

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

GYULIA MACHADO LISBOA RABELO

**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOSSENSIBILIZADORES
(AZUL DE TOLUIDINA E PRÓPOLIS VERMELHA) SOBRE MICRO-
ORGANISMOS CAUSADORES DA CÁRIE DENTAL E DE INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS**



MACEIÓ-AL

2022-1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

GYULIA MACHADO LISBOA RABELO



**EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOSSENSIBILIZADORES
(AZUL DE TOLUIDINA E PRÓPOLIS VERMELHA) SOBRE MICRO-
ORGANISMOS CAUSADORES DA CÁRIE DENTAL E DE INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para conclusão do curso de Bacharel em Odontologia.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regianne Umeko Kamiya.

MACEIÓ-AL

2022-1

**Catálogo na Fonte Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central**

Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

R114e Rabelo, Gyulia Machado Lisboa.
Efeitos da terapia fotodinâmica e fotossensibilizadores (azul de toluidina e própolis vermelha) sobre micro-organismos causadores da cárie dental e de infecções endodônticas / Gyulia Machado Lisboa Rabelo. – 2022.
48 f. : il.

Orientadora: Regianne Umeko Kamiya.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia) –
Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Odontologia. Maceió,
2022.

Bibliografia: f. 35-40.
Anexos: f. 42-48.

1. Fotoquimioterapia. 2. Própole. 3. Cárie dentária. 4. Endodontia. I.
Título.

CDU: 616.314-002

AGRADECIMENTOS DO TCC

Inicialmente, agradeço à Deus por sempre se fazer presente em minha vida e me permitir chegar a esse momento tão sonhado da minha graduação.

Agradeço a minha mãe, Guacyra Lisboa, por todo seu apoio, conselhos, companheirismo e por nunca mensurar esforços para me ver feliz e realizar meus sonhos. Por ser meu maior exemplo de mulher, cheia de força e determinação para conquistar o que deseja, e por ser minha maior referência na odontologia. Ao meu pai, Alexandre Rabelo (*in memoriam*), por me ensinar a ser sempre mais humana e curiosa, que mesmo não estando presente fisicamente, sei que está comigo em todos os momentos. Aos meus pais agradeço por todos ensinamentos, valores e amor incondicional. À minha irmã, Taynah, por todo apoio, cumplicidade e sintonia de sempre, por ser um exemplo de inteligência e obstinação.

A minha orientadora, Prof^a Dra. Regianne Umeko Kamiya, por ter me acolhido desde cedo na graduação, inicialmente como monitora e posteriormente como aluna de iniciação científica no Laboratório de Bacteriologia Molecular e Clínica (ICBS - UFAL). Agradeço por todos os ensinamentos, paciência e cuidado ao longo desses 4 anos de convívio. Por ser inspiração e resistência nesses tempos tão difíceis para o pesquisador brasileiro.

Aos meus amigos, por serem meu refúgio e descanso, especialmente meus amigos de graduação do Sonhar: Larissa, Karol, Ibirajara, Lara, Fernanda, Marcus, Pedro e Mariana, por serem minha segunda família. Por me acolherem, pelas risadas garantidas e por estarem sempre presentes. Em especial, agradeço a minha dupla, Ibirajara, pelo companheirismo de todos esses anos, por ter me ensinado, principalmente, a ter mais confiança em mim e me mostrar que sou capaz. Juntos pudemos evoluir, tanto profissional, como pessoalmente.

Aos meus companheiros de laboratório que já se formaram, Danrley, João, Cecília, Nathaly, Tamyres e Liliana, e aos colegas que passaram ou ainda integram o LBMC, Natália, Maria Juliana, Natanael e Wesley, agradeço por tornarem o trabalho mais leve, pela amizade, apoio nas dificuldades e conhecimentos compartilhados.

Agradeço também aos professores e funcionários da FOUFAL por todo aprendizado, respeito e confiança. Por me ajudarem a amadurecer e me auxiliarem a desenvolver meu potencial ao longo da graduação. Levarei comigo todos os ensinamentos passados.

