2005] demonstrated that

the use of a HeNe laser or a LED light in association with TBO had the same antimicrobial effect on *S. mutans* biofilm viability.

TBO was chosen as sensitizer due its characteristics of an optimal photosensitizer including photo-physical, chemical and biological characteristics such as possibility of local delivery into the infected area, selectivity for microorganisms avoiding damage to host tissue and diffusion capacity [Soukos et al., 1996; O'Neill et al., 2003]. Also, TBO possess accessible cost and intense absorption in the red spectrum (>600 nm) [Jori and Coppellotti, 2007]. Thus, a pre-irradiation time of 5 minutes was used, since a very long time could make it impossible to clinical practice [Matevski et al, 2003; Zanin et al., 2002].

A great number of studies have shown that oral bacteria are susceptible to the action of PACT when they are suspended in planktonic cultures [Wilson, 1993; Burns et al., 1995; Soukos et al., 1998; Komerik and Wilson, 2002; Williams et al., 2003; Paulino et al., 2005], oral biofilms [Wood et al., 1999; O'Neill et al., 2002; Zanin et al., 2005, 2006; Wood et al., 2006, Metcalf et al., 2006] as well as carious dentine [Williams et al., 2004; Giusti et al., 2008; Lima et al., 2009]. On the other hand, besides the great reduction of microorganisms reported in these studies, some other authors have been reported that PACT failed to demonstrate significant reduction of oral pathogens [Muller et al., 2007; Fontana et al., 2009]. One of the common points observed in these results seems to be the use of multi-species biofilms [Muller et al., 2007; Qin et al., 2008; Fontana et al., 2009].

Our data demonstrated that PACT on *in vitro* mono-specie biofilm was effective in promotes statistically significant decrease ( $p < 0.01$ ) on microorganisms viability. Neither irradiation of the organisms in the absence of TBO nor incubation with TBO alone had a significant effect on the viability of *S. mutans* UA159. Significant log reductions (1-3 log) in the viability of these microorganisms using the same sensitizer and light source was observed in previous studies [Zanin et al, 2005; 2006]. The 5 logs reductions observed in this study can be explained by the different *in vitro* methods and substrates used in the three studies (constant depth film fermentor- CDFE using hydroxyapatite discs as substrate; bath culture method using enamel blocks as substrate; or bath culture method using hydroxyapatite discs as substrate) that can promotes differences in the structure of the biofilms as well as in their response to antimicrobial agents.

Although significant results have been found *in vitro*, it is very important evaluate the effect of PACT under conditions more similar to those found in mouth. In this way, *in situ* models of biofilms involve the use of devices that create conditions that reproduce the process

of biofilm formation on oral cavity, serving as a link between the clinical uncontrolled situation and the highly controlled laboratory experiments. The model aims to simulate what occurs in the natural process of biofilms formation and also to provide information in a short period of time without causing damage to the volunteers [Zero, 1995]. In this way, this model may be considered a proper tool for testing the effect of PACT on microorganisms involved in the cariogenic biofilms. The *in situ* model, based on multispecies biofilm accumulation and sucrose exposure, was previously reported by many authors [Cury et al., 2000; Aires *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2008].

The results of our study showed that photodynamic antimicrobial chemotherapy was ineffective in significantly reducing both mutans streptococci and total streptococci formed *in situ*. Comparing the non treated controls and the biofilms submitted to PACT, only lower reductions of total streptococci (34,69% killing) and mutans streptococci (25,18%) counting was observed. These results are according to a recent study of Fontana and cols. [2009] that used the association of a diode laser (665 nm) and methylene blue. The authors evaluated the antimicrobial effect of PACT on suspensions of pooled dental plaque and on 7-days old multi-species biofilms, both formed from the same original *in vivo* plaque samples. The results showed reductions on bacterial viability of 63% on dental plaque suspension against 32% reduction observed on multi-species biofilms. Also, Muller et al. [2007] reported less than 1  $\log_{10}$  destruction of bacteria in six-species oral biofilms developed on bovine-enamel discs after their sensitization with methylene blue followed by irradiation with red light of 665 nm.

On the other hand, Wood and cols. [1999] observed in confocal microscopy images that PACT was capable to eliminate a very large number of microorganisms in multi-species biofilms, although, in this study, any quantitative technique have been performed to evaluate PACT outcome. Significant antimicrobial effect of PACT on multi-species biofilms was also obtained by O'Neill et al. [2002] who revealed that photodestruction occurred predominantly in the outer layers of biofilm clusters due to the inability of the photosensitizer to diffuse through into these inner regions that could illustrate one potential problem associated with photodynamic antimicrobial chemotherapy biofilm-related diseases.

