



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

JULIANA PAIVA MARQUES LIMA

ESTUDO *IN SITU* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM LESÕES DE CÁRIE DENTINÁRIA

FORTALEZA

2009

JULIANA PAIVA MARQUES LIMA

ESTUDO *IN SITU* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM LESÕES DE CÁRIE DENTINÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos 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
2009

Ficha catalográfica

L698e Lima, Juliana Paiva Marques

Estudo *in situ* do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em lesões de cárie dentinária/ Juliana Paiva Marques Lima. – Fortaleza, 2009.

52 f. : il.

Orientador: 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. Cárie Dentária 2. Fotoquimioterapia 3. Análise Microbiológica
I. Zanin, Iriana Carla Junqueira (orient.) II. Título.

CDD 617. 67

JULIANA PAIVA MARQUES LIMA

ESTUDO *IN SITU* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM LESÕES DE CÁRIE DENTINÁRIA

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- Campus Sobral

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

Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury
Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

A Deus,

por tudo que tenho e que sou ...

Aos meus pais, Adriano e Darcy, exemplo de amor e respeito e por terem me ensinado sempre a importância da perseverança na busca pelos objetivos

À minha irmã, Adriana, pelo auxílio. Minha eterna amiga.

Ao Renan, que sempre me estimula a cada nova etapa, estando sempre ao meu lado e acreditando na concretização de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. **Iriana Carla Junqueira Zanin**, minha orientadora, por seus ensinamentos, por suas palavras de apoio e amizade e por sua maneira tranqüila de transmitir seus conhecimentos e me acalmar nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, minha co-orientadora, presente, simplesmente, em todos os momentos. Também pelo exemplo de professora e pesquisadora.

À grande amiga, **Mary Anne Sampaio de Melo**, pela parceria em todas as etapas do mestrado; por compartilhar comigo momentos de angústia, alegria e dúvidas comuns e por não medir esforços na realização das nossas pesquisas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará na pessoa do seu Reitor **Jesualdo Pereira Farias**.

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

À coordenadora do curso de Odontologia Prof. Dra. **Maria Eneide Leitão de Almeida**.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Lima Santiago**, coordenador do curso de mestrado da UFC, pela competente e exemplar função de coordenador.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury** por sua grandiosa contribuição nos estudos em cariologia.

Aos meus colegas da turma de mestrado, pela amizade, companheirismo e pela boa convivência.

Às minhas amigas **Fátima Maria Cavalcante Borges, Rosane Pontes de Souza, Suyane Maria Luna Cruz de Vasconcelos, Maria Denise Rodrigues de Moraes e Daniela da Silva Bezerra**, agradeço pelo empenho em cada momento, inclusive nas tardes de sábado no laboratório de pesquisa. Agradecimento especial a **Alrieta Henrique Teixeira** por seu esforço em minha pesquisa e por viajar para a realização desta. Obrigada, também, por seu acolhimento em sua casa em 15 ininterruptos dias.

À equipe do laboratório de microbiologia de Sobral, **Ruliglesio Rocha, Emanuela de Lima Rebouças, Eliane Doas Santos Pereira**, por o esforço de nos acompanhar em todos os momentos da pesquisa desenvolvida na cidade.

À amiga, **Kátia Linhares Lima Costa**, pela especial hospedagem em sua casa na cidade de Sobral durante a realização da pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica, **Diego Martins de Paula e João Paulo Saraiva Wenceslau**, pela presteza e ajuda indispensáveis em todas as etapas da pesquisa.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de auxílio financeiro.

Aos professores do curso de mestrado pela contribuição ao meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. **José Jeová Siebra Neto**, primeiro coordenador do curso de mestrado em Odontologia da UFC pela dedicação na concretização deste curso e pelos ensinamentos que me repassou no decorrer do curso.

Aos funcionários de mestrado **Germano Mahlmann Muniz Filho e Lúcia Ribeiro Marques** Lustosa, pela constante disponibilidade.

À bibliotecária, **Rosane Costa**, da Biblioteca das Ciências de Saúde da UFC, pela correção das referências bibliográficas.

Ao técnico em prótese dental do curso de Odontologia, **Antônio Carlos de Oliveira Filho**, pela confecção dos dispositivos intra-orais.

À amiga, **Raquel Saraiva Rolim**, meus agradecimentos pela disponibilidade e paciência na elaboração dos esquemas gráficos.

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários desta pesquisa.

Aos meus familiares e amigos pela compreensão às muitas horas em que tive ausente para a dedicação ao estudo.

A todos que de maneira direta ou indireta ajudaram na elaboração desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

“O Senhor é minha fortaleza e meu escudo;
nele confia meu coração”

(Sl 28:7)

RESUMO

Terapia fotodinâmica é um conceito de tratamento sugerido pela literatura como uma potencial terapia capaz de proporcionar inativação microbiana. Desta forma, este estudo avaliou a ação da terapia fotodinâmica sobre lesões de cárie dentinária, mediante um delineamento *in situ* de única fase. Durante 14 dias, 20 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais palatinos, contendo, cada um, seis blocos de dentina humana. Todos os voluntários foram instruídos a gotejar sobre os blocos uma solução de sacarose a 40% dez vezes ao dia, simulando um desafio cariogênico e a utilizar dentifrício fluoretado três vezes ao dia. No final deste período clínico, os blocos foram randomicamente alocados em um dos seguintes grupos: sem fotossensibilizador e luz (F-L-); com fotossensibilizador e sem luz (F+L-); sem fotossensibilizador e com luz com densidade de energia de $47\text{J}/\text{cm}^2$ (F-L+47); sem fotossensibilizador e com luz com densidade de energia de $94\text{J}/\text{cm}^2$ (F-L+94); com fotossensibilizador e irradiados com densidade de energia de $47\text{J}/\text{cm}^2$ (F+L+47); com fotossensibilizador e irradiados com densidade de energia de $94\text{J}/\text{cm}^2$ (F+L+94). O fotossensibilizador de escolha foi azul de orto-toluidina na concentração de $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ e a irradiação originada de um diodo emissor de luz (LED) com comprimento de onda predominante em $638,8\text{nm}$. Amostras de dentina cariada de cada bloco foram coletadas antes e após os tratamentos e analisadas para contagem de microorganismos totais, estreptococos totais, estreptococos grupo mutans e lactobacilos. Os dados das contagens foram transformados em \log_{10} , os valores de log redução foram obtidos e as diferenças estatísticas identificadas através dos testes ANOVA One way e Tukey Kramer ($p < 0,05$). Em ambas as análises, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as contagens microbiológicas antes e depois dos tratamentos nos grupos (F-L+94), (F+L+47), (F+L+94) para todos os microrganismos testados. Concluiu-se que a terapia fotodinâmica foi efetiva na morte microbiana nos parâmetros testados e que o tempo de exposição da dentina à luz de 10 minutos, também, promoveu inativação microbiana.

Palavras-chave: Cárie Dentária, Fotoquimioterapia, Análise Microbiológica.

ABSTRACT

Photodynamic therapy is a concept of treatment, suggested by the literature as a potential therapy capable of inactivating microbial. Thus, this study assessed the efficacy of photodynamic therapy on injuries of dentine caries by a *in situ* design of single phase. During 14 days, 20 volunteers wore intra-oral palatal devices containing six human dental dentine slabs. The volunteers were asked to drop a 40% sucrose solution onto the slabs ten times per day, in order to simulate a cariogenic challenge and to use fluoride dentifrice three times per day. At the end of the experimental period the slabs were randomly allocated into one of the following groups: without sensitizer and light (S-L-); with sensitizer and without light (S+L-); without sensitizer and irradiated with 47J/cm² energy density (S-L+47); without sensitizer and irradiated with 94J/cm² energy density (S-L+94); with sensitizer and irradiated with 47J/cm² energy density (S+L+47); and with sensitizer and irradiated with 94J/cm² energy density (S+L+94). The sensitizer of choice was the toluidine blue O at 100 µg/mL concentration and radiation originated from a light-emitting diode (LED) with a 638,8 nm predominant wavelength. Before and after the treatments, dentine samples were collected and analyzed to figure out the total microorganisms, total streptococci, mutans streptococci and lactobacilli. The data of the counts were transformed into log₁₀. The values of log reduction was achieved and the statistical differences identified by ANOVA One way and Tukey Kramer tests (p<0,05). In both analyses, statistically significant difference between the microbial counts before and after treatment in groups (S-L+47), (S+L+94), (S+L+94) for all microorganisms tested are founded. It was concluded that PACT in the tested parameters was effective in promoting microbial death and that the exposure time of dentine to 10 minutes of light was also effective in microbial inactivation.