SUMÁRIO

MANUSCRITO	7
INTRODUÇÃO	12
METODOLOGIA	17
Caracterização do estudo	17
Estudo 1: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (1J/10 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre células planctônicas de cepas-padrões	17
<i>Seleção das cepas microbianas</i>	17
<i>PDT in vitro para células planctônicas</i>	18
Estudo 2: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre biofilme de isolados clínicos	18
<i>Seleção das cepas microbianas</i>	18
<i>PDT in vitro para células de biofilme</i>	19
Estudo 3: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina ou Própolis Vermelha sobre células planctônicas e de biofilme de cepas-padrões	20
<i>Cepas microbianas e condições de crescimento</i>	20
<i>Curva de crescimento microbiano para padronização do inóculo inicial</i>	20
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	20
<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de fotossensibilizadores com e sem PDT sobre biofilmes maduros</i>	21
RESULTADOS	23
Estudo 1: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (1J/10 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre células planctônicas de cepas-padrões	23
<i>PDT in vitro para células planctônicas</i>	23
Estudo 2: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre biofilme de isolados clínicos	24
<i>PDT in vitro para células de biofilme</i>	24
Estudo 3: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina ou Própolis Vermelha sobre células planctônicas e de biofilme de cepas-padrões	25
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	25
<i>Densidade dos biofilmes</i>	26

<i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de fotossensibilizadores com e sem PDT sobre biofilmes maduros</i>	28
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	42

MANUSCRITO

Efeitos da terapia fotodinâmica e fotossensibilizadores (azul de toluidina e própolis vermelha) sobre micro-organismos causadores da cárie dental e de infecções endodônticas

Effects of photodynamic therapy and photosensitizers (toluidine blue and red propolis) on microorganisms that cause dental caries and endodontic infections

Regianne Umeko Kamiya
Professora Doutora Associada¹
ruk@icbs.ufal.br

Gyulia Machado Lisboa Rabelo
Graduanda em Odontologia¹
gyulia.rabelo97@gmail.com

¹ Universidade Federal de Alagoas, Maceió- AL, Brasil.

Endereço para correspondência:

Prof.^a Dra. Regianne Umeko Kamiya

Setor de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas.

Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, 57072-900 Maceió, Alagoas, Brasil.

Telefone: +55 82 32141883

RESUMO

Introdução: A terapia fotodinâmica (PDT) surge como uma possibilidade de reduzir a quantidade de micro-organismos patogênicos da cavidade bucal e tem sido muito utilizada como adjuvante em diversos procedimentos odontológicos. Corantes como os fenotiazínicos são os mais utilizados nessa terapia, mas pensou-se em utilizar também a própolis vermelha como fotossensibilizador para a realização da PDT. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana do laser vermelho de baixa potência associado ou não ao azul de toluidina ou à própolis vermelha sobre células planctônicas e/ou de biofilme de micro-organismos comumente associados à cárie dental e infecções endodônticas. **Metodologia:** Utilizou-se o método da Microdiluição seriada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) do azul de toluidina e da própolis vermelha sobre células planctônicas e de biofilmes maduros, submetidos ou não à laserterapia, por meio de quantificação das células viáveis em relação ao veículo controle. **Resultados:** Micro-organismos Gram-positivos, como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophylus* e *Enterococcus faecalis* foram mais susceptíveis à PDT com os diferentes corantes. *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se mais resistentes aos tratamentos. A própolis vermelha, após 24h de exposição, associada à PDT (9J, 90 seg) foi capaz de inibir todas as células de biofilmes maduros na CBM de 1625-15000 µg/mL, a depender da espécie testada. **Conclusão:** A PDT oferece um bom prognóstico para a terapêutica anticariogênica, bem como potencial aplicabilidade clínica, na endodontia, quando associada à própolis, principalmente como curativo de demora (ou longa duração). Mais experimentos serão necessários para validar a utilização desse material *in vivo*.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia; Própolis; Cárie dentária; Endodontia.