It is well establish that bacteria growing as a biofilm are enclosed within a matrix of polymeric material, which may serve to protect them against adverse environmental factors, including antimicrobial agents [Wilson, 2001]. However, this could be overcome by selecting a photosensitizer able to penetrate through the biofilm matrix, and by using alternative tools to improve photosensitizer penetration such as photomechanical waves, as well as by irradiating biofilm internally via an optical fiber instead of from the biofilm surface [O'Neill



et al., 2002]. Although PACT have demonstrated to be 3-4 fold less effective for dense multi-species biofilms formed *in situ* than for *in vitro* mono-species biofilms, the antibiotics have been reported to be approximately 250-fold less effective under these conditions [Sedlacek and Walker, 2007].

In conclusion, PACT was effective in killing oral microorganisms present in *S. mutans* biofilms growth *in vitro* but was ineffective in killing oral streptococci present in multi-species biofilms growth *in situ*. This fact supports the idea that, at this moment, there is no scientific evidence to clinical use of the PACT to reduce biofilm formation. Further studies are required to understand why *S. mutans* are not susceptible to PACT when growing in multi-species biofilms. Also, once there is evidence that photodynamic process can alters significantly cells gene expression [Bhuvanewari et al., 2008; Steinberg et al., 2008], the subtle effect of PACT on *S. mutans* gene expression must to be better researched.

**Acknowledgements:** This research was supported by CNPq 478312/2007-5 and FUNCAP BPI-0187-4.02/08. We thank to the volunteers for their valuable contribution. The authors thank Ruliglesio Rocha and Flaviana Bezerra for their help on experimental procedures. This paper was based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of Fortaleza, Federal University of Ceará, Brazil in partial fulfillment of the requirements for a MS degree in Dentistry.

## REFERENCES

- Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res* 2006;40:28-32
- Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA: Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and root dentine demineralization. *Caries Res* 2008;42:380-386
- Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O: The oral Microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol* 2009;28:405-411
- Bhuvanewari R, Gan YY, Lucky SS, Chin WW, Ali SM, Soo KC, Olivo M: Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer* 2008; 13:7-56.
- Burns T, Wilson M, Pearson GJ: Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1995;29:192-197
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA: Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 2007;41:9-15
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A: The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1771-1776
- Colby SM, Russell RRB: Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1997;26:80S-88S
- Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA: *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-360
- Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000;34:491-7
- Dige I, Nilsson, H, Kilian M, Nyvad B: *In situ* identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007;115:459-467
- Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-193

- Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H: Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:206-212
- Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash MB, Higham SM: Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste *J Dent Res* 2001;80:1721-1724
- Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Guggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS: Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2009;34:728-734
- Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, Boussios CI, Kent R, Goodson JM, Tanner ACR, Soukos NS: The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque derived biofilms. *J Periodontal Res* 2009; 44:751-759
- Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, Bagnato VS: Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg* 2008;26:281-287
- Hamblin MR, Hasan T: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:436-50
- Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA: Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003;37:339-344
- Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G: Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications *Lasers Surg Med* 2006;38:468-481
- Jori G, Coppellotti O: Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. *Curr Med Chem Anti Infect Agents* 2007;6:119-131
- Komerik N, Wilson M: Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol* 2002;92:618-623
- Konopka K, Goslinski T: Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694-707
- Kubler AC: Photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 2005;20:37-45
- Lemos JA, Burne RA: A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 2008;154:3247-3255
- Lima JPM, Sampaio de Melo MA, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre dos Santos M, Rodrigues LKA, Zanin ICJ. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* 2009;117:568-574

- Marsh PD: Dental plaque as a microbial biofilm: *Caries Res* 2004;38:204-211
- Marsh PD: Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005;32:7-15
- Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G: Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp *in vitro* *J Periodontol Res* 2003;38:428-435
- Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S: Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemoter* 2006;58:190-192
- Muller, P.; Guggenheim, B.; Schmidlin, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 2007;115:77-80
- O'Neill JF, Hope C, Wilson M: Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med* 2002;3:86-90
- O'Neill JF, Wilson M, Wainwright M: Comparative antistreptococcal activity of photobactericidal agents. *J Chemoter* 2003;15:329-334
- Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei GJr, Tedesco AC, Ciancaglini P: Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005;50:353-359
- Petersen PE: The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31:3-23
- Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F: Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009;24:259-268
- Pratten J, Wilson M, Spratt DA: Characterization of *in vitro* oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:45-49
- Qin YL, Luan XL, Bi LJ, He G, Bai X, Zhou CN, Zhang ZG: Toluidine blue-mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques. *Lasers Med Sci* 2008;23:49-54
- Sbordone L, C Bortolaia: Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003;7:181-188
- Sedlacek MJ, Walker C: Antibiotic resistance in an *in vitro* subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:333-339