Keywords: Dentine Caries, Photochemotherapy, Microbiological Analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2	PROPOSIÇÃO.....	15
3	CAPÍTULOS.....	16
4	CONCLUSÃO GERAL.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICES.....	44
	ANEXOS.....	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os primeiros relatos da utilização da terapia fotodinâmica (TFD) datam do início do século XIX, quando Oscar Raab, um estudante alemão de medicina, reportou o conceito de indução de morte celular através da interação de agentes químicos e luz, constatando que a toxicidade do hidrocloreto de acridina contra *Paramecia caudatum* foi dependente da quantidade de luz incidida (RAAB, 1900). A TFD, tornou-se uma alternativa promissora para o tratamento do câncer e outras doenças há duas décadas, tendo progressivamente sido bem estabelecida e recebido aprovação para uso clínico em muitos países (HAMBLIN; HASAN, 2004; PLAETZER *et al.*, 2003). Mais recentemente, esta terapia passou a ser pesquisada e utilizada com o propósito de redução microbiana, recebendo o nome de terapia antimicrobiana fotodinâmica (MALIK; HANANIA; NITZAN, 1990).

O mecanismo de ação da TFD tanto na medicina oncológica quanto na microbiologia se baseia em uma reação fotoquímica não térmica que requer a presença de um fotossensibilizador (em geral um corante), oxigênio e luz visível (MACROBERT; BOWN; PHILLIPS, 1989). A terapia consiste na irradiação de luz visível em um comprimento de onda complementar ao fotossensibilizador, levando a excitação da molécula e sua passagem para um estado singlete. Nessa forma, a molécula apresenta um tempo de vida bastante limitado, passando, então, para um estado tripleto, que apesar de ter baixa energia, tem um tempo de vida considerado relativamente longo (10^{-9} segundos) (RYTER; TYRREL, 1997). Nesse período, aumenta a probabilidade do fotossensibilizador transferir energia para outras moléculas e seguir um dos dois caminhos denominados como fotoproceto do tipo I e tipo II (FUCHS; THIELE, 1997; YAVARI, 2006). No primeiro processo, há interação do fotossensibilizador com moléculas vizinhas ou átomos de hidrogênio havendo produção de radicais livres, íons superperóxidos e radicais hidroxila. No fotoproceto do tipo II, há uma interação direta do fotossensibilizador com o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete (1O_2) (BRANCALEON; MOSELEY, 2002; PLAETZER *et al.*, 2003; CASTANO; DEMINOVA; HAMBLIN, 2004). Juntos, todos estes produtos, podem interagir com proteínas mitocondriais da célula alvo alterando sua estrutura e atividade, provocar 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; MITRA, 2004).

Em microbiologia, a terapia antimicrobiana fotodinâmica passou a receber atenção especial por apresentar vantagens em relação ao tratamento com agentes antimicrobianos convencionais, tais como: o confinamento do efeito ao local da lesão pela 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, mesmo após repetido uso (BACKHAUS *et al.*, 2007).

Para que a terapia antimicrobiana fotodinâmica exerça algum efeito na célula bacteriana, a luz deve ser absorvida por um ou mais de seus constituintes. Embora algumas bactérias apresentem componentes capazes de absorver parte do espectro de luz visível, a maioria das espécies encontradas na cavidade oral não apresenta esses componentes, de modo que o uso de fotossensibilizadores exógenos, que atraia para si a luz, é fundamental ao sucesso dessa terapia (WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992).

Uma grande variedade de corantes naturais e sintéticos tem sido desenvolvida e testada com relação às propriedades farmacológicas e de absorção à luz. (PRATES *et al.*, 2006; PELOI *et al.*, 2008). Um largo número de fotossensibilizadores tem sido testado *in vitro* contra microorganismos orais, incluindo os derivados fenotiazínicos, como azul de metileno e azul de orto toluidina (ZANIN *et al.*, 2005); os derivados da fitalacionina, como fitalacionina dissulfonado alumínio (AlPcS₂) e fitalacionina catiônica com Zn(II) (WILSON *et al.*, 1995); os derivados das clorinas (WILSON, 2004); além de rosa bengal (PAULINO *et al.*, 2005), verde de malaquita (PRATES *et al.*, 2006), e porfirinas (HAMBLIN; HASAN, 2004).

Assim como o fotossensibilizador, a escolha da fonte de luz é um importante fator para o êxito da terapia fotodinâmica. A fim de otimizar o tratamento, é essencial que a emissão de luz coincida com o pico de absorção do fotossensibilizador escolhido (FISCHER *et al.*, 1998). Embora lasers convencionais sejam tradicionalmente utilizados, recentemente o uso dos LEDs tem se intensificado, uma vez que, por não apresentarem boa colimação e coerência, resultam em bandas de emissão de luz mais largas, favorecendo, assim, a complementaridade com o fotossensibilizador (ZANIN *et al.*, 2006; PELOI *et al.*, 2008; GIUSTI *et al.*, 2008).

Pesquisas laboratoriais, avaliando o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, tendo LEDs como fonte de luz, merecem atenção especial, uma vez que esses dispositivos apresentam vantagens em relação ao uso dos lasers convencionais por serem dispositivos

semicondutores pequenos e portáteis e por apresentarem baixo custo em comparação a outras fontes de luz (ZANIN *et al.*, 2005; KONOPKA; GOSLINSKI, 2007).

A ação antimicrobiana de lasers ou LEDs, associados a fotossensibilizadores específicos sobre bactérias crescidas em cultura planctônica, já está bem documentada na literatura (WILSON *et al.*, 1993; BURNS; WILSON; PEARSON, 1994; SOUKOS *et al.*, 1998; WILLIAMS *et al.*, 2003; MATEVKI *et al.*, 2003; PAULINO *et al.*, 2005). Da mesma forma, os efeitos desse tratamento, sobre biofilmes bacterianos organizados, já foram estabelecidos. (WOOD *et al.*, 1999; O'NEILL; HOPE; WILSON, 2002; GAD *et al.*, 2004; ZANIN *et al.*, 2005, 2006; WOOD *et al.*, 2006, METCALF *et al.*, 2006). No entanto, ainda não há estudos que demonstrem o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em lesões de cárie dentinária humana.

A cárie dentária é uma doença crônica caracterizada pela destruição progressiva e localizada do dente (MARSH; MARTIN, 1992). Após a desmineralização do esmalte, a lesão pode progredir para a dentina, sendo caracterizada por duas camadas distintas. A camada mais externa, denominada de dentina infectada, consiste de uma área amolecida, amarelada e não é passível de remineralização. A camada mais interna, denominada dentina contaminada, é escura e endurecida, apresentando uma menor contaminação bacteriana e sendo, portanto, passível de remineralização. Kidd, Ricketts e Beighton (1996) propuseram que somente a remoção da dentina infectada seria necessária, se as bactérias da dentina contaminada fossem removidas ou mortas. Contudo a distinção entre essas zonas é extremamente crítica, de modo que os tratamentos atuais envolvem a remoção total da dentina infectada e contaminada, removendo, desnecessariamente, a dentina passível de remineralização que se encontra sobre a polpa, aumentando o risco de uma exposição pulpar e comprometendo o prognóstico do dente. Desse modo, a utilização de um tratamento alternativo complementar à remoção mecânica e capaz de matar bactérias *in situ*, poderia diminuir a quantidade de tecido dentinário a ser removido (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995).

Nesse sentido, a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa de tratamento para as lesões de cárie dentária por consistir em um método conservador local, possivelmente capaz de eliminar as bactérias presentes no tecido dentinário (WILSON *et al.*, 2004). O uso dessa terapia, sobre bactérias na lesão de cárie, deve ser bem estabelecido, já que seu efeito pode ser reduzido, tanto pela diminuição de penetração do corante, quanto pela dificuldade de propagação da luz no interior dos túbulos dentinários (BURNS; WILSON; PEARSON, 1995). Diante do exposto, este estudo teve como objeto avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre lesões de cárie dentinária produzidas *in situ*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em lesões de cárie dentinária produzidas *in situ*, utilizando para tanto a associação de um LED (620-660nm) e azul de orto toluidina.

3 CAPÍTULOS

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato (Anexo A). Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo nº 143/06 (Anexo B). Assim sendo, esta dissertação de mestrado é composta de um capítulo que contém um artigo submetido para a publicação no periódico “European Journal of Oral Science”, conforme descrito abaixo (Anexo C), previamente analisado e corrigido por um corretor da língua inglesa (Anexo D):

✓ Capítulo 1

***In situ* study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in dentine caries lesions**

Lima JPM, Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Zanin ICJ.

***In situ* study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in dentine caries lesions**

Juliana Paiva Marques Lima¹

Mary Anne Sampaio de Melo¹

Fátima Maria Carvalho Borges¹

Alrieta Henrique Teixeira²

Carolina Steiner-Oliveira³

Marinês Nobre dos Santos³

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues¹

Iriana Carla Junqueira Zanin²

¹Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

²Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

³Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil.

Running Title –Lethal photosensitization in carious dentine.