ABSTRACT

Introduction: Photodynamic therapy (PDT) may to reduce pathogenic microorganisms in the oral cavity and has been widely used as an adjuvant in several dental procedures. Dyes such as phenothiazines are the most used in this therapy, but also thought to use red propolis as a photosensitizer for performing PDT. **Objectives:** Evaluate the antimicrobial activity of low power red laser with or without toluidine blue or red propolis on planktonic cells and/or biofilm of microorganisms commonly associated with dental caries and endodontic infections. **Methodology:** The serial microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of toluidine blue and red propolis on planktonic cells and mature biofilms, submitted or not to laser therapy, by means of quantification of viable cells, in relation to the control vehicle. **Results:** Gram-positive microorganisms such as *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Enterococcus faecalis* were more susceptible to PDT with different dyes. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* were more resistant to treatments. Biofilms were completely destroyed after 24 hours of exposure to red propolis in the CBM to 1625 for 15000 µg/mL and association with PDT (9J, 90 sec). **Conclusion:** PDT offers a good prognosis for anticariogenic therapy, as well as potential clinical applicability, when associated with propolis, in endodontic practice, mainly as a delay medication (or long-acting medication). More tests will be needed to validate the use of this material *in vivo*.

Keywords: Photochemotherapy; Propolis; Dental Caries; Endodontics.

INTRODUÇÃO

O conceito de morte celular a partir da associação de uma fonte de luz com um produto químico específico é reconhecido há pelo menos cem anos. O professor Herman von Tappeiner e seu aluno Oscar Raab, no início do século XX, descobriram, de forma casual, que a combinação do corante vermelho de acridina e luz foi capaz de promover um efeito letal sobre culturas de paramécios. Sendo assim, utilizaram o termo “ação fotodinâmica” para relatar os efeitos citotóxicos provenientes da interação entre luz, oxigênio e substâncias químicas específicas (ACKROYD *et al.*, 2001; PRAÏMO *et al.*, 2016).

Posteriormente, Thomas Dougherty e colaboradores realizaram diversos testes clínicos com esse tipo de terapia, sendo os principais estudos clínicos experimentais na área de dermatologia. Em 1978, resultados marcantes demonstrando a redução de tumores cutâneos utilizando o corante derivado de hematoporfirina foram relatados e Jon Toth renomeou esse procedimento como terapia fotodinâmica ou PDT, proveniente do inglês *Photodynamic Therapy* (PRAÏMO *et al.*, 2016; RAJESH *et al.*, 2015).

No caso, a terapia fotodinâmica consiste na associação de um fotossensibilizador e de um feixe de luz, em um comprimento de onda específico, que na presença de oxigênio é capaz de promover a formação de radicais livres que induzem danos letais às células de micro-organismos patogênicos, como bactérias, fungos e vírus (REIS; REGIS; RODRIGUES, 2019).

Dessa forma, a luz possui a função de excitar o corante que interage com as moléculas vizinhas através de dois tipos de reações, a partir do seu estado excitado: no mecanismo tipo I, ocorre a formação de íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental. Isso permite a formação de substâncias oxidadas, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), capazes de oxidar uma gama de biomoléculas. Já a reação tipo II, a que promove um maior dano foto-oxidativo aos micro-organismos, é caracterizada pela transferência de energia do corante, no estado tripleto, para o oxigênio molecular, permitindo a formação do oxigênio singleto (1O_2), que se encontra em um estado altamente excitado, sendo bastante reativo e, conseqüentemente muito citotóxico, uma vez que há o prejuízo da membrana plasmática do micro-organismo, incluindo danos a proteínas, lipídios e DNA, porém sem afetar a célula hospedeira (REIS; REGIS; RODRIGUES, 2019; RAJESH *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2010; ABDELKARIM-ELAFIFI; PARADA-AVENDAÑO; ARNABATA-DOMINGUEZ, 2021).

Vale ressaltar que o oxigênio singleto possui uma meia-vida curta, sendo sua ação rápida e localizada, o que pode ser benéfico para tratamentos mais conservadores (ABDELKARIM-ELAFIFI; PARADA-AVENDAÑO; ARNABATA-DOMINGUEZ, 2021). Além disso, é importante frisar que essas duas reações são dependentes da tensão de oxigênio, bem como da concentração do fotossensibilizador utilizado (PRAÏMO *et al.*, 2016).

Além disso, para que haja um resultado positivo na PDT também é importante que a fonte de luz utilizada interaja com o fotossensibilizador escolhido. Para isso, é necessário que a luz possua um comprimento de onda específico capaz de estimular as moléculas do corante que, na presença de oxigênio, desencadeiam a reação fotoquímica (EDUARDO *et al.*, 2015).