- Shemesh M, Tam A, Steinberg D: Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology* 2007;153:1307-1317
- Socransky SS, Haffajee AD: Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodont Res* 1991;26:195-212
- Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM: Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro *Lasers Surg Med* 1996;18:253-259
- Soukos NS, Ximenez-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T: Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2595-2601
- Steinberg D, Moreinos D, Featherstone J, Shemesh M, Feuerstein O: Genetic and physiological effects of noncoherent visible light combined with hydrogen peroxide on *Streptococcus mutans* in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2626-2631
- Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-138
- Strawn SE, White JM, Marshall GW, Gee L, Googis HE, Marshall SJ: Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions--short term. *J Dent* 1996;24:417-423
- Svensater G, Borgstrom M, Bowden GH, Edwardsson S: The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res* 2003;37:395-403
- van Houte J: Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994;73:672-681
- Wainwright M: Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13-28
- Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J, Robinson C: Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res* 2005;84:451-455
- Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M: The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2003;37:190-193
- Williams JA, 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;38:530-536
- Wilson M: Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993;75:299-306

- Wilson M: Bacterial biofilms and human disease. *Sci Prog* 2001;84:235-254
- Wilson M: Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem. Photobiol* 2004;3:412-418
- Wilson, BC, Patterson MS: The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 2008;53:R61-109.
- Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C: An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B* 1999;50:1-7
- Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms: *J Antimicrob Chemother* 2006;57:680-684
- Yamamoto K, Arai K, Fukazawa K, Fukui K, Nagamatsu K, Kato K: Effect of plaque fluoride released from a glass-ionomer cement on enamel remineralization *in situ*. *Caries Res* 2005;2:157-160
- Zanin ICJ, Brugnera JRA, Gonçalves RB: *In vitro* study of bactericidal effect of low level laser therapy in the presence of photosensitizer on cariogenic bacteria. *Lasers in Dentistry* 2002;3:154-161
- Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J: Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:324-330
- Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB: Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci* 2006;114:64-69
- Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM: Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1436-40
- Zero DT: *In situ* caries model. *Adv Dent Res* 1995;9:214-230

**Table 1.** Inclusion criteria of volunteers selection to the *in situ* study (n = 21)

<b>Volunteers</b>	<b>Buffering capacity of saliva (pH)</b>	<b>Salivary flow rate (mL/min)</b>	<b>Mutans streptococci (UFC/mL)</b>
Mean	6,8	1,2	1,79.10 <sup>8</sup>