* Corresponding author: Iriana Carla Junqueira Zanin. Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, 186 Geraldo Rangel Av., Sobral, Brazil, Zip Code: 62041-380. Telephone number +55 88 36132603, e-mail: irianaz@yahoo.com.br

Lima JPM^{*}, Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Zanin ICJ

***In situ* study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in dentine caries lesions**

Eur J Oral Sci

Abstract : Photodynamic antimicrobial therapy (PACT) promotes bacterial death due to photosensitisation of microbial components. This study evaluated the effect of PACT on dentine caries produced *in situ*. Over the course of 14 days, 20 volunteers wore intra-oral devices containing human dentine slabs that received a 40% sucrose solution, 10 times/day. Afterwards, the antimicrobial effect of toluidine blue O associated with 47 or 94 J.cm⁻² of a light emitting diode (LED) was evaluated. Before and after the treatments, dentine samples were analysed with regard to the total microorganisms, total streptococci, *mutans streptococci* and *lactobacilli*. Log reductions obtained for the several treatments were statistically analysed by one-way ANOVA and Tukey-Kramer test (p<0.05). Significant reductions were observed for PACT with both tested energy densities, with the following values observed for 47 and 94 J.cm⁻²: for total streptococci, 3.45 and 5.18; for *mutans streptococci*, 3.08 and 4.16; for *lactobacilli*, 3.24 and 4.66; and for total microorganisms, 4.29 and 5.43, respectively. The control using only irradiation with 94 J.cm⁻² was also effective against all bacteria. Concluding, PACT was effective in killing oral microorganisms present in dentine caries produced *in situ* and may be a useful technique for eliminating bacteria from dentine carious lesions prior to restoration.

Keywords: Dentine Caries, Photochemotherapy, Microbiological Analysis.

Reprints to: Iriana Carla Junqueira Zanin. Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, 186 Geraldo Rangel Av., Sobral, Brazil, Zip Code: 62041-380. Telephone number +55 88 36132603, e-mail: irianaz@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Dental caries is a chronic invasive disease involving demineralisation of the tooth followed by destruction of the organic phase of the dentine (1). During the dentine caries process, the outer layer of the lesion is characterised by a softened and wet dentine that is highly infected by bacteria. The inner layer, known as affected dentine, is frequently less contaminated with bacteria and is usually susceptible to remineralisation. However, the clinical distinction of these two regions is extremely difficult, and usually current methods of treating dentine lesions involve the removal of both dentine layers, which, in deep cavities, can result in pulp exposure (2).

KIDD *et al.* (1996) (3) proposed that the removal of only the softened and wet dentine is necessary for successful treatment, and that the effective sealing of a cavity with a restorative material is sufficient to render residual bacteria dormant. However, since the most restorative materials currently available are ineffective in promoting long-term sealing of the dental cavity, an effective way of disinfecting the dentine tissue is highly desirable before performing the treatment (4).

In this context, photodynamic antimicrobial therapy (PACT) may emerge as a suitable treatment because of its ability to kill bacteria *in situ*. The photodynamic process is based on a two-step protocol, where target cells are selectively loaded with a sensitiser followed by irradiation with a light of complementary wavelength (the maximum absorption of the sensitiser), resulting in the production of cytotoxic products, including singlet oxygen and free radicals (5, 6). These products are capable of damaging essential components of the cells or modifying metabolic activities in an irreversible way, which may result in cell death (7, 8, 9, 10, 11).

Several studies have shown that the use of PACT was effective against a great number of oral Gram (+) and Gram (-) bacteria (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), using a large variety of sensitisers (1, 10, 19, 20) and light sources at different wavelengths (21, 22, 23, 24). Also, other previous studies have shown that PACT is able to kill oral bacteria in planktonic cultures (22, 25, 26, 27) and plaque scrapings (1) as well as in intact biofilms (28, 29, 30, 31). However, there is rare evidence that supports the use of photodynamic antimicrobial therapy in dentine carious lesions (32). Since bacteria in dentine caries may be less susceptible to PACT due to limited penetration of the sensitiser as well as the difficulty of light propagation

throughout dentine structures, the purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effect of PACT in dentine carious lesions produced *in situ*.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Ethical Aspects

This study protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Federal University of Ceara Medical School (protocol # 143/2006). 20 healthy adults (14 females and 6 males), aged 19-36 yr, able to comply with the experimental protocol, participated in this study. They were not admitted to the study if any of the following conditions were present: active caries lesions, use of any antibiotics within the past 6 months prior to the study, or the use of antimicrobial dentifrice. 28 adult volunteers were invited to participate; 4 of them used antibiotics, and 3 refused to participate. Thus, 21 volunteers initiated the study, but one was unable to comply with the experimental protocol and was excluded.

Experimental Design

A simple-blind *in situ* design was conducted in one phase of 14 d, during which 20 volunteers wore palatal devices containing 6 human dental dentine slabs. At the end of the clinical phase, the slabs were randomly allocated into one of the following treatments as observed in figure 1: without sensitiser and light (S-L-), with sensitiser and without light (S+L-), without sensitiser and irradiated with 47 J.cm⁻² (S-L+47), without sensitiser and irradiated with 94 J. cm⁻² (S-L+94), with sensitiser and irradiated with 47 J.cm⁻² (S+L+47), and with sensitiser and irradiated with 94 J.cm⁻² (S+L+94).

Specimen Preparation

160 sound third molars were used to perform this *in situ* study. The teeth were stored in a 0.01% (v/v) thymol solution at 4°C for thirty days and refrigerated until use (33). 160 dentine slabs were obtained using a water-cooled diamond saw and a cutting machine (IsoMet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). In order to remove occlusal enamel, a polishing device (Arotec, São Paulo, SP, Brazil) was used with silicon carbide waterproof 100 grit paper under abundant irrigation. The plane surfaces obtained were

assessed by microscope examination at 40x magnification to ensure complete enamel removal. Thus, the fragments were fixed in acrylic devices and cut using a water-cooled diamond saw and a cutting machine (IsoMet™ Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain dentine slabs ($5 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$). The occlusal dentine face was used once only; the remaining surfaces of the slabs were protected with resistant acid varnish (Colorama-CEIL, São Paulo, SP, Brazil). Afterwards, the specimens were polished using three different silicon carbide waterproof papers (300, 600 and 1200 grit) as well as polishing cloths with 1- μm diamond paste (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Microhardness measurements were performed in a hardness tester (Shimadzu HMV-2000 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) using a Vickers diamond under a 50 g load for 10 s to select dentine slabs with similar hardness (50 to 70 Vickers Hardness Number). Since 40 dentine slabs were excluded due to higher hardness numbers, 120 dentine slabs were selected. Finally, the slabs were autoclaved (121°C 15 min) (34) and stored in 100% humidity until being inserted into the palatal appliances (Figure 2A).

Palatal appliance preparation

For each subject, an acrylic palatal device was fabricated, in which 6 cavities ($6 \times 6 \times 3 \text{ mm}^3$) were prepared on the left and right sides; one slab was attached with wax in each cavity (35). In order to allow biofilm accumulation, and to protect it from mechanical disturbance, a plastic mesh was positioned on the acrylic resin, leaving a 1-mm space from the slab surface (35, 36, 37).

Intraoral phase

During the lead-in period (7 d) and throughout the clinical phases, the volunteers brushed their teeth with a fluoridated dentifrice ((Sorriso Super Refrescante – calcium carbonate-based dentifrice, $1,450 \mu\text{g F.g}^{-1}$, as MFP, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brazil). Also, the volunteers received oral and written instructions to wear the appliances at all times, including nights. They were allowed to remove the appliances only during meals, acid drink and when performing oral hygiene. When removed, the devices were kept moist in plastic boxes to keep the bacteria biofilm viable (38). The cariogenic challenge was provided by dripping a 40% sucrose solution (39) onto all dentine slabs 10 times a day at a pre-determined schedule (8.00, 9.30, 11.00, 12.30, 14.00, 15.30, 17.00, 18.30, 20.00 and 21.30)

(40, 41). Before replacing the palatal appliance in the mouth, a 5-min waiting time was standardised for sucrose diffusion into the dental biofilm (Figure 2B).

The dentifrice treatment was performed 3 times a day, after mealtimes when volunteers' habitually performed their oral hygiene. The appliances were extra-orally brushed, except the slab area, and volunteers were asked to brush carefully over the covering meshes, to avoid disturbing the biofilm. All volunteers consumed fluoridated water (0.70 mg F.l⁻¹), and no restriction was made with regard to the volunteers' dietary habits.

Microbiological analyses

The microbiological analyses of carious dentine were performed on the 14th d of the intraoral phase, immediately before and after performing the treatments. Around 12 h after the last sucrose solution application, the volunteers stopped wearing the intraoral device. After removing the plastic mesh, the biofilm formed on dentine slabs was removed with a scalpel, lamina #15C, and the dentine carious tissue was exposed. The baseline dentine sample was collected from half of each slab using a #5 carbide bur in a low-speed drill (Labordental, São Paulo, SP, Brazil), as described by KIDD *et al.* (1995) (42) (Figure 2C). The dentine samples were analytically weighed using pre-weighed microcentrifuge tubes containing the bur, to which 0.9% NaCl solution was added (1 ml.mg⁻¹ dentine). In order to detach the bacterial cells, the tubes were agitated for 1 min in a Disrupter Genie Cell Disruptor (Precision Solutions, Rice Lake, WI, USA) after receiving three sterile glass beads (0.1-mm diameter). Afterwards, the suspension was serially diluted (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 and 1:1000000) in 0.9% NaCl solution. In order to assess microorganism viability, samples were plated in triplicate in mitis salivarius agar (MSA agar) containing 15% sucrose to determine total streptococci (TS); mitis salivarius agar plus 0.2 bacitracin ml⁻¹ (MSB agar) to determine *mutans streptococci* (MS) (43); Rogosa agar supplemented with 0.13 % glacial acetic acid to assess the number of *lactobacilli* (LB) (44); and blood agar to determine total microorganisms (TM) (Figure 2D). The plates were incubated for 48 h at 37°C in a partial atmosphere of 10% CO₂. Representative colonies of MS, TS, LB and TM were counted using a colony counter, and the results were expressed in CFU.mg⁻¹ of dentine.

