



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e
Clínica Integrada
ISSN: 1519-0501
alessandrouepb@gmail.com
Universidade Estadual da Paraíba
Brasil

Paschoal, Marco Aurélio; Cruvinal Silva, Thiago; Silva, André Luís; Campanelli, Ana
Paula; Andrade Moreira Machado, Maria Aparecida
Efeitos da Terapia FotodinâmicaAntimicrobiana sobre Microrganismos Cariogênicos:
Estudo Preliminar
Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 14, 2014, pp. 69-79
Universidade Estadual da Paraíba
Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63758925007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

Artigo Original

Efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre Microrganismos

Cariogênicos: Estudo Preliminar

Effects of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Cariogenic

Microorganisms: a Preliminary Study

Marco Aurélio Paschoal¹, Thiago Cruvinel Silva², André Luís Silva³, Ana Paula Campanelli², Maria Aparecida Andrade Moreira Machado⁴

¹Professor da Universidade Centro Universitário do Maranhão (UNICEUMA), São Luis/MA, Brasil.

²Professor da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP), Bauru/SP, Brasil.

³Técnico da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP), Bauru/SP, Brasil

⁴Professora Titular da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP), Bauru/SP, Brasil.

Correspondência: Marco Aurélio Paschoal. Universidade CEUMA - R. Josué Montello, n.1, Renascença II. CEP:65.075-120. São Luis, MA, Brasil. E-mail: marcobpaschoal@hotmail.com

Editoria Científica: Alessandro Leite Cavalcanti e Wilton Wilney Nascimento Padilha

Resumo

Objetivo: Investigar a sensibilidade de uma cepa laboratorial de *Streptococcus mutans* e dois isolados clínicos do grupo estreptococos à terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA). **Método:** Azul de toluidina (TBO) e diodos emissores de luz (LEDs) no comprimento de onda vermelho (600 – 700 nm) foram utilizados objetivando a morte de células planctônicas de uma cepa de referência de *S. mutans* (ATCC 25175) e dois isolados clínicos de estreptococos. Os microrganismos foram cultivados em infusão cérebro coração (BHI) em condições de microaerofilia a 37°C por 24 horas. Subsequentemente, suspensões foram transferidas para placas de 96 poços e tratadas com a combinação de quatro concentrações de TBO e quatro doses de luz. Grupos controle não foram tratados ou tratados com TBO e LED isoladamente. A efetividade da TFA foi avaliada por meio de plaqueamento e microscopia de varredura confocal a laser (MVCL). **Resultados:** O efeito antimicrobiano da TFA foi aumentado pela presença do TBO e pelo aumento das doses de luz. Resultado antibacteriano similar foi observado para os dois isolados clínicos ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ TBO a 24 J.cm^{-2} LED), em que a combinação de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ TBO e 36 J.cm^{-2} LED foi efetiva para inativação da cepa de referência de *S. mutans*. **Conclusão:** Embora ligeiras variações foram observadas entre as cepas, TFA foi efetiva na fotoinativação de células planctônicas dos microrganismos estudados.

Descritores: Cárie dentária. Fotoquimioterapia. *Streptococcus mutans*.

Introdução

Cerca de 1000 espécies bacterianas têm sido identificadas na cavidade bucal de humanos [1]. Algumas formam agregados complexos sobre as superfícies dentárias denominados biofilmes [2]. Microrganismos cariogênicos são capazes de fermentar carboidratos, especialmente sacarose, produzindo matriz extracelular e proporcionando um ambiente ácido [3]. Em ambientes com alta concentração de açúcares, competições entre bactérias acidúricas e acidogênicas proporcionam uma desregulação ecológica [4]. A persistência de baixos valores de pH por longo períodos causam perda mineral e destruição de estruturas dentárias com formação de cavidades [4-6]. Estreptococos, principalmente do grupo mutans (*Streptococcus mutans* - *S. mutans*) é largamente conhecido pela sua ligação com a etiologia e progressão da cárie dentária [3,5].

Diversos agentes químicos são usados concomitantemente à escovação objetivando a prevenção da cárie dentária [7]. Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) é uma abordagem relativamente nova para o controle de patógenos envolvidos com a doença [8,9]. O método consiste na fotoativação de fotossensibilizadores ou corantes por um comprimento de onda específico. Radicais livres como oxigênio singuleto, superóxidos e hidroxilos são produzidos durante a irradiação e esses produtos tóxicos são usados no metabolismo bacteriano com consequente morte celular [10,11].