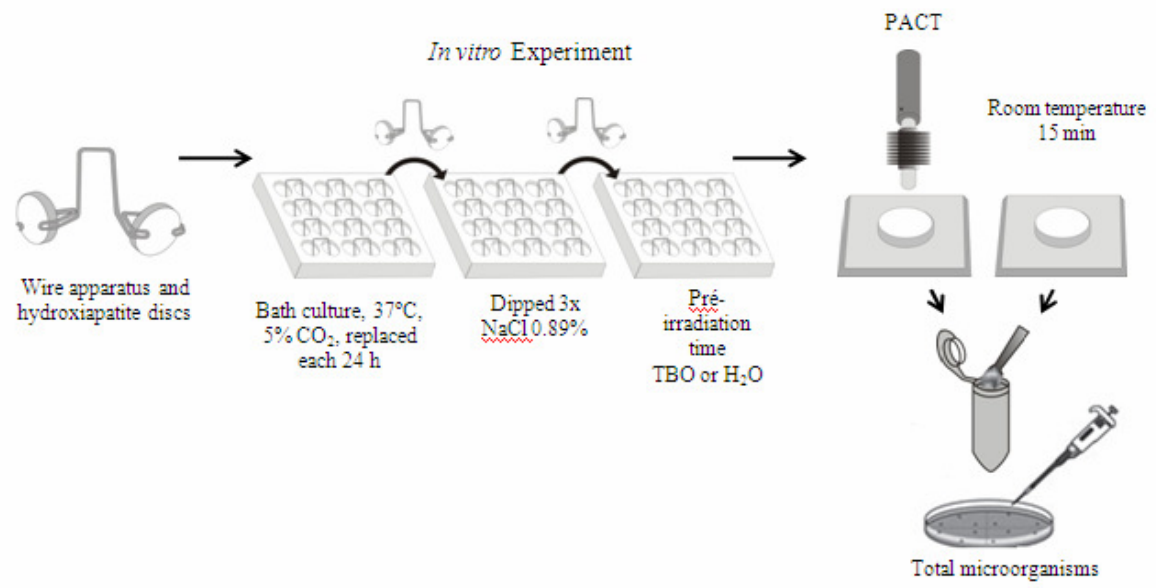


Fig. 1. Schematic illustration of *in vitro* experimental design



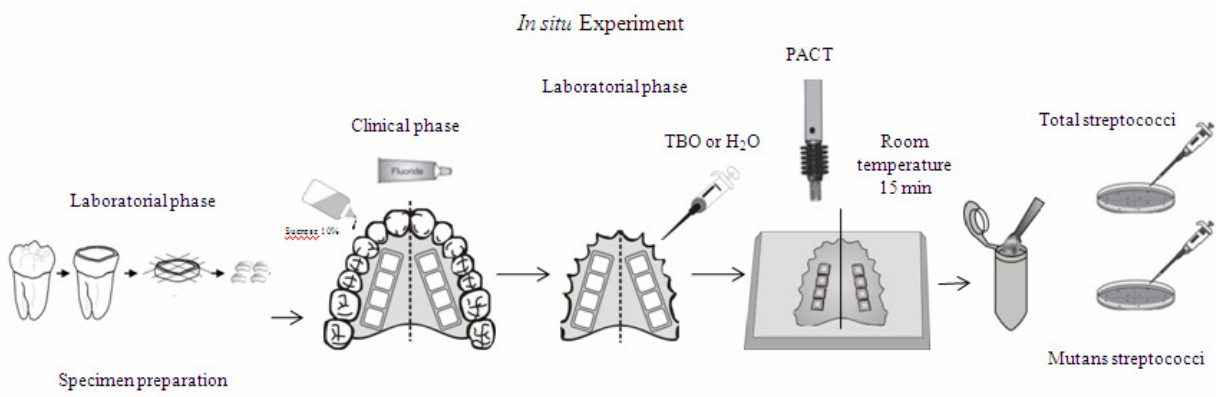


Fig. 2. Schematic illustration of *in situ* experimental design

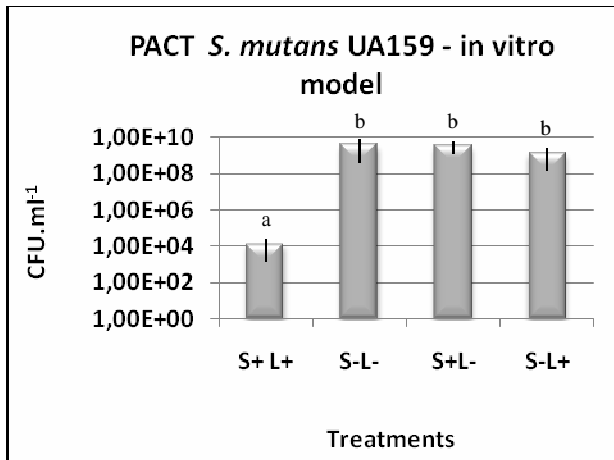


Fig. 3. Effects of the treatments of *in vitro* experiment; with sensitizer and light (S+L+); without sensitizer and without light (S-L-); with sensitizer and without light (S+L-) and without sensitizer and with light (S-L+) on the viability of total microorganisms.

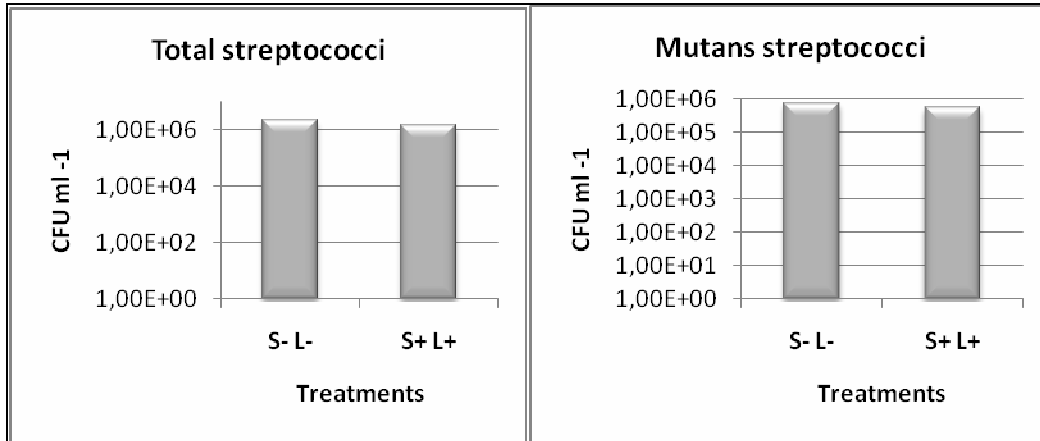


Fig. 4. Effects of PACT (S+L+) and control group (S-L-) of *in situ* study on the viability of total streptococci and mutans streptococci.