Photosensitiser and light sources

Toluidine blue O (TBO) was obtained from Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich Foundation, Poole, UK), dissolved in deionised water ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and stored in the dark. The light source used was a red light-emitting diode (LED; Laserbeam, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), with a spectrum of emission ranging from 620 to 660 nm and a 638.8 nm predominant wavelength. The light was distributed by a fibre optic cable with a 9.5 mm spot. Irradiation was performed with a focused beam maintained at a 2.0 mm distance from the dentine slab. A power meter Lasermate (Coherent Inc, Santa Clara, CA, USA) was used to measure the power of the LED device; an output of 40 mW was used.

Photodynamic therapy

Following the first dentine sample collection (baseline value for tissue contamination verification), PACT was performed using a random distribution of slabs into treatments. The groups that received sensitiser (S+L-; S+L+47; S+L+94) were maintained in contact with 5 μL of TBO solution during a pre-irradiation time of 5 min in the dark. Other groups (S-L-; S-L+47; S-L+94) received an equal volume of sterile 0.9% NaCl solution during the same period of time. Irradiated groups (S-L+47; S-L+94; S+L+47; S+L+94) received LED light for 5 ($47 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) or 10 min ($94 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), while groups that did not receive light (S-L-; S+L-) were submitted to a 10 min waiting period in order to simulate the irradiation conditions (Figure 2C). The distribution of treatments on the palatal device was determined randomly; one option can be observed in figure 1. After each treatment, a second dentine sample was collected from another intact half of each slab and was microbiologically processed as previously described.

Statistical analysis

In order to assess the effect of the treatments, the variable log reduction promoted by each treatment was analysed. The normality distribution of the data and equality of variances were checked by using the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. The log reduction results were calculated by subtraction of the initial values from the final values of $\text{CFU}\cdot\text{mg}^{-1}$ of dentin after being transformed by Log_{10} . These data were analysed by a one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. The significance level was set at 5%. The

software BioStat 2007 Professional (AnalystSoft Robust business solutions company, Vancouver, Canada) was used.

RESULTS

The log reductions found after PACT on tested microorganism growth *in situ* can be seen in figures 3-6. Results show that neither incubation with TBO alone nor irradiation with 47 J.cm^{-2} , in absence of sensitiser, had a significant effect on the viability of these microorganisms, when compared to the control group (S-L-). On the other hand, irradiation with an LED device for 10 min, which resulted in an energy density of 94 J.cm^{-2} , had a significant effect on bacterial reduction in dentine caries even in the absence of sensitiser. Also, the association of TBO and LED resulted in a significant decrease in the viability of total streptococci ($p < 0.0004$), *mutans streptococci* ($p < 0.0223$), *lactobacilli* ($p < 0.0092$) and total microorganisms ($p < 0.0004$).

DISCUSSION

Dental caries may be a disease well suited to photodynamic antimicrobial therapy. Caries is often a localised infection, so the sensitiser may be applied to the lesion by means of a syringe; light can then be delivered via an optical fibre. If bacteria within carious lesions could be eradicated by photosensitisation *in vivo*, there would be beneficial consequences for dental health. Dentine tissue could be better preserved, thereby making patient treatment easier for the dentist and more comfortable for patients, by enabling lesions to be restored with minimal tissue removal, and improving the long-term prognosis for the repaired tooth (19).

A great number of the studies evaluating the antimicrobial effect of photodynamic therapy involve the use of conventional lasers with different wavelengths. The option of using an LED source instead of a laser device in this study has obvious economic advantages when compared to photosensitisation using conventional lasers. 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 sensitiser, which may promote optimisation of photodynamic processes (24). Furthermore, ZANIN *et al.* (2005) (23) demonstrated that the use of a HeNe laser or an LED light in association with TBO had the same antimicrobial effect on *S. mutans* biofilm viability.

Sensitisers as well are essential elements in PACT; several studies have demonstrated the efficacy of a range of sensitisers in the elimination of oral bacteria (1, 19, 45). TBO is an attractive option due to its accessible cost and intense absorption in the red spectrum (>600 nm) (46). Also, TBO association with different light sources at a specific wavelength seems to be effective in producing microbiological reductions in planktonic cultures (27), scrapping plaque (1) and intact biofilms (24).

Observation of parameters used to kill bacteria in culture suspensions demonstrates that PACT is more effective at eliminating cells in planktonic cultures than in biofilms. When considering the use of photodynamic therapy on intact biofilms, it is also important to remember that bacteria in such a state are far less susceptible to antimicrobial agents because of the polymeric matrix, lower growth rate, metabolic activity and specific gene expression (47). In carious tissue, the treatment is difficult because bacteria are protected by a dentinal structure, which may limit the penetration of both the sensitiser and light (4). Moreover, the interaction of light with dentine is complex due to refraction and reflection at the surface of the peritubular and intertubular dentine. Also, it has been previously demonstrated that bacterial death is lower when the microorganisms are irradiated with light passing through demineralised dentine slices and that there is no direct relationship between the extent of dentine demineralisation and the degree of bacterial death after PACT (14). Consequently, BURNS *et al.* (1995) (14) have suggested that there is a finite distance between the dentine and light source beyond which the irradiation will be not effective, even in highly demineralised dentine.

Although some *in vitro* studies simulated the effect of PACT on caries lesions using demineralised slices of dentine, (14) bacteria embedded in a collagen matrix (4, 14), bovine dentine (32), and *ex vivo* carious dentine (4), this is one of the first studies verifying the antimicrobial effect of photodynamic therapy on human dentine caries produced in conditions very close to those found *in vivo*. *In situ* models of caries involve the use of devices that create conditions that simulate the process of dental caries, 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 caries and also to provide information in a short period of time without causing damage to the natural teeth of volunteers (48). In this way, this model may be considered a proper tool for testing the effect of PACT on microorganisms involved in the dentine caries process.

The *in situ* caries model, based on multispecies biofilm accumulation and sucrose exposure, was previously reported to be a cariogenic model of human dental enamel and

dentine (38, 39, 49). Although the majority of *in situ* experiments have used a 20% sucrose solution 8 times/d (41, 50, 51), in this study the authors used a 40% sucrose solution 10 times/day since the demineralisation process seems to be more evident with carbohydrate consumption frequency equal to or higher than 6 times/d (41). A 40% sucrose solution was used in the present research, according to AIRES *et al.* (2006) (39), who demonstrated that this sucrose concentration is effective in producing extracellular polysaccharide on enamel slabs. However, when producing caries lesions on dentine slabs, AIRES *et al.* (2008) (49) used a sucrose concentration of 10%, which was different from that used in this study. This can be justified due to the necessity of obtaining a softened and drilled dentine in order to perform appropriate dentine harvest and microbiological analyses. In addition, fluoride from the toothpaste used by volunteers during all intraoral periods could decrease the progression of dentine caries. The use of fluoride-containing dentifrice was included in this experimental model, since over 95% of all dentifrices sold in the U.S., Brazil and Western Europe contain fluoride (52, 53, 54).

The results of this study show that photodynamic therapy was effective in significantly reducing all examined microorganisms at both energy densities tested. To our knowledge, there is no other *in situ* study testing PACT in dentine caries lesions. Thus, our results confirmed those found in a previous *in vitro* study performed by our research group, which used the same light source and sensitiser, concluding that photodynamic antimicrobial therapy was effective against *mutans streptococci* using energy densities of 47 and 94 J.cm⁻² (data not published). Our work also agrees with that carried out by GIUSTI *et al.* (2008) (32), which demonstrated that the use of LED in association with TBO was effective in bacterial reduction of *S. mutans* and *L. acidophilus* in carious bovine dentine; a 400 mW LED device was used in an *in vitro* protocol. Furthermore, the authors used an unusual method for calculating the antimicrobial effect.

Several previous *in vitro* reports have demonstrated that using light and a sensitizer separately no effect on viability of oral organisms was found (24, 26, 55). However, in the current work, the LED irradiation (94 J.cm⁻²) in the absence of sensitiser resulted in significant reduction in viability of all tested microorganisms. These results differ from those shown by ZANIN *et al.* (2005) (23), where the same association of light and sensitiser was used and no differences in *S. mutans* biofilm viability were found, even when higher energy densities (147 and 294 J.cm⁻²) and irradiation times (15 min) were tested. These different results may be explained by the different substrates used, inasmuch as bacteria organised as biofilms in ZANIN *et al.* (2005) (23) were protected from dryness by the presence of

polysaccharide matrix and water. However, in carious dentine, the exposure to LED irradiation longer than 5 min may have caused drying of the substrate due to faster water evaporation, thus resulting in decreased bacterial viability. Consequently, some cytotoxicity from the light source might have occurred, since no effects on bacterial viability were obtained in the control group, which was subjected to an air-exposure time of 10 min. Nevertheless, to avoid dentine dryness and for clinical convenience, it is essential and desirable that shorter exposure times to light be achieved, while still ensuring effective killing of bacteria in the oral cavity. An alternative scenario for future research is the use of more powerful light sources because the LED currently used has a maximum output power of 40 mW. In this way, with the increase of power, the energy dose applied to bacteria could be achieved with lower exposure times, representing an advantage for clinical use.