Segundo Nagata, *et al.* (2011) existem 3 fontes principais de luz utilizadas para a terapia fotodinâmica: laser, LED e lâmpadas halôgenas. Para Eduardo, *et al.* (2015), os lasers possuem características específicas, como monocromaticidade, colimação e coerência, conseguindo agir em profundidade e de forma mais localizada. Já os LED's são capazes de emitir fótons em um mesmo comprimento de onda, porém agem de uma forma superficial e em uma maior área. Por sua vez, conforme Nagata, *et al.* (2011), as lâmpadas halôgenas têm a vantagem de serem filtradas espectralmente, a fim de corresponderem a qualquer fotossensibilizador, entretanto, o aquecimento é uma desvantagem importante de se considerar.

Tendo isso em vista, é importante avaliar o motivo da utilização da PDT, bem como a área em que ela será aplicada. Isso permite escolher o fotossensibilizador mais adequado para a situação e a fonte de luz capaz de estimular esse produto.

Inclusive, conforme Plotino, Grande e Mercade (2018), algumas características são importantes de serem avaliadas para considerar um fotossensibilizador como ideal, dentre as quais estão: inexistência de efeito mutagênico, capacidade de se acumular em tecido alvo, bom custo-benefício, alta fotoestabilidade, adequação para administração tópica e alto potencial de absorção na região espectral da luz de excitação.

De acordo com Nagata, *et al.* (2011), os corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno e o azul de toluidina são os mais estudados e utilizados na terapia fotodinâmica, os quais geralmente são associados à luz vermelha e possuem absorbância máxima em 600 a 660 nm. Além disso, esse mesmo estudo discute que os efeitos bactericidas desses corantes são muito similares, uma vez que conseguem inibir micro-organismos Gram-positivos e negativos, principais causadores da cárie dental e de infecções endodônticas.

Dessa forma, essa terapia vem sendo muito utilizada na odontologia para a realização de uma gama de procedimentos.

Nesse caso, na odontologia operatória, a PDT pode ser eficaz na inibição de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, sendo capaz de preservar os tecidos dentários e oferecer uma terapia menos invasiva, sendo viável para o tratamento de pacientes com cáries mais extensas. Além disso, o uso da PDT permite uma certa diminuição na atividade metabólica de biofilmes e reduz sua densidade celular (AFRASIABI *et al.*, 2019), o que é positivo, visto que as características das células de biofilme diferem das células planctônicas, uma vez que micro-organismos organizados em biofilme apresentam resistência circunstancial aos antimicrobianos e ao sistema imunológico, promovendo as dificuldades terapêuticas e fisiológicas. Ademais, estudos como o de Gong, *et al.* (2018) descrevem que o aumento de exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *Candida albicans* no biofilme cariogênico promove uma maior virulência, pois permite o aumento da densidade de *Streptococcus mutans*, produzindo um ambiente ácido, favorável à sobrevivência de lactobacilos, o que aumenta o tamanho desse biofilme e sua longevidade, bem como dificulta a intervenção medicamentosa na cavidade oral.

Já em relação à endodontia, essa terapia pode ser vista como adjuvante no preparo químico mecânico dos canais, principalmente em dentes submetidos ao tratamento de sessão única ou retratamento, pois a PDT é capaz de promover um efeito bactericida eficaz contra *Enterococcus faecalis*, uma bactéria Gram-positiva que possui um papel importante etiológico em infecções persistentes nos canais radiculares e em doenças endodônticas após tratamento (PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2018). Ademais, para Oliveira, *et al.* (2015), a associação do protocolo da terapia fotodinâmica com outras substâncias irrigadoras, pode ser efetiva para reduzir outros micro-organismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, também responsáveis pela iniciação e manutenção do processo infeccioso pulpo-periapical.

Outras áreas de destaque que admite o uso da terapia fotodinâmica como auxiliar no tratamento é a periodontia, uma vez que a aplicação do corante, em toda a superfície radicular, associada à laserterapia, consegue reduzir a quantidade de micro-organismos periodonto-patogênicos, tendo por consequência a redução da vermelhidão e do índice de sangramento à sondagem, sendo importante para o tratamento de infecções periodontais

microbianas localizadas (RAJESH *et al.*, 2015; PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2018).