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

- A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ocasionou efetiva redução na população de *Streptococcus mutans* UA159 oriundos de biofilmes formados *in viro* utilizando um diodo emissor de luz - LED como fonte de luz (620-660 nm) na presença do corante azul de orto-toluidina na concentração de 100µg mL<sup>-1</sup>.
- A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana aplicada sobre biofilmes multi-espécies, crescidos *in situ*, não promoveu redução na população de estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans.

## REFERÊNCIAS

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The oral Microbiota: living with a permanent guest. **DNA Cell Biol.**, v.28, p.405-411, 2009.

BHATTI, M.; MACROBERT, A.; MEGHJI, S.; HENDERSON, B.; WILSON, M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro. **Photochem.Photobiol.**, v. 65, p. 1026-1031, 1997.

BIEL, M. A. Photodynamic therapy in head and neck cancer. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 4, p. 87-96, 2002.

BOWDEN, G. H. Controlled environment model for accumulation of biofilms of oral bacteria. **Methods Enzymol.**, v. 310, p. 216-24, 1999.

BURNE, R. A. Oral streptococci: products of their environment. **J. Dent. Res.**, v. 77, p. 445-452, 1998.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. **J. Dent.**, v. 22, n. 5, p. 273-278, 1994.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 29, p. 192-197, 1995.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbial. Rev.**, v.15, p.167-193, 2002.

FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H. J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J.; SCHLAG, P. M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clin. Chim. Acta.**, v. 274, p. 89-104, 1998.

GARCEZ, A. S.; NÚÑEZ, S. C.; LAGE-MARQUES, J. L.; JORGE, A. O. C.; RIBEIRO, M. S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, p. 93-98, 2006.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; TEGOS, G. P.; NÚÑEZ, S. C.; JORGE, A. O. C.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional

endodontic treatment to eliminate root canal biofilms infection. **Lasers Surg. Med.**, v. 39, p. 59-66, 2007.

GILBERT, P.; MAIRA-LITRAN, T.; MCBAIN, A. J. ; RICKARD, A. H.; WHYTE, F. W. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 46, p. 203–255, 2002.

GIUSTI, J. S.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A. C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomed. Laser Surg.**, v. 26, p.281-287, 2008.

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

HAYEK, R. R. A.; ARAÚJO N. S.; GIOSO M. A.; FERREIRA J.; BAPTISTA-SOBRINHO C. A.; YAMADA JUNIOR A. M. *et al.* Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature induced peri-implantitis in dogs. **J. Periodontol.**, v.76, p.1275-1281, 2005.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 413-437, 2000.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R. N.; BLEHERT, D. S.; EGLAND, P. G.; FOSTER, J. S.; PALMER, R. J. Communication among oral bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 486-505, 2002.

KOMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **J. Appl. Microbiol.**, v.92, p. 618-623, 2002.

KOMERIK, N.; NAKANISHI, H.; MACROBERT, A. J.; HENDERSON, B.; SPEIGHT, P.; WILSON, M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 932-940, 2003.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **J. Dent. Res.**, v. 86, p. 694-707, 2007.

KUBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Med. Laser Appl.**, v. 20, p.37-45, 2005.

LI, Y-H.; LAU, P. C. Y.; LEE, J. H.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **Infect. Immun.**, v. 183, p. 897–908, 2001.

MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G.; PHILLIPS, D. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: \_\_\_\_\_. **Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use.** Chichester: Wiley, 1989. p. 4-16.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-9, 2001.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers Med. Sci.**, v. 22, p. 83-91, 2007.

MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 5, n. 3/4, p. 281-93, 1990.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, v. 38, p. 204–211, 2004.

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

MILSON, C. E.; THURREL, W.; BUONACCORSI, G.; WILSON, M.; MACROBERT, A. J.; BOWN, S. G. The effect of low-power laser light at different doses on gastric mucosa sensitized with methylene blue, haematoporphyrin derivative or toluidine blue. **Lasers Med. Sci.**, v.12, p. 145-150, 1997.

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

O'NEILL, J. F.; HOPE, C.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers Surg. Med.**, v. 3, p. 86-90, 2002.

PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI, G.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, p. 353-359, 2005.

PELOI, L. S.; SOARES, R. R.; BIONDO, C. E.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.**, v.2, p. 231-237, 2008.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: an overview. **Med. Laser Appl.**, v. 18, p. 7-19, 2003.