In conclusion, our results demonstrate that the association of TBO and a red LED, with energy densities of 47 and 94 J.cm⁻², was effective in reducing the viability of a large range of bacterial growth in conditions very similar to those found in the oral cavity *in vivo*. Although the results of this study are encouraging, the delineation of adequate parameters, especially related to irradiation time, is essential for clinical use of photodynamic antimicrobial therapy in disinfecting carious dentine.

Acknowledgments

This project has received financial support (Grant # 620160/2006-3) from CNPq. We thank the volunteers for their valuable participation. The authors thank João Paulo Saraiva Wenceslau, Diego Martins de Paula and Ruliglesio Rocha for their help during experimental procedures. The first author received a scholarship during this study from CAPES. This paper was based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of the Federal University of Ceará, in partial fulfilment of the requirements for an MS degree in Dentistry.

REFERENCES

1. WILSON M, BURNS T, PRATTEN J, PEARSON GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995; **78**: 569-574.
2. BURNS T, WILSON M, PEARSON GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Den Res* 1994; **22**: 273-278.
3. KIDD EAM, RICKETTS DNT, BEIGHTON D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: A clinical and microbiological study. *B. Dent J* 1996; **180**: 287-291.
4. WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ, WILSON M. The photo-activated antibacterial action of toluidina blue O in a collagen matrix and carious dentine. *Caries Res* 2004; **38**: 530-536.
5. KÜBLER AC. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl* 2005; **20**: 37-45.
6. WILSON BC, PATTERSON SM. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phy Med Biol* 2008; **53**: 61-109.
7. MACROBERT AJ, BOWN SG, PHILLIPS D. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use. Chichester: Wiley 1989: 4-16.
8. MALIK Z, HANANIA J, NITZAN Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990; **5**: 281-293.
9. PLAETZER K, KIESSLICH T, VERWANGER T, KRAMMER B. The modes of cell death induced by PDT: An Overview. *Med Laser Appl* 2003; **18**: 7-19.
10. HAMBLIN MR, HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; **3**: 436-450.
11. PLAETZER K, KRAMMER B, BERLANDA J, BERR F, KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2008: in press.
12. DOBSON J, WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Archs Oral Biol* 1992; **37**: 883-887.

13. GAD, F, ZAHRA, T, HASAN, T, HAMBLIN, MR. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; **48**: 2173-2178.
14. BURNS T, WILSON M, PEARSON GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1995; **29**: 192-197.
15. WILSON M, YIANNI C. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. *J Med Microbiol* 1995; **42**: 62-6.
16. GRIFFITHS MA, WREN BW, WILSON M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J. Antimicrob Chemother* 1997; **40**: 873-876.
17. ROVALDI CR, PIEVSKY NA, SOLE PM, FRIEDEN DM, ROTHSTEIN, SPACCIAPOLI P. Photoactive porphirin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3364-3367.
18. CHABRIER-ROSELLO Y, FOSTER TH, PEREZ-NAZARIO N, MITRA S, HAIDARIS CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4288-4295.
19. WILSON M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photoch Photobiol Sci* 2004; **3**: 412-8.
20. PAULINO TP, RIBEIRO KF, THEDEI JR G, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005; **50**: 353-359.
21. 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* 1997; **65**: 1026-1031.
22. MATEVKI D, WEERSINK R, TENENBAUM HC, WILSON B, ELLEN RP, LÉPINE G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003; **38**: 428-435.
23. ZANIN ICJ, GONCALVES RB, BRUGNERA-JR A, HOPE CK, PRATTEN J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 324-330.

24. ZANIN IC, LOBO MM, RODRIGUES LK, PIMENTA LA, HOFLING J F, GONCALVES RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 64-69.
25. SOUKOS NS, XIMENEZ-FYVIE LA, HAMBLIN MR, SOCRANSKY SS, HASAN T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2595-2601.
26. WILLIAMS JA, PEARSON GJ, 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* 2003; **37**: 190-193.
27. WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ. Antibacterial action of photoactivated didinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent Res* 2006; **34**: 363-71.
28. 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.
29. 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; **31**: 86-90.
30. WOOD S, METCALF D, DEVINE D, ROBINSON C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006a; **57**: 680-684.
31. WOOD S, METCALF D, DEVINE D, ROBINSON C. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother* 2006b; **58**: 190-192.
32. GIUSTI JSM, SANTOS-PINTO L, PIZZOLITO AC, HELMERSON 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**: 279-285.
33. GILMOUR ASM, EDMUNDS DH, NEWCOMBE RG. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. *J Dent Res* 1997; **16**: 1854-1861.

34. 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**: 157-60.
35. 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.
36. BENELLI EM, SERRA MC, RODRIGUES JR AL, CURY JA. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res* 1993; **27**: 280-284.
37. 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.
38. CURY J A; REBELO MAB, DEL BEL CURY AA, DERBYSHIRE MTVC, TABCHOURY CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000; **34**: 491-497.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. KIDD EA, JOYSTON-BECHAL S, BEIGHTON D. Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: a clinical and microbiological study. *J Dent Res* 1995; **74**: 1206-1211.
43. GOLD OG, JORDAN HV, VAN HOUTE J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; **18**: 1357-64.
44. ROGOSA M, MITCHELL JA, WISEMAN RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral *lactobacilli*. *J Dent Res* 1951; **30**: 682-689.
45. 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.
46. JORI G, COPPELLOTTI O. Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2007; **6**: 119-131.
47. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci* 1999; **284**: 1318-1322.
48. ZERO DT. In situ caries model. *Adv Dent Res* 1995; **9**: 214-230.
49. AIRES CP, DEL BEL CURY AA, TENUTA LM, KLEIN ML, KOO H, DUARTE S, CURY JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res* 2008; **42**: 380-386.
50. RODRIGUES LK, NOBRE- DOS-SANTOS M, FEATHERSTONE JD. In situ mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. *J Dent Res* 2006; **85**: 617-621.
51. SOUSA RP, ZANIN IC, LIMA JP, MELO MA, BELTRÃO HC, RODRIGUES LK. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *Caries Res* 2008: in press.
52. CURY JA, TENUTA LM, RIBEIRO CC, PAES LEME AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J* 2004; **15**: 167-174.
53. ZERO DT. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health* 2006; **6**: 1-13.
54. MULLEN J. History of water fluoridation. *Br Dent J* 2005; **8**: 1-4.
55. SOUKOS NS, SOCRANSKY SS, MULHOLLAND SE, LEE S, DOUKAS, AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharmaceutical Res* 2003; **17**: 405-409.

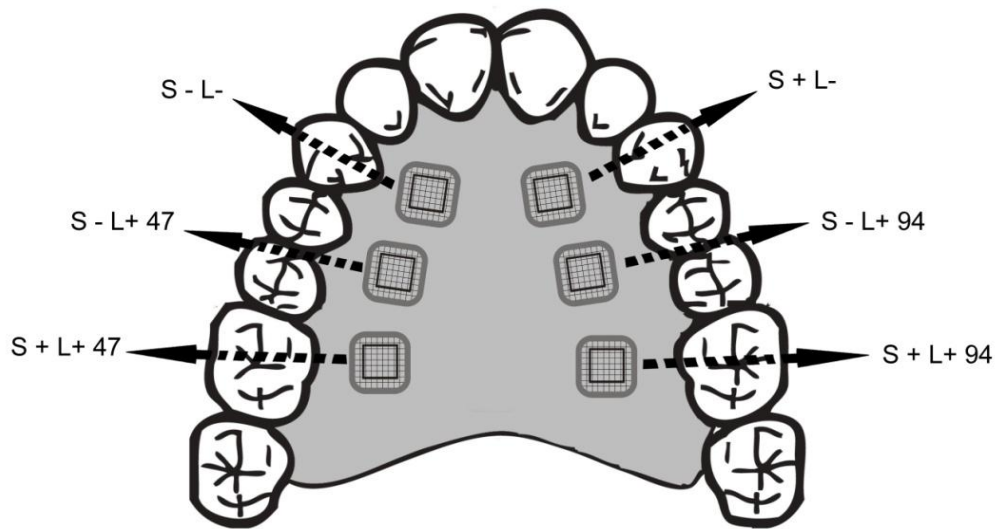


Figure 1: Representation of the distribution of treatments on the palatal device. Slabs were randomly allocated into one of the following groups: (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94).