A efetividade da TFA na inativação de *S. mutans* tem sido demonstrada por estudos prévios [8,9]. Cepas clínicas são frequentemente mais resistentes a antimicrobianos que cepas padrão ou laboratoriais devido a trocas genéticas entre microrganismos presentes na cavidade bucal [12-13]. Bactérias podem desenvolver resistência por meio da aquisição de material genético novo de outros organismos resistentes, ocorrendo entre cepas de mesma ou distinta espécies ou gêneros por troca genética (ex. conjugação, transdução e transformação) [14]. Baseado no fato de que cárie dentária é capaz de destruir estruturas mineralizadas em qualquer estágio da vida, crianças são mais afetadas por essa doença devido a imaturidade de sua destreza manual e, como consequência, não atingindo um nível ótimo de remoção de placa dentária ou biofilme [15]. Embora um estudo recente tenha provado a resistência de isolados clínicos à TFA [13], nenhum estudo prévio focou-se no efeito da TFA sobre isolados clínicos de microrganismos cariogênicos oriundo da cavidade bucal de crianças.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da TFA mediado por azul de toluidina (TBO) em associação a diodos emissores de luz (LEDs) no comprimento de onda vermelho sobre uma cepa padrão de *S. mutans* e comparar a dois isolados clínicos de estreptococos da saliva de crianças.

Metodologia

Preparação do inóculo bacteriano

Os isolados clínicos de estreptococos foram isolados da saliva de duas crianças (#1 e #2) de um estudo publicado previamente [16]. Para a utilização desse material biológico, o presente estudo foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Como cepa de referência, foi utilizado uma cepa laboratorial

de *S. mutans* (ATCC 25175) do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru. Os microrganismos cresceram em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid; Basingstoke, UK) em condições de microaerofilia a 37°C por 24h. A turbidez inicial das suspensões bacterianas foi determinada pela escala McFarland ($\sim 1.5 \times 10^8$ celulas.mL $^{-1}$).

Fotossensibilizador e fonte de luz

Uma solução estoque a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de TBO (T) (Sigma-St. Louis, MO, USA) foi preparada pela dissolução do pó em agua deionizada e mantida no escuro até seu uso. Previamente aos experimentos da TFA a solução estoque foi diluida a concentrações finais a 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Um dispositivo (L) (Biotable® LED) construído pelo Instituto de Fisica de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil) composto por 40 diodos emissores de luz (LXHLPR09, Luxeon III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA, USA) no comprimento de onda vermelho com janela de absorção de 600 a 670 nm (pico central de comprimento de onda a 640 nm) foi usado como fonte emissora de luz [19]. A densidade de potência utilizada foi de 400 mW.cm $^{-2}$ e quatro doses de luz (segundo uma formula previamente publicada e validada [20] foram testadas: 12, 24, 36 e 48 J.cm $^{-2}$ (correspondendo a 30, 60, 90 e 120 s de iluminação, respectivamente).

Aplicação da TFA

Alíquotas de cada suspensão bacteriana (100 μL) foram transferidas a orifícios de uma placa de 96 poços e divididas segundo os seguintes grupos: Grupo I (grupo TFA: TBO + LED; T+L+), Grupo II (grupo TBO: TBO; T+L-), Grupo III (grupo LED: LED; T-L+) e Grupo IV (Grupo controle, ausência de TBO e LED; T-L-). No dia do experimento, a solução estoque foi diluída em PBS e um mesmo volume (100 μL) de cada solução preparada foi adicionada aos mesmos poços para se atingir as concentrações a 250, 25, 2,5 e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O inóculo foi mantido em contato com o fotossensibilizador por 2 minutos (TPI: tempo de pré-irradiação) e então os poços foram iluminados pela Biotable® por 30, 60, 90 e 120 s para se atingir as dosimetrias desejadas (Grupo I). Para investigar se somente o TBO geraria algum efeito tóxico sobre a viabilidade bacteriana, poços foram expostos somente ao fotossensibilizador, entretanto sem posterior iluminação pelo LED (Grupo II). Bactérias expostas somente a irradiação LED sem prévia exposição ao TBO constituíram o Grupo III. Poços adicionais contendo as suspensões bacterianas sem exposição ao TBO nem à luz LED constituíram poços controle (Grupo controle; Grupo IV). A este último grupo um volume de 100 μL de PBS foi adicionado aos poços objetivando simular a presença do TBO.