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

PRATES, R. A.; YAMADA, A. M., JR.; SUZUKI, L. C.; EIKO HASHIMOTO, M. C.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 86, p. 70-76, 2007.

RAYMOND, B. Photodynamic therapy in historical perspective. **Contemp. Pharmacoter.**, v. 10, p. 1-14, 1999.

SHEMESH, M.; TAM, A.; STEINBERG, D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. **Microbiology**, v. 153, p. 1307-1317, 2007.

SBORDONE, L.; C. BORTOLAIA. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin. Oral Investig.**, v. 7, p. 181-188, 2003.

SOUKOS, N. S.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 2595-25601, 1998.

SOUKOS, N. S.; MULHOLLAND, S. E.; SOCRANSKY, S. S.; DOUKAS, A. G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg. Med.**, v. 33, p. 161-168, 2003.

SPRATT, D. A.; PRATTEN, J. Biofilms and the oral cavity. **Rev. Environ. Sci. Biol. Technol.**, v. 2, p. 109-120, 2003.

SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J. *et al.* Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 205, p. 139-46, 2001.



SVENSATER, G.; BORGSTROM, M.; BOWDEN, G. H.; EDWARDSSON, S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. **Caries Res.**, v. 37, p. 395-403, 2003.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, p. 13-28, 1998.

WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1196-1203, 2002.

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

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, n. 4, p. 299-306, 1993.

WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, n. 5, p. 569-574, 1995.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol.**, v. 3, p. 412-418, 2004.

WOOD, S.; NATTRESS, B.; KIRKHAM, J.; SHORE, R.; BROOKES, S.; GRIFFITHS, J. *et al.* An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 1999.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 680-684, 2006.

ZANIN, I. C.; GONÇALVES, R. B.; JUNIOR, A. B.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n. 2, p. 324-330, 2005.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L. K.; PIMENTA, L. A.; HOFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 114, n. 1, p. 64-69, 2006.

## APÊNDICE A

### INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA – PARA OS VOLUNTÁRIOS QUE DOARÃO OS DENTES

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Alrieta Henrique Teixeira (aluna de mestrado do curso de Odontologia) e Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin, onde você autoriza, por escrito, sua doação de dentes terceiros molares, extraídos por necessidades clínicas, após conhecer os procedimentos que serão realizados e tendo liberdade para decidir sem qualquer coação.

Título do trabalho: “AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES ORAIS CRESCIDOS *IN VITRO* E *IN SITU*”.

Objetivos: Este estudo vai avaliar a se a terapia fotodinâmica (associação de uma luz - LED e de um corante) é capaz de matar bactérias presentes na placa dental.

Justificativa: A maioria dos estudos que avaliou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em experimentos laboratoriais onde os micro-organismos que causam doenças bucais não crescem da mesma forma quando estão na boca. LEDs iguais ao utilizado neste estudo são vendidos no Brasil e seria interessante verificar se eles, também, são capazes de matar as bactérias que causam a doença cárie. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a terapia fotodinâmica pode matar bactérias crescidas no laboratório e, agora, queremos observar se é possível matar as bactérias presentes na placa dental que causa o início da cárie.

Procedimento experimental: Para a realização desse estudo, serão selecionados terceiros molares (“dente do ciso”) que ainda não apareceram na boca (inclusos) e que não tenham fraturas e rachaduras. Os dentes serão cortados em blocos de dentina, medindo 4x4x2 mm e mantidos em ambiente úmido até serem inseridos nos dispositivos intra-orais palatinos.

Desconforto ou riscos esperados e benefícios vinculados à pesquisa: Os voluntários que doarem os seus dentes extraídos não sofrerão nenhum risco porque os dentes utilizados serão extraídos, segundo razões clínicas e decisão de tratamento do cirurgião dentista do próprio voluntário.

Forma de acompanhamento e assistência: A assistência necessária será dada pelo dentista responsável pela extração dos dentes, não estando vinculada aos pesquisadores.

Métodos alternativos existentes: Optou-se por utilizar dentes humanos ao invés de dentes bovinos, para simular uma condição mais próxima possível daquela existente na cavidade bucal.

Garantia de esclarecimento: O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os pesquisadores proporcionarão informação atualizada sobre essa pesquisa. O voluntário tem, também, liberdade para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento. Qualquer dúvida, favor comunicar o mais rápido possível. Tel: (88) 9928-0676 (Alrieta Teixeira)

Retirada do Consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

Garantia de sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Formas de ressarcimento e indenização: Como os pesquisadores não participarão dos procedimentos de decisão e extração dos dentes, não haverá formas de ressarcimento e indenização. ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária.