Ademais, essa terapia é capaz de desempenhar um papel importante na diminuição da candidíase oral, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, ao permitir a permeabilidade da membrana plasmática de *C. albicans*, ocasionando a morte celular desses micro-organismos (PRAÏMO *et al.*, 2016).

Tendo em vista tais circunstâncias, a terapia fotodinâmica surge como uma possibilidade de reduzir a quantidade de micro-organismos patogênicos presentes na cavidade bucal sem induzir resistência a medicamentos, uma vez que age de forma localizada e inespecífica. Além de que apresenta outras vantagens, como repetibilidade, mínima invasão e baixa toxicidade, podendo ser uma grande aliada em vários procedimentos odontológicos (WU *et al.*, 2019).

Entretanto, mesmo com tantas utilizações e vantagens, pesquisadores como Praïmo, *et al.* (2016), expõe outro lado da terapia fotodinâmica, em que a maioria dos corantes utilizados pode, muitas vezes, ter seu efeito reduzido contra espécies de fungos e bactérias Gram-negativas. Isso, devido às características morfológicas e estruturais desses micro-organismos, como a presença de pseudohifas, e uma membrana externa, respectivamente, que limitam a penetração dos fotossensibilizadores, influenciando no resultado final.

Diante de tais informações, pensou-se em utilizar a própolis vermelha como um fotossensibilizador na PDT, a fim de contornar essas limitações e obter resultados ainda mais satisfatórios com esse tipo de terapia.

A própolis é uma mistura resinosa complexa produzida pelas abelhas a partir da coleta de gemas e exudatos das plantas, a fim de proteger e montar a estrutura do favo de mel. Esse produto possui uma composição química bastante associada às resinas, bálsamos e folhas de suas respectivas fontes vegetais, sendo a variabilidade da composição dependente da localização geográfica das plantas disponíveis para as abelhas (NÖR *et al.*, 2021; SOUSA SILVA *et al.*, 2021).

Segundo Sforcin (2016), a própolis tem diversas propriedades biológicas, como capacidade antioxidante, reparadora, cicatrizante e imunomoduladora, bem como possui ação anti-inflamatória e antimicrobiana. Inclusive Sousa Silva, *et al.* (2021) enfatiza a ação bactericida da própolis sobre bactérias responsáveis por diversas doenças humanas,

como a periodontite e a cárie dental, além de inibir bactérias multirresistentes relacionadas às infecções crônicas e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

Tendo em vista a relevância da terapia fotodinâmica na odontologia, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do laser vermelho de baixa potência associado ao corante azul de toluidina ou à própolis vermelha sobre células planctônicas e células de biofilmes maduros de micro-organismos Gram-positivos e negativos, bem como fungos, que geralmente estão associados ao processo cariogênico e ao insucesso da terapia endodôntica, em que se destacam as espécies *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

METODOLOGIA

Caracterização do estudo

Trata-se de 3 estudos: 1) avaliação da atividade antimicrobiana do laser vermelho (1J/10 segundos) associado ao azul de toluidina sobre células planctônicas de cepas padrões das espécies *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*; 2) avaliação da atividade antimicrobiana do laser vermelho (9J/10 segundos) associado ao azul de toluidina sobre células de biofilme de isolados clínicos das espécies *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans*; 3) avaliação da atividade antimicrobiana do laser vermelho (9J/90 segundos) associado ao azul de toluidina ou à própolis vermelha sobre células planctônicas e de biofilme das espécies *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Esse trabalho foi resultante de três pesquisas desenvolvidas no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), ao longo dos anos de 2018 a 2022, intitulados, respectivamente como: “Câncer de cabeça e pescoço: aplicabilidade odontológica da laserterapia, genotoxicidade do microbioma bucal e sequenciamento de marcadores biológicos”; “Câncer de cabeça e pescoço: efeitos da laserterapia sobre a hipossalivação pós radioterapia e sobre biofilmes microbianos *in vitro*, produção de acetaldeído pela microbiota bucal e sequenciamento de marcadores biológicos do câncer”; “Própolis vermelha associada à terapia fotodinâmica: efeitos antimicrobianos e antibiofilme *in vitro*, sobre micro-organismos de interesse médico e odontológico”. Todos os projetos do PIBIC foram financiados pelo Programa de Pesquisa para o SUS de Alagoas (2013-2019).