Análise da efetividade da TFA

Após os tratamentos, a efetividade da TFA foi avaliada pela viabilidade bacteriana por meio de plaqueamento de modo apenas visual e descritivo (por meio da presença/ausência de unidades formadoras de colônia) para averiguação do crescimento bacteriano e para confirmação dos resultados e viabilidade dos achados, imagens em microscopia de varredura confocal a laser (MVCL) foram

realizadas. Para isso, alíquotas de 50 µL de todos os grupos foram plaqueadas em BHI agar (cepa de referência de *S. mutans*) e em SB-20 (20) e então as placas foram incubadas e, condições de microaerofilia a 37°C por 48h para posterior visualização das colônias. O ensaios foram realizados em duplicata para cada grupo e o procedimento repetido três vezes em diferentes dias (n = 6).

Para verificar a eficácia da abordagem fotodinâmica, alíquotas dos Grupos I a IV foram submetidas à análise por MVCL. Sendo assim, o conteúdo dos poços foram preparados como se segue: centrifugação a 10.000 RPM por 5 minutos, descarte do sobrenadante e o *pellet* resultante ressuspensionado em 50 µL de PBS glicerina (50%; v/v); 25 µL do conteúdo foi transferido para uma lâmina e corada com iodeto de propidio (PI) e alaranjado de acridina num volume de 15 µL para cada corante a 0.01% e então a solução resultante foi coberta com uma lamínula. As lâminas foram examinadas por meio de um microscópio confocal de fluorescência (TCS model, SPE, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) usando-se filtros específicos (filtro a 488/507 nm que detecta o alaranjado de acridina e captura a coloração verde e o filtro para PI - 503/615 nm o qual detecta coloração avermelhada). A detecção de bactérias emitindo fluorescência verde representa células viáveis, enquanto fluorescência vermelha representa morte bacteriana ou fotoinativação.

Resultados

O efeito da TFA sobre a cepa padrão e os dois isolados clínicos estão ilustrados nas Tabelas 1, 2 e 3. A presença e ausência do crescimento bacteriano foram representados por (+) e (-), respectivamente. A combinação de 0,25 µg.mL⁻¹ de TBO exposto a 36 J.cm⁻² do LED vermelho foi capaz de fotoativar o crescimento da cepa padrão de *S. mutans*. Entretanto, uma maior concentração de TBO (2,5 µg.mL⁻¹) foi necessária para fotoativar ambos os isolados #1 e #2 de estreptococos em combinação a 24 J.cm⁻² do LED vermelho (Tabelas 2 e 3). O efeito fotoativador da TFA foi aumentado pelo incremento da concentração de TBO e das doses de luz (e consequentemente dos tempos de iluminação), exceto para as concentrações de 25 e 250 µg.mL⁻¹ de TBO, que foram letais para todas as cepas estudadas mesmo na ausência da exposição à fonte emissora de luz.

Tabela 1. Efeito da terapia fotodinâmica sobre a cepa padrão de *S. mutans* (ATCC 25175).

TBO (µg.mL ⁻¹)	Doses de luz (J.cm ⁻²)				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	-	-
2,5	+	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

TBO, azul de toluidina; + = crescimento de *S. mutans*; - = inibição do crescimento de *S. mutans*

Tabela 2. Efeito da terapia fotodinâmica sobre o isolado clínico #1 de estreptococos.

TBO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Doses de luz (J.cm^{-2})				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	-
2,5	+	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

TBO, azul de toluidina; + = crescimento de estreptococos; - = inibição do crescimento de estreptococos

Tabela 3. Efeito da terapia fotodinâmica sobre o isolado clínico #2 de estreptococos.