Eu, \_\_\_\_\_, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna Alrieta Henrique Teixeira e Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a utilização dos meus dentes, que foram extraídos por razões alheias à vontade dos pesquisadores na pesquisa acima mencionada.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome (por extenso): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Digital
---------

## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ESTUDO *in situ*

Sou estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará – UFC e estou desenvolvendo uma pesquisa sob a orientação da Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin cujo título é: “AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA SOBRE BIOFILMES ORAIS CRESCIDOS *IN VITRO* E *IN SITU*”. Esclareço que: “terapia fotodinâmica antimicrobiana” consiste em uma associação entre uma luz - LED e de um corante, sendo potencialmente capaz de matar bactérias presentes na placa dental; “biofilme” é uma forma que os micro-organismos se organizam e que está relacionada ao surgimento de doenças bucais como a cárie dentária e a inflamação da gengiva; o termo “*in vitro*” significa que foi realizado em laboratório, e “*in situ*” se refere ao desenvolvimento da placa dental sobre aparelhos colocados na boca. Assim, solicito sua colaboração na pesquisa sendo voluntário para o tratamento proposto.

Objetivo da pesquisa - Avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica (aplicação de luz associada a um corante) sobre biofilmes orais (bactérias aderidas à superfície dental) produzidos *in situ*.

Detalhamento dos procedimentos:

1. Serão selecionados 15 voluntários que utilizarão dispositivos intra-orais palatinos (aparelho no palato) contendo 8 blocos de dentina humana durante 7 dias. Para simular uma situação de desafio cariogênico, será gotejada uma solução de sacarose a 10% sobre os blocos de dentina, 8 vezes ao dia.

2. Em um período anterior ao início (7 dias) da pesquisa e durante todo o período experimental, os voluntários deverão fazer uso do dentífrício fluoretado padronizado (Sorriso-Kolynos) a fim de manter concentrações similares de flúor na saliva.

3. Todos os blocos de dentina contidos no dispositivo deverão ser gotejados com a solução de sacarose a 10% (uma gota sobre cada bloco de dentina) oito vezes ao dia respeitando os horários pré-determinados pelo pesquisador (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00 e 20:00 horas). O dispositivo deverá ser recolocado na boca sem ser lavado, cinco minutos após o gotejamento;

4. Utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir; remover o dispositivo intra-oral somente durante as refeições ou ingestão de qualquer bebida ácida, durante este período o mesmo deve ser conservado no estojo fornecido e em ambiente úmido com o objetivo de manter as bactérias do biofilme dental viáveis;

5. Fazer uso de creme dental três vezes ao dia. Durante a escovação, o dispositivo deverá ser removido e os voluntários deverão limpar seus aparelhos cuidadosamente para evitar a remoção do biofilme dental formado sobre os blocos. O tempo de escovação do dispositivo e dos dentes não deve exceder 3 minutos e a região da trelinha deve ser escovada delicadamente para evitar remoção ou perturbação da placa bacteriana;

6. Fazer uso de água fluoretada de abastecimento de Sobral (0,7 ppm F).

Essa pesquisa não provocará nenhum tipo de riscos ou prejuízos ao voluntário uma vez que sejam seguidas as orientações descritas acima. Poderá ocorrer leve desconforto decorrente do período de adaptação do dispositivo intra-oral o que é minimizado com o uso continuado.

Não haverá qualquer prejuízo ou despesa para o voluntário não havendo, portanto, formas de indenização ou ressarcimento de despesas.

O voluntário estará colaborando para a produção de biofilme oral por meio de uma simulação mais próxima do real onde a terapêutica aplicada poderá fornecer informações que poderão ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção de doenças bucais, incluindo a cárie dentária.

Será garantido total sigilo e o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo sem qualquer prejuízo ao voluntário. Endereço e telefone da pesquisadora para contato: Av. Comandante Maurocélis Rocha Ponte, s/n - Derby - Sobral/CE. Telefones: 36132603/ 99280676

Nome e Assinatura do pesquisador \_\_\_\_\_

Alrieta Henrique Teixeira

### CONSENTIMENTO PÓS- INFORMADO

Declaro que tomei conhecimento do estudo cujo título é: “**EXPRESSÃO DE GENES POR *Streptococcus mutans* CRESCIDOS *in situ* e *in vivo* SUBMETIDOS OU NÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA**”, a ser realizado pela estudante de mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Alrieta Henrique Teixeira, compreendi seus propósitos e concordo em participar da pesquisa.

Sobral, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_.