Estudo 1: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (1J/10 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre células planctônicas de cepas-padrões

Seleção das cepas microbianas

Utilizou-se as cepas-padrões ATCC (American Type Culture Collection) ou CCT (Coleção de Culturas Tropicais) de cinco espécies de micro-organismos para a realização dos testes com células planctônicas. Dessa forma, foram selecionadas as cepas *Streptococcus mutans* CCT3440, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Enterococcus*

faecalis ATCC29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC25619 e *Candida albicans* ATCC36802.

PDT in vitro para células planctônicas

Os testes foram realizados de acordo com estudos prévios (HAKIMIHA *et al.*, 2014; AZIZ *et al.*, 2018; de SOUZA-E-SILVA *et al.*, 2013), com algumas modificações. Inicialmente, realizou-se a suspensão das colônias de micro-organismos de culturas puras frescas (até 24h de incubação), em solução salina, ajustando a densidade de células com o padrão 0,5 McFarland, obtendo cerca de 10^8 UFCml⁻¹. Após essa etapa fez-se a diluição do caldo até 10^6 , para bactérias, e 10^5 UFCml⁻¹, para fungos, obtendo-se a diluição ideal de inóculo para aplicação dos tratamentos. Foi utilizada solução salina (controle) ou corante azul de toluidina à 0,01% (0,1 mg/ml) e laserterapia com potência de 25J/cm² e intensidade de 1J do laser vermelho, 660nm, durante 10 segundos de exposição. Em um primeiro momento, foi adicionado 100 µL de suspensão microbiana em cada poço de uma microplaca adicionado à 100 µL de azul de toluidina 0,01% ou 100 µL de salina, conforme mapeamento da microplaca. Porém, algumas dificuldades foram observadas com essa metodologia, optando-se por modificar o uso de microplacas por eppendorfs, evitando a incidência do laser em poços aproximados. Para cada cepa testada, foram usados 4 grupos de tratamentos: 1) grupo sem o corante e sem laserterapia (L-C-) (controle), 2) com corante e sem laserterapia (L-C+), 3) sem corante e com laserterapia (L+C-) e 4) com corante e com laserterapia (L+C+), em triplicata (anexo A).

Após os respectivos tratamentos, realizou-se a diluição seriada e plaqueamento das células viáveis para contagem e quantificação. Inicialmente utilizou-se a técnica da gota e, posteriormente, padronizou-se o plaqueamento pelo método de espalhamento em superfície, visando facilitar a contagem de colônias. As células foram diluídas e plaqueadas em triplicata e incubadas overnight à 37°C. Realizou-se a contagem de células viáveis, comparando-se os 3 grupos com o grupo controle, usando o teste Wilcoxon, com nível de significância de 5%.

Estudo 2: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre biofilme de isolados clínicos

Seleção das cepas microbianas

Selecionou-se 2 genótipos de *S. mutans* (88Sm6 e 99Sm4), 2 de *Lactobacillus* spp. (83Lac3 e 93Lac3) e 2 de *Candida albicans* (93C6 e 112C2), totalizando 6 isolados da

cavidade bucal de indivíduos com histórico de CEC de cabeça e pescoço e pós-radioterapia. As cepas foram previamente isoladas, identificadas e genotipadas em estudos anteriores (PIBIC 2017-2018) e estão preservadas em -20°C .

PDT in vitro para células de biofilme

Os experimentos foram realizados de acordo com estudos anteriores (HAKIMIHA *et al.*, 2014; AZIZ *et al.*, 2018; de SOUZA-E-SILVA *et al.*, 2013), com algumas alterações. Resumidamente, colônias isoladas em meios semisseletivos foram utilizadas para o preparo dos inóculos. Cerca de 10^8 UFCmL⁻¹ células (escala 0,5 McFarland) foram inoculadas em 200µL de meio BHI contendo sacarose 0,5% em microplacas (fundo U), as quais foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Yamay), a fim de evitar que a luz vermelha do laser, ao ser colocada sobre um poço, dissipasse para os poços vizinhos.

Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi descartado e o biofilme monoespécie pré-formado, a depender do tratamento, foi exposto à solução salina ou solução fotossensibilizadora de azul de toluidina à 0,01% (0,1 mg/ml) combinado ou não como o laser vermelho de baixa potência, com comprimento de onda de 660nm, 100mW de potência, 9J de energia e densidade de energia equivalente à 320J/cm², durante 90 segundos. Os testes foram realizados em triplicata, com 4 tipos de grupos para cada cepa: 1) grupo sem tratamento L-C- (controle), 2) grupo tratado apenas com corante e sem laserterapia (L-C+); 3) grupo tratado apenas com laserterapia (L+C-) e 4) grupo tratado com laserterapia e corante (L+C+).

Nos grupos 1 e 3 foi adicionado 200µL de salina esterilizada e nos grupos 2 e 4, 200µL do corante azul de toluidina. Após a aplicação do corante nesses grupos, eles foram encubados por 5min (tempo de pré-irradiação), a fim de haver uma melhor incorporação do fotossensibilizador no micro-organismo. Os grupos 3 e 4 foram submetidos à laserterapia de 9J/90 segundos (anexo B e C). Posteriormente ao tratamento, as células foram removidas assepticamente dos poços e foram diluídas serialmente para posterior inoculação de 25µL em placas contendo meio BHA. Foi realizada a contagem de células viáveis, comparando-se os 4 grupos (Wilcoxon, com nível de significância de 5%).

Estudo 3: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina ou Própolis Vermelha sobre células planctônicas e de biofilme de cepas-padrões

Cepas microbianas e condições de crescimento

Foram utilizadas as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* CCT 3440, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Candida albicans* ATCC36802 e *Candida albicans* SC doadas pela Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, RJ. *E. faecalis*, *S. mutans* e *L. acidophilus* foram reativadas em meio BHA, já *C. albicans* foi reativada em meio Cromoágar, em microaerofilia (5% de CO₂), *P. aeruginosa* foi reativada em meio McConkey Agar em aerofilia, por 24h a 37°C, para obtenção de unidades formadoras de colônias (UFC) isoladas.

Curva de crescimento microbiano para padronização do inóculo inicial

Colônias isoladas foram repicadas em caldo BHIYE contendo 0,5% de extrato de levedura, e culturas overnight (24h) foram utilizadas para a padronização das respectivas curvas de crescimento microbiano. Em resumo, acertou-se o inóculo inicial na densidade óptica de 0.25 (a 560nm) em novos tubos de BHIYE (contendo 5ml, em quadruplicata) e realizou-se as leituras de densidade celular em espectrofotômetro a 560nm, após 1h, 2h, 3h e 4h de incubação, nas mesmas condições. Definiu-se o tempo de incubação para atingir a metade da fase logarítmica ($D.O = 0.50$), o que permitiu a padronização de inóculo inicial com cerca de $1,5 \times 10^6$ UFCml⁻¹ células bacterianas viáveis.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para medir a capacidade dos corantes em inibir o crescimento de 90% das células microbianas, em relação ao veículo controle, os testes foram realizados de acordo com estudos prévios (HAKIMIHA *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2014; AZIZ *et al.*, 2018; KAMIYA *et al.*, 2019) com algumas modificações. Em resumo, realizou-se a diluição seriada da formulação de própolis vermelha (diluição serial de 2), obtendo-se as concentrações finais de 40, 80, 162.5, 325, 750, 1500, 3000 e 6000 µg/ml após a adição de 10µl da suspensão com micro-organismo com cerca de 10^7 UFCmL⁻¹ e 10µl de meio BHI concentrado 10x. Em adição, utilizou-se o corante azul de toluidina a 0,005% e 0,01%.