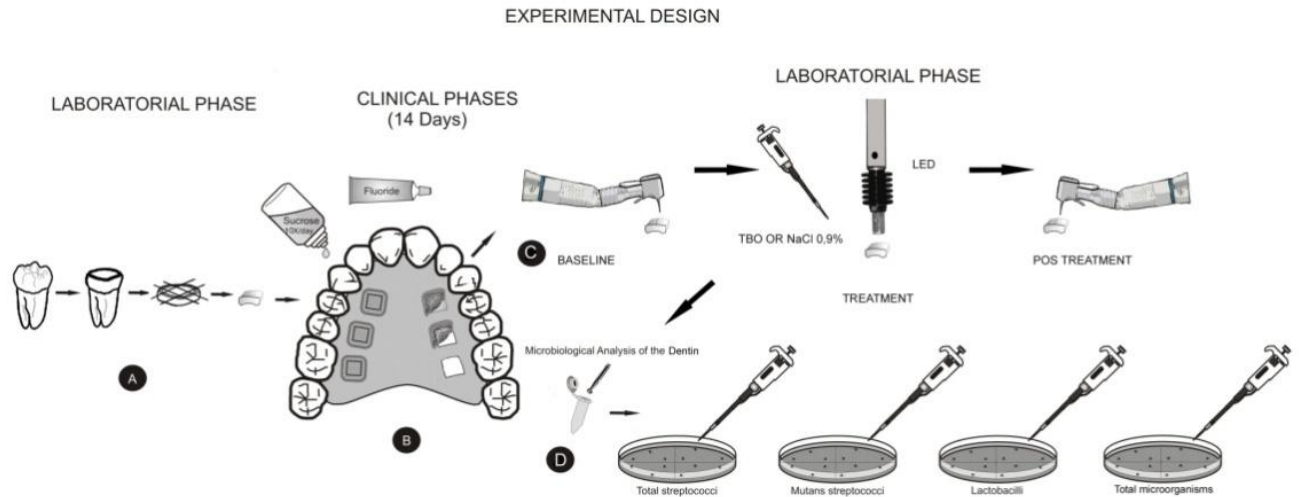


Figure 2. (A) Dentine slabs prepared from human sound third molars stored in 0.01% thymol. (B) Clinical phase to provide a cariogenic challenge. (C) Harvest of the first dentine sample for baseline values and of the second dentine sample from the other intact half of each slab after the treatments: (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94). (D) Dentine caries samples plated in triplicate in mitis salivarius agar; mitis salivarius agar plus 0.2 bacitracin $m.l^{-1}$; Rogosa agar and blood agar.

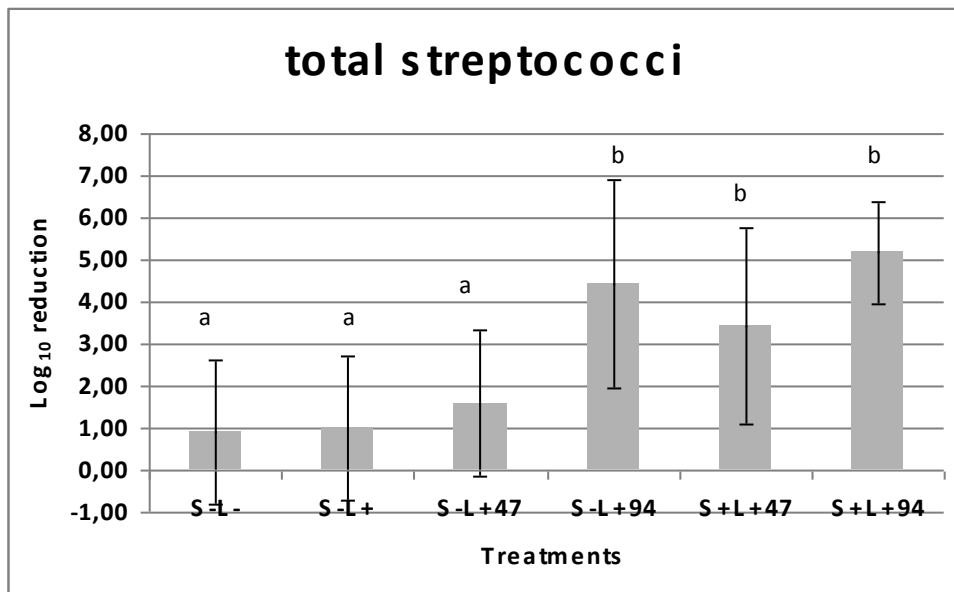


Figure 3 Effects of the treatments (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94) on the viabilities of total streptococci in dentine caries lesions. Data represent the Log reduction and error bars represent standard deviations.

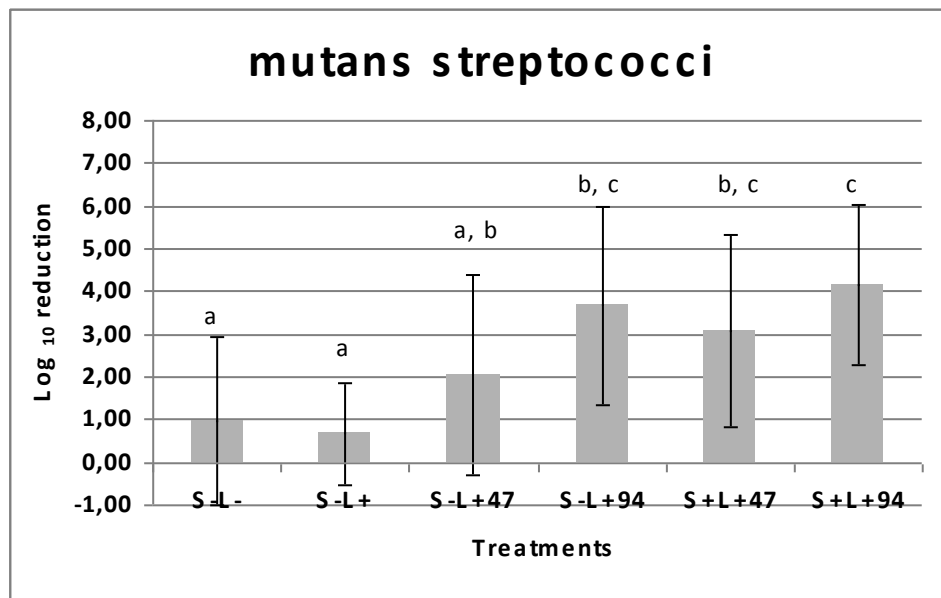


Figure 4 Effects of the treatments (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94) on the viabilities of *mutans streptococci* in dentine caries lesions. Data represent the Log reduction and error bars represent standard deviations.

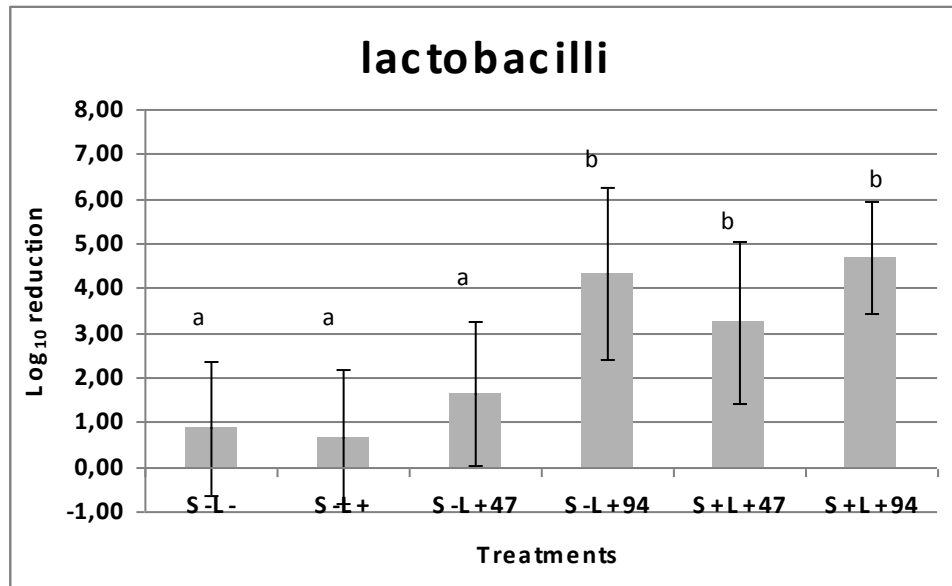


Figure 5 Effects of the treatments (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94) on the viabilities of lactobacilli in dentine caries lesions. Data represent the Log reduction and error bars represent standard deviations.