TBO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Doses de luz (J.cm^{-2})				
	0	12	24	36	48
0	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	-
2,5	+	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-
250	-	-	-	-	-

TBO, azul de toluidina; + = crescimento de estreptococos; - = inibição do crescimento de estreptococos

As imagens de MCVL foram capazes de confirmar os achados do plaqueamento. A Figura 1 representa todas as situações que resultaram na eficácia da TFA de todos os microrganismos estudados em que células coradas em vermelho indicaram fotoinativação bacteriana (Grupo I: TFA). Por outro lado a Figura 2 representa situações em que as células emitiram fluorescência verde, demonstrando viabilidade bacteriana para os grupos II, III e IV para as três cepas estudadas.

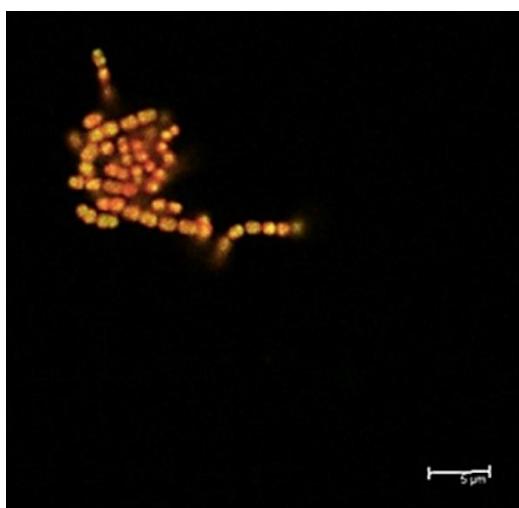


Figura 1. Microscopia de varredura confocal a laser representativa da efetividade da TFA (fluorescência vermelha) (Grupo I) de todos os três microrganismos estudados. Aumento de 63x/1.3 NA; zoom 3.



Figura 2. Imagem de microscopia de varredura confocal a laser representativa das células viáveis (Grupos II, III e IV) (fluorescência verde) das três cepas estudadas Aumento de 63x/1.3 NA; zoom. 3

Discussão

Os resultados apresentados no presente estudo atestaram que a TFA pôde fotoinativar tanto a cepa laboratorial de *S. mutans* quanto isolados clínicos de estreptococos, os quais demonstraram uma maior resistência. Resultados similares foram reportados por estudos prévios [9,13,20,21] corroborando com os resultados obtidos pelo presente estudo.

O sucesso da TFA mediada por TBO tem sido sugerida por alguns autores [24]. É bem conhecido que TBO é capaz de reduzir significantemente a contagem de UFC de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas no escuro [23,24]. TBO difunde-se facilmente pela membrana plasmática devido ao seu alto coeficiente de permeabilidade trans-membrana, capacidade hidrofílica e baixo peso molecular [25,27]. Sendo assim, TBO se torna progressivamente mais concentrado dentro da célula, contribuindo para sua toxicidade [23,25].

A fonte de luz usada nesse presente estudo é formado por LEDs vermelhos. É um protótipo (Bioblitz®) com um design em forma de caixa com superfícies refletoras, em que 40 LEDs são simetricamente alinhados em cinco linhas e oito colunas [17]. Diferentemente dos laser, LEDs podem ser produzidos de diferentes formas e tamanhos, permitindo sua aplicação simultânea em múltiplas amostras. Apresenta um baixo custo para sua produção e baixo risco para olhos desprotegidos. Ainda, está sendo empregado na TFA devido ao seu alto custo-benefício [20,21].

A susceptibilidade das três cepas à TFA foi estudada pela combinação de quarto concentrações de TBO e quatro doses de luz. Estudo demonstrou uma variação na concentração inibitória mínima (MIC) da TFA para inativação de especie de *Enterococcus* ssp. resistente à vancomicina pela combinação de azul de metileno e luz branca [26]. Autores trataram *S. mutans* com diversas concentrações de Rosa Bengala (RB) (0-50uM) irradiada com um fotopolímerizador (400-500nm) por vários períodos de demonstrando que 0.1 uM de RB e tempo de iluminação por 30s atingiu um padrão de dose dependência, gerando mortalidade celular a 0,5uM de RB. Para corroborar com nossos achados, a fotoinativação de uma cepa laboratorial de *C. albicans* foi alcançada quando da associação de 20uM de

curcumina exposta a 5.28 Jcm^{-2} de uma fonte de luz azul [27] em que isolados clínicos de *C. glabatra* and *C. tropicalis* foram fotoinativados quando expostos a uma densidade de energia três vezes maior (18 J.cm^{-2}) na presença de $40\mu\text{M}$ do mesmo fotossensibilizador [13].