Alrieta Henrique Teixeira (88) 99280676

Assinatura do voluntário

Digital

Prof. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin (88) 36132603

## APÊNDICE C

### ORIENTAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS DO EXPERIMENTO *in situ*

Caros voluntários,

Agradeço antecipadamente a disponibilidade para participação nesta pesquisa e informo que:

1. Os dispositivos intra-orais palatinos (aparelho no palato) serão utilizados por um período total de 7 dias;
2. Todos os blocos de dentina contidos no dispositivo deverão ser gotejados com a solução de sacarose 10% (uma gota sobre cada bloco) oito vezes ao dia respeitando os horários pré-determinados (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00 e 22:00 horas). O dispositivo deverá ser recolocado na boca sem ser lavado, cinco minutos após o gotejamento;
3. Utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir; remover o dispositivo intra-oral somente durante as refeições ou ingestão de qualquer bebida ácida, durante este período o mesmo deve ser conservado no estojo fornecido e em ambiente úmido (envolvido na gaze) com o objetivo de manter as bactérias do biofilme dental viáveis;
4. Fazer uso de creme dental três vezes ao dia. Durante a escovação, o dispositivo deverá ser removido e os voluntários deverão limpar seus aparelhos cuidadosamente para evitar a remoção do biofilme dental formado sobre os blocos. O tempo de escovação do dispositivo e dos dentes não deverá exceder 3 minutos e a região da telinha deve ser escovada delicadamente para evitar remoção ou perturbação da placa bacteriana;
5. Fazer uso de água fluoretada de abastecimento de Sobral (0,7 ppm F).

Informo ainda que essa pesquisa não prevê riscos ou prejuízos ao voluntário uma vez que sejam seguidas as orientações descritas acima. Poderá ocorrer leve desconforto decorrente do período de adaptação do dispositivo intra-oral o que é minimizado com o uso continuado.

Estou à disposição para quaisquer esclarecimentos,  
Arieta Henrique Teixeira cel. (88) 99280676(88) 36145402

## ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

---

§2º - No caso de não cumprimento do prazo estipulado no §1º, o orientador deverá encaminhar, antes de seu vencimento e ouvido o aluno, solicitação de ampliação do prazo, mediante justificativa e descrição da etapa de desenvolvimento do projeto.

§3º - O aluno que não obtiver aprovação no Exame Geral de Conhecimentos, terá direito à nova oportunidade, desde que respeitados os artigos 4 e 5 das Normas para os Cursos de Pós-Graduação da UFC.

§4º - O aluno só poderá defender a Dissertação após aprovação no Exame Geral de Conhecimentos de que trata este artigo.

**Artigo 46** – As dissertações apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação em formato tradicional ou as sessões gerais do formato alternativo deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br/servicos.html#apoio>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *MANUAL DE NORMALIZAÇÃO PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO E TESE DE DOUTORADO NO FORMATO ALTERNATIVO do PPGO*.

**Artigo 47** – Para cada aluno deverá ser constituída uma banca examinadora, que será formada por 03 (três) professores ou especialistas, com o título de Doutor, como membros efetivos e dois suplentes.

§1º - Os membros da banca examinadora de que trata o *caput* deste artigo constituirão a Comissão Julgadora, cuja presidência caberá ao orientador da Dissertação.

§2º - Dentre os membros efetivos da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§3º - Dentre os membros suplentes da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§4º - Quando na orientação da dissertação houver a participação de co-orientador, este não poderá participar da banca examinadora.

## ANEXO B



UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ  
Comitê de Ética em Pesquisa



GOVERNO DO  
ESTADO DO CEARÁ  
Secretaria da Ciência, Tecnologia  
e Educação Superior

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## Parecer Consubstanciado

**Parecer Nº. 669**

**Processo Nº. FR – 195510**

**Título do projeto:** Expressão de genes por *Streptococcus mutans* crescidos *in situ* e *in vivo* submetidos ou não à terapia fotodinâmica.

**Grupo:** III

**Nível:** Não se aplica

**Pesquisadora Responsável:** Alrieta Henrique Teixeira.

**Tipo de Pesquisa:** Experimental com Material Biológico Humano.

**Instituição onde será desenvolvida:** Universidade Federal do Ceará.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA reavaliou o protocolo de pesquisa, cuja sua entrada neste CEP foi no dia 19 de Junho de 2008, intitulado: “Expressão de genes por *Streptococcus mutans* crescidos *in situ* e *in vivo* submetidos ou não à terapia fotodinâmica”, que tem como objetivo geral, avaliar o padrão de expressão gênica de *Streptococcus mutans* inseridos em