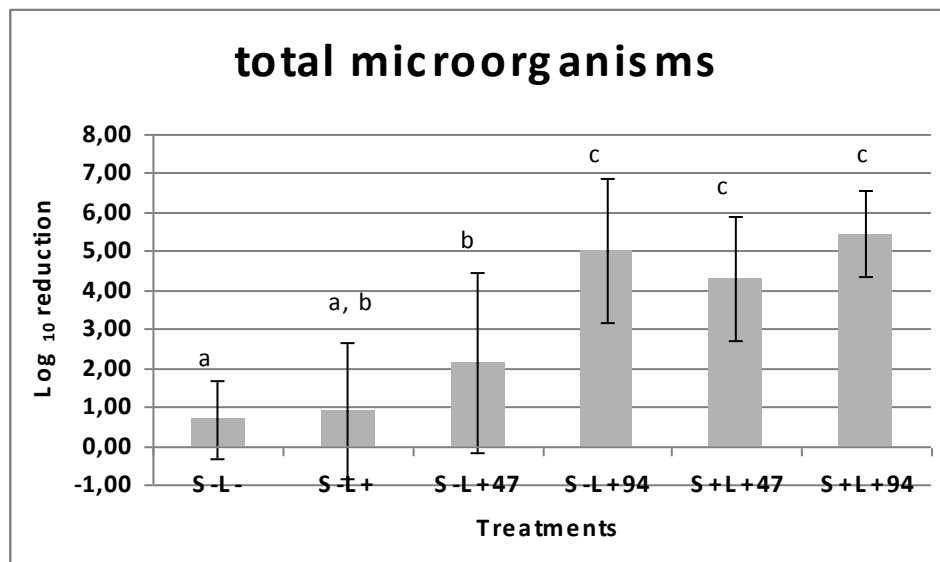


Figure 6 Effects of the treatments (S-L-), (S+L-), (S-L+47), (S-L+94), (S+L+47), (S+L+94) on the viabilities of total microorganisms in dentine caries lesions. Data represent the Log reduction and error bars represent standard deviations.

4 CONCLUSÃO GERAL

Nas condições desse estudo *in situ*, a terapia antimicrobiana fotodinâmica foi efetiva na redução microbiana em lesões de cárie dentinária.

- A terapia antimicrobiana fotodinâmica, utilizando uma fonte de luz LED (620-660 nm) na presença de azul de orto-toluidina, mostrou-se efetiva na redução de microorganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos presentes em lesões de cárie dentinária produzidas *in situ*.
- Utilizando os parâmetros testados, a terapia não foi dose dependente e a irradiação prolongada da dentina teve efeito significativo na redução de todos os microrganismos testados. Assim, novos estudos devem ser realizados, a fim de estabelecer parâmetros adequados à utilização clínica da terapia antimicrobiana fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

AIRES, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; KLEIN, M. L.; KOO, H.; DUARTE, S.; CURY, J. A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res.**, v. 42, n. 5, p. 380-386, 2008.

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 40, n. 1, p. 28-32, 2006.

BACKHAUS, R.; TRASSIEIRA, M.; VILLA, M.; VERA DONOSCO, C. D.; CRUZ, J. F. Terapia fotodinâmica em El cáncer de próstata localizado. **Actas. Urol. Esp.**, v. 31, n. 6, p. 633-641, jun. 2007.

BENELLI, E.M.; SERRA, M.C.; RODRIGUES JR, A.L.; CURY, J.A. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.**, v. 27, n. 4, p. 280-284, 1993.

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, n. 6, p. 1026-1031, June 1997.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Lasers and non-lasers light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med. Sci.**, v. 17, n.3, p. 173-186, 2002.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 29, n. 3, p. 192-197, 1995.

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

CASTANO, A. P.; DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; TABCHOURY, C. P.; TENUTA, L. M.; DEL BEL CURY, A. A.; VALE, G. C.; CURY, J. A. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, v. 41, n.1, p.9-15, 2007.

CHABRIER-ROSELLO, Y.; FOSTER, T. H.; PEREZ-NAZARIO, N.; MITRA, S.; HAIDARIS, C. G. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 10, p. 4288-4295, Oct. 2005.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.

CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v. 34, n. 6, p. 491-497, Nov./Dec. 2000.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A.; DEL BEL CURY, A. A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, v. 31, n. 5, p. 356-360, 1997.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M.; RIBEIRO, C. C.; PAES LEME, A.F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Braz. Dent. J.**, v.15, p. 167-174, 2004.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. **Arch. Oral. Biol.**, v.37, n.11, p. 883-887, Nov. 1992.

DUGGAL, M. S.; TOUMBA, K. J.; AMAECHI, B. T.; KOWASH, M. B.; HIGHAM, S. M. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 8, p.1721-1724, Aug. 2001.

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, n. 1, p. 89-104, June 1998.

FUCHS, J.; THIELE, J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 5, p. 835-847, Mar. 1998.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIN, M. R. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 6, p.2173-2178, June 2004.

GILMOUR, A. S. M.; EDMUNDS, D. H.; NEWCOMBE, R.G. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. **J. Dent. Res.**, v. 76, n. 12, p. 1854-1861, Dec. 1997.

GIUSTI, J. S. M.; 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, n. 4, p.279-285, Aug. 2008.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral. Biol.**, v.18, n. 11, p.1357-1364, Nov. 1973.

GRIFFITHS, M. A.; WREN, B. W.; WILSON, M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, n. 6, p. 873-876, Dec. 1997.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, n. 5, p. 436-450, May 2004.

HARA, A. T.; QUEIROZ, C. S.; PAES LEME, A. F.; SERRA, M. C.; CURY, J. A. Caries Progression and inhibition in Human and Bovine Root Dentine in situ. **Caries Res.**, v. 37, n. 5, p.339-344, Sept./Oct. 2003.

JORI, G.; COPPELLOTTI, O. Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 119-131, Apr. 2007.

KIDD, E. A. M.; RICKETTS, D. N. T.; BEIGHTON, D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: A clinical and microbiological study. **Br. Dent. J.**, v. 180, n. 8, p. 287-291, Apr. 1996.

KIDD, E. A.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: a clinical and microbiological study. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 5, p. 1206-1211, May 1995.

KONOPKA, K.; GOLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J. Dent. Res.**, v. 86, n.8, p. 694-707, Aug. 2007.

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

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.

MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 5, n. 3/4, p. 281-293, May 1990.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral microbiology.** 3rd ed. London: Chapman & Hall, 1992.

MATEVKI, D.; WEERSINK, R.; TENENBAUM, H. C.; WILSON, B.; ELLEN R. P.; LÉPINE, G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. **J. Periodontal Res.**, v. 38, n. 4, p. 428-435, Aug. 2003.

METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 1, p. 190-192, July 2006.

MITRA, S. **Photodynamic therapy: biophysical mechanisms and molecular responses.** 2004. PhD Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, NY, 2004. Disponível em: <http://www.urmc.rochester.edu/smd/Rad/foster/people/Soumya_PhDthesis.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2009.

MULLEN J. History of water fluoridation. **Br. Dent. J.**, v.8, p.1-4, 2005.

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. 31, n. 2, p. 86-90, 2002.

PAULINO, T. P.; RIBEIRO, K. F.; THEDEI JR, G.; TEDESCO, A. C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 3, p. 353-359, Mar. 2005.

PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; 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. 33, n. 2, p. 231-237, June 2008.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The modes of cell death induced by PDT: An Overview. **Med. Laser Appl.**, v. 18, n. 1, p. 7-19, Apr. 2003.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.**, Feb. 2008.

PRATES, R. A.; YAMADA JR, A. M.; SUZUKI, L. C.; HASHIMOTO, M. C. E.; CAI, S.; GOUW-SOARES, S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S. Bactericidal effect of malachite Green and red laser on *actinobacillusactinomycetemcomitans*. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 86, n. 1, p. 1-7, Jan. 2006.

RAAB, V, O. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infosurien. **Archiv. f. klin. Med.**, v. 39, p.524-546, 1900.

RODRIGUES, L. K.; NOBRE- DOS-SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J. D. In situ mineral loss inhibition by CO₂ laser and fluoride. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 7, p. 617-621, July 2006.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral *lactobacilli*. **J. Dent. Res.**, v. 30, n. 5, p. 682-689, Oct. 1951.

ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, N. A.; SOLE, P. M.; FRIEDEN, D. M.; ROTHSTEIN., SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphirin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, n. 12, p. 3364-3367, Dec. 2000.

RYTER, S.T.; TYRRELL, M. Singlet molecular oxygen (¹O₂); A possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1520-1534, June 1998.

SOUKOS, N. S.; SOCRANSKY, S. S.; MULHOLLAND, S. E.; LEE, S.; DOUKAS, A. G. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. **Pharm. Res.**, v. 17, n. 4, p. 405-409, Apr. 2003.

SOUKOS, N. S.; XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAMBLIN, M. R, SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 10, p. 2595-2601, Oct. 1998.

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; VASCONCELOS, S. M.; MELO, M. A.; BELTRÃO, H. C.; RODRIGUES, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **J. Dent.**, v. 37, n. 1, p. 44-51, Jan. 2009.

WAINWRIGHT, M. Photoantimicrobials - a PACT against resistance and infection. **Drugs Fut.**, v. 29, n. 1, p. 85, 2004.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, July 1998.

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, n. 3, p. 190-193, May/June 2003.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES M. J.; WILSON, M. The photo-activated antibacterial action of toluidina blue O in a collagen matrix and carious dentine. **Caries Res.**, v. 38, n. 6, p. 530-536, Nov./Dec. 2004.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J. Antibacterial action of photoactivated didinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **J. Dent.**, v. 34, n. 6, p. 363-371, July 2006.

WILSON, B. C.; PATTERSON, S. M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, v. 53, n. 8, p. R61-109, May 2008.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, n. 5, p. 412-418, May 2004.

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, Oct. 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, May 1995.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 77-81, Aug. 1992.

WILSON, M.; YIANNI, C. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. **J. Med. Microbiol.**, v. 42, n.1, p. 62-6, Jan. 1995.