O desenvolvimento de resistência a microrganismos a TFA parece não ocorrer, já que o oxigênio singuleto e radicais livres interagem com diferentes estruturas celulares e diferentes vias metabólicas [23]. Além disso, longos tempos de fotoativação permitem uma auto-regulação de espécies de oxigênio reativo (ROS) e, consequentemente, um aumento do stress oxidativo para os microrganismos. A aplicação da TFA, portanto, apresenta um considerável impacto na inativação de patógenos bucais. Este método alternativo pode substituir terapias antibióticas para o controle de doenças bacterianas [23].

O efeito letal da TFA é, em parte, explicado pela geração de ROS e sua interação entre as estruturas dos microrganismos. Embora aspectos relacionados aos fotossensibilizadores (ex. tipo, carga e concentração), microrganismo estudado (ex. fungos, bactérias, vírus), sua organização (ex. suspensão ou biofilmes), parâmetros da luz utilizada (ex. dosimetria, intensidade de potência e tipo de fornecimento – pulsada ou contínua) são aspectos básicos que contribuem para a efetividade da TFA. Variabilidades fenotípicas e genotípicas de cepas distintas podem explicar a maior resistência de estreptococos à TFA. *S. mutans* desenvolveram diferentes vias especializadas para regular a expressão gênica, secreção de proteínas e a biogênese da superfície celular em resposta ao processo de óxido-redução [28]. O comportamento de *S. mutans* na presença de oxigênio é amplamente influenciada pelos sensores VicK kinase de dois sistemas-componente *tipo* CovRS (TCS) e pela via AtlA autolisina, que tem maior participação na modulação da composição da superfície celular [28].

A aplicabilidade clínica deste modo coadjuvante de abordagem da cárie dentária pode ser baseado na diminuição do número de microrganismos cariogênicos por meio da iluminação de toda cavidade bucal previamente corada com fotossensibilizadores específicos para cada tipo de fonte emissora de luz (prevenção da cárie dentária) [29] e após remoção do tecido cariado em que a cavidade é totalmente corada e posteriormente iluminada para uma maior segurança quanto aos microrganismos sobreviventes naquele ambiente [30].

Embora apenas células coradas e posteriormente iluminadas com comprimentos de onda adequados possam ser beneficiados com o papel inativador desta terapia, estudos posteriores devem ser realizados de modo a averiguar o papel que o TBO teria sobre outros tipos celulares quanto a modificação da homeostase da cavidade bucal, assim como o papel da TFA sobre células do tecido gengival (queratinócitos) em relação a possível toxicidade desse método alternativo do controle da cárie dentária [26].

Embora o presente estudo demonstrou sucesso na aplicação da TFA exercendo efeito antimicrobiano em cepas clínicas e laboratorial do grupo estreptococos, a aplicação não simula as condições encontradas no ambiente bucal (biofilmes). Ainda, o número limitado de amostras clínicas (embora o principal objetivo fosse demonstrar a eficácia fotodinâmica) representem limitações desse

estudo. Embora, mesmo com essas dificuldades, inerentes a estudos *in vitro*, a presente pesquisa foi capaz de atingir os objetivos propostos.

Conclusão

Esta investigação indicou que a TFA mediada por TBO foi capaz de fotoinativar cepa padrão de *S. mutans* e dois isolados clínicos de estreptococos, embora ligeiras variações foram observadas entre as cepas estudadas. Mais estudos são necessários para elucidar o papel de sistemas de stress anti-oxidativos na proteção de isolados clínicos quando da aplicação da TFA. Adicionalmente, a eficácia da TFA sobre formas de biofilmes de estreptococos de diferentes doadores deve ser investigado objetivando elucidar o papel dessa abordagem alternativa, objetivando sua aplicabilidade clínica.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o Instituto de Física de São Carlos e o Centro de Óptica e Fotônica (CePOF) no desenvolvimento do protótipo usado nesse estudo e a técnica Marcia Graeff pelo auxílio na confecção das imagens microscópicas.