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, n. 4, p. 680-684, Apr. 2006.

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.**, v. 50, n. 1, p. 1-7, May 1999.

YAMAMOTO, K.; ARAI, K.; FUKAZAWA, K.; FUKUI, K.; NAGAMATSU, K., KATO, K.; NAKAGAKI, H.; ROBINSON, C. Effect of plaque fluoride released from a glass-ionomer cement on enamel remineralization in situ. **Caries Res.**, v. 39, n. 2, p.157-160, Mar./Apr. 2005.

YAVARI, N. **Optical spectroscopy for tissue diagnostics and treatment control.** 2006. (Doctoral Thesis) – Department of Physics and Technology, the University of Bergen, Bergen, 2006.

ZANIN, I. C. J.; GONCALVES, R. B.; BRUGNERA-JR, A.; 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, Aug. 2005.

ZANIN, I. C.; LOBO, M. M.; RODRIGUES, L.K., PIMENTA, L. A.; HOFLING J. F.; GONCALVES, 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, Feb. 2006.

ZERO, D. T. In situ caries model. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, n. 3, p. 214-234, Nov. 1995.

ZERO, D. T. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. **BMC Oral Health.**, v.6, p.1-13, 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 Juliana Paiva Marques Lima (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: “Estudo *in situ* do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica das lesões de cárie dentinária”.

Objetivos: Este estudo vai avaliar a se a terapia fotodinâmica (associação de um Laser de baixa potência e de um corante) é capaz de matar bactérias presentes na cárie dental.

Justificativa: A maioria dos estudos que avaliou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, utilizou como fonte de luz, lasers convencionais. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como fonte de luz alternativa a serem utilizados nessa terapia. Tanto os Lasers convencionais, quanto os LEDs associados a corantes, matam microrganismos presentes na cavidade bucal. Isso é conhecido como terapia fotodinâmica. 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 cárie dental.

Procedimento experimental: Para a realização desse estudo, serão selecionados terceiros molares não erupcionados (“o dente do ciso”) que não contenham fraturas e rachaduras. Os dentes serão cortados em blocos de dentina, medindo 5x5x2 mm com uma cortadeira elétrica, serão lixados e polidos. Após o polimento final, os blocos serão lavados em água corrente 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: Os pesquisadores preferiram, nessa pesquisa, utilizar dentes humanos ao invés de dentes bovinos, para simular uma condição o 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: 3366-82-32 (Mestrado odontologia) ou 9925-25-84 (Juliana Paiva)

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. Em caso de dúvida, quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em pesquisa da UFC.

Eu, _____, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna Juliana Paiva Marques Lima 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.

Fortaleza, ____ de _____ de 2007.

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

APÊNDICE B

INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA – PARA OS VOLUNTÁRIOS QUE UTILIZARÃO OS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS PALATINOS

Nome do Voluntário: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Juliana Paiva Marques Lima (aluna de mestrado do curso de Odontologia) e Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin, onde você autoriza, por escrito, sua participação como voluntário, dessa pesquisa, após conhecer os procedimentos que serão realizados e tendo liberdade para decidir sem qualquer coação.

Título do trabalho: “Estudo *in situ* do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre lesões de cárie dentinária”.

Objetivos: Este estudo vai avaliar a se a terapia fotodinâmica (associação de um Laser de baixa potência e de um corante) é capaz de matar bactérias presentes na cárie dental.

Justificativa: A maioria dos estudos que avaliou o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, utilizou como fonte de luz, lasers convencionais. Recentemente, os diodos emissores de luz (LED) surgiram como fonte de luz alternativa a serem utilizados nessa terapia. Tanto os Lasers convencionais, quanto os LEDs associados a corantes, matam microrganismos presentes na cavidade bucal. Isso é conhecido como terapia fotodinâmica. 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, nós queremos observar se é possível matar as bactérias presentes na cárie dental.

Procedimento experimental: O período total do estudo compreenderá uma etapa de quatorze dias durante a qual 20 (vinte) voluntários utilizarão dispositivos intra-oriais palatinos, contendo seis blocos dentais. Durante esse período, os voluntários deverão ingerir água fluoretada do município de Fortaleza e pingar solução de sacarose a 40% sobre os blocos dentais dez vezes ao dia.

Desconforto ou riscos esperados vinculados à pesquisa: Os voluntários poderão apresentar um pouco de mau hálito durante o período experimental, o que poderá ser controlado com a adequada higiene bucal e a limpeza do dispositivo. O uso da sacarose será apenas como gotas sobre os blocos de dentina presentes nos dispositivos intra-oriais, não implicando em qualquer aumento de cárie dental nos voluntários. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto que é, inclusive, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel.

Forma de acompanhamento e assistência: Haverá aconselhamento quanto à melhoria da higiene bucal durante o período experimental. Os pesquisadores, envolvidos na pesquisa, estarão à disposição dos voluntários para qualquer ajuste no dispositivo intra-oral, a fim de minimizar possíveis desconfortos.

Métodos alternativos existentes: Embora existam outros métodos de coleta de placa bacteriana, os autores optaram pela utilização do dispositivo intra-oral, a fim de que possam promover o acúmulo de uma grande quantidade de placa bacteriana e realização da terapia fotodinâmica sem desorganizar o biofilme existente.

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 a pesquisa. O voluntário terá, também, liberdade para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento. Qualquer dúvida, favor comunicar o mais rápido possível. Tel: 3366 8232 (Mestrado Odontologia) ou 9925 2584(Juliana Paiva).

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: Como a remoção dos blocos dentais deve ser feita em jejum, no dia do recolhimento dos dispositivos intra-orais, será oferecido um café da manhã aos voluntários. Além disso, os voluntários serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte nos dias que tiverem de comparecer ao laboratório.

Formas de indenização: Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, o voluntário deve escrever para o Comitê de Ética em pesquisa da UFC.

Eu, _____, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna Juliana Paiva Marques Lima e Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, autorizo a execução do trabalho de pesquisa exposto em mim.

Fortaleza, ____ de _____ de 2007.

Nome (por extenso): _____

Assinatura: _____

APÊNDICE C

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Cada voluntário receberá:

- 2 tubos de dentifrício Sorriso- Colgate;
- 1 escova dental;
- 7 frascos conta-gotas com solução de sacarose a 40%;
- Isopor 500mg a fim de manter em congelador os frascos com solução de sacarose;
- Estojo de aparelho ortodôntico (acomodação do dispositivo);
- 1 pacote de gaze estéril.

Os voluntários deverão seguir as seguintes instruções:

1. Este estudo consiste de uma etapa de 14 dias.
2. A água ingerida durante este período deverá ser necessariamente de abastecimento público de Fortaleza.
3. Durante o período do experimento, não utilizar nenhum outro produto contendo flúor, exceto água.
4. Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados durante todo o dia (inclusive para dormir), exceto durante as refeições e higiene oral. Durante esses períodos, deverão ser colocados na caixa plástica, fornecida pelos pesquisadores, que contém em seu interior um algodão ou gaze umedecida.
5. A escovação habitual deverá ser feita apenas com o dentifrício fornecido. Os dispositivos deverão ser higienizados e escovados somente na parte interna do aparelho.
6. Será fornecida aos participantes soluções de sacarose 40% em frasco conta-gota. O voluntário deverá colocar uma gota desta solução sobre cada bloco de dentina, esperar cinco minutos e recolocar o dispositivo na boca. Esse procedimento deverá ser feito dez vezes ao dia.

Caso haja necessidade de ingestão de antibióticos, comunicar imediatamente ao pesquisador.

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 Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 324/2006

Fortaleza, 31 de julho de 2006

Protocolo nº 143/06

Pesquisador responsável: Lidiany Karla Azevêdo Rodrigues

Deptº./Serviço: Departamento de Odontologia/UFC

Título do Projeto: "Estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre lesões de cárie dentinária"

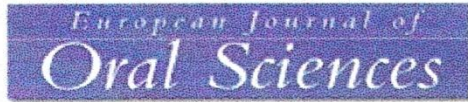
Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 06 de julho de 2006.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log C](#)[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *European Journal of Oral Sciences*.

Manuscript ID: EOS-3846-MAN-09

Title: In situ study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in lesions

Authors: Lima, Juliana
Melo, Mary
Borges, Fatima
Teixeira, Alrieta
Steiner-Oliveira, Carolina
Nobre-dos-Santos, Marinês
Azevedo Rodrigues, Lidianny Karla
Junqueira Zanin, Iriana Carla

Date Submitted: 06-Feb-2009

Print Return

ANEXO D



www.journalexperts.com

American Journal Experts Editorial Certification

This document certifies that the manuscript titled "In situ study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in dentine caries lesions" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com

Manuscript title: In situ study of the antimicrobial effect of photodynamic therapy in dentine caries lesions

Authors: Lima JPM, Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Zanin ICJ

Key: F658-14C1-66C2-1787-6957

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate

American Journal Experts is an association of Ph.Ds and Ph.D. graduate students from America's top 10 research universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. We provide the quickest turnaround times at the lowest prices in the industry. For more information, please visit www.journalexperts.com, or for volume discounts for academic journals, please contact us by email at salas@journalexperts.com