Abstract

Purpose: To investigate the sensibility of laboratory strains of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and two clinical isolates of streptococci group to photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Method:** Toluidine blue (TBO) and light emitting diodes (LEDs) in the red wavelength (600 – 700 nm) were combined aiming to kill planktonic cells of a laboratory strain of *S. mutans* (ATCC 25175) and two clinical isolates. Microorganisms grew in brain heart infusion (BHI) in microaerophilic conditions at 37°C for 24 h. Subsequently, suspensions were transferred to a 96-well microtiter plate and treated with combination of four different TBO concentrations and four light dosages. Control groups were non-treated or treated with TBO or red LED alone. The effectiveness of PACT was evaluated by plating and confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results:** The antimicrobial effect of PACT was observed in the presence of TBO with the increased values of light dosages. A similar antibacterial result was observed for both clinical isolates (2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ TBO and 24 J.cm^{-2} LED), whereas the combination of 0.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ TBO and 36 J.cm^{-2} LED was effective for inactivation of laboratory *S. mutans* strain. **Conclusion:** Although slight variations were observed between different strains, PACT was effective in photoinactivation of all studied *S. mutans* planktonic cells.

Descriptors: Dental caries. Photochemotherapy. *Streptococcus mutans*.

Referências

1. Kononen E. Development of oral bacteria flora in young children. Ann Med 2000;32(2):107-12.
2. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemoter 1998;42(1):13-28.
3. Marsh PD. Dental as plaque biofilm and a microbial community: implications for health and disease. BMC Oral Health 2006;6 (Suppl 1):S1-S14.

4. Radcliffe CE, Akram NC, Hurrel F. Effects of nitrite and nitrate on the growth and acidogenicity of *Streptococcus mutans*. *J Dent*. 2002;30(7-8):325-31.
5. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J Dent Res* 2006; 85(10): 878-87.
6. Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA. Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun* 1993; 61(9): 3811-17.
7. Slot DE, Lindeboom R, Rosema NA, Timmerman MF, van der Weijden GA. The effect of 0.12% chlorhexidine dentifrice gel on plaque accumulation: a 3-day non-brushing model. *Int J Dent Hygiene* 2007;5(1):45-52.
8. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992;25(2):77-81.
9. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emmitting diode. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):64-9.
10. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992;55(1):145-57.
11. Gomer CJ, Rucker N, Ferrario A, Wong S. Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat Res* 1989;120(1): 1-18.
12. Anderson GG, O'Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;322:85-105.
13. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med* 2011;43(9):927-3.
14. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* 2006;34(5 Suppl 1):S3-S10.
15. Wilson TG. A review of the literature with possible applications to Periodontics. *J Periodontol* 1987;58(10):706-14.
16. Silva TC, Pereira AFF, Exterkate RAM, Bagnato VS, Buzalaf MAR, Machado MAAM et al. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. *J Dent* 2012;40(1):41-7.
17. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10(3):313-9.
18. Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, De Rossi A, Faria G, Silva LA et al. Recovery of mutans streptococci on MSB, SB-20 and SB-20M agar media. *Arch Oral Biol* 2013;58(3):311-6.
19. Wood S, Nattress B, Kirkham JS, 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* 1999;50(1):1-7.
20. 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(4):281-7.
21. Mattiello FD, Coelho AA, Martins OP, Mattiello RD, Ferrão Júnior JP. In vitro effect of photodynamic therapy on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Streptococcus sanguinis*. *Braz Dent J* 2011;22(5):398-403.
22. Rolim JPML, Melo MAS, Guedes SF, Albulquer Filho FB, Souza JR, Nogueira NAP et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 2012;106:40-6.
23. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri M, Brugnara AJr, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed. Laser Surg* 2007;25(6):513-8.
24. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* 2010; 25(3): 385-9.
25. Wainwright M, Phoenix DA, Gaskell M, Marshall B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999;44(6):823-5.

26. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol* 2005;50(3): 353-9.
27. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 2011;87(4):895-903.
28. Ahn SJ, Wen ZT, Burne RA. Effects of oxygen on virulence traits of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2007;189(23):8519-27.
29. Leite DP, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg* 2014;32(11):627-32.
30. Guglielmi CA, Simionato MR, Ramalho KM et al. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt* 2011;16(8):88003 – 7.