Uma replicata foi usada para determinação da CIM dos corantes sem PDT e com PDT, em que as células e diferentes concentrações de fotossensibilizantes foram submetidos à laserterapia de baixa potência, com intensidade de 100mW, 9J por 90 segundos ($320\text{J}/\text{cm}^2$). Como controle negativo, foram usados os placebos ou veículos controles dos respectivos corantes, e o controle positivo constituiu nos micro-organismos crescidos, nas mesmas condições em meio de cultura sem adição dos corantes e veículos controles. Após 24h de incubação, em microaerofilia, realizou-se o plaqueamento de 10 μl de cada micropoço, em duplicata, e posterior contagem das células viáveis. Os testes foram realizados em quadruplicata, em 2 experimentos independentes. Devido à obtenção de resultados não significativos para *P. aeruginosa* e *Candida albicans*, aumentou-se o tempo de exposição ao laser de 90 para 120 segundos, para possível alteração e/ou melhora da PDT para essa cepa. CIM com ou sem PDT foi definida como a menor faixa de concentração do respectivo corante capaz de inibir o crescimento de mais de 90% das células microbianas, em relação ao respectivo controle (anexo D).

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de fotossensibilizadores com e sem PDT sobre biofilmes maduros

Inicialmente, foram realizados testes pilotos com o objetivo de selecionar o meio mais adequado para formação de biofilme dentre as cepas estudadas. Foram avaliados 4 meios de cultura distintos: BHI 0,5% sacarose, YPD (1,5% de extrato de levedura, 2,5% de peptona e 1% de glicose), YD (1,5% de extrato de levedura e 1% de glicose) e RPMI, seguindo um mapeamento previamente estabelecido em uma microplaca de poliestireno de fundo U com 96 poços, em quadruplicata, em que 20 μl do inóculo inicial das cepas foi inoculado em 180 μl de cada um dos meios de cultura. A microplaca foi incubada em microaerofilia, durante 48h.

Após a incubação, os poços foram submetidos à sequência de coloração com cristal violeta 0,1% por 15 minutos, 4 lavagens com água destilada, secagem à temperatura ambiente e adição de álcool etílico absoluto para descoloração e solubilização do corante aderido ao biofilme. A quantificação do biofilme formado foi obtida através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 490nm, indicando a formação de um biofilme de alta ou baixa densidade celular.

Para a etapa seguinte da metodologia, correspondente a estudos prévios (AZIZ *et al.*, 2018; de SOUZA-E-SILVA *et al.*, 2013), biofilmes pré-formados sobre superfície de poliestireno, com 48 horas de crescimento em meio YPD ou YD foram submetidos ao

tratamento com formulação ou extrato de própolis concentrado (cerca de 10x CIM, sobre células planctônicas) ou azul de toluidina a 0,01% com ou sem a PDT associada (100 mW, 9J por 90 segundos, 320J/cm²).

Com base nos dados preliminares sobre a CIM da própolis vermelha sobre células planctônicas, foram avaliados 4 tipos de formulações ou extratos (a) formulação tamponada; (b) formulação em DMSO 1%; (c) extrato tamponado; (d) extrato em DMSO 1% contendo própolis nas concentrações de 3250 e 7500 µg/mL. Após incubação por 24 horas à 37° C, uma das triplicatas foi irradiada (100 mW, 9J por 90 segundos, 320J/cm²), como descrito anteriormente. Células de biofilmes expostas à própolis ou azul de toluidina com ou sem irradiação foram removidas assepticamente dos micropoços, sendo diluídas serialmente (diluição de 10) em tampão PBS esterilizado, plaqueadas em BHA e quantificadas (UFCmL⁻¹) após 24-48 horas de incubação. Por sua vez, azul de toluidina 0,01% e meio de cultura sem fotossensibilizante foram utilizados como controles (anexo E). A concentração bactericida mínima sobre os biofilmes foi definida como a menor faixa de concentração do fotossensibilizador capaz de inibir 100% do crescimento do patógeno, em relação ao controle (microrganismos do biofilme em salina, sem tratamentos).

Visto que a formulação tamponada contendo própolis apresentou os melhores resultados inibitórios sobre os biofilmes pré-formados (dados não mostrados), realizou-se novos testes com essa formulação, usando as concentrações de 1625, 3250, 7500 e 15000 µg/mL. Foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente, entretanto, houve tratamentos com PDT após 5 minutos e 24 horas de incubação com a formulação tamponada contendo própolis vermelha (anexo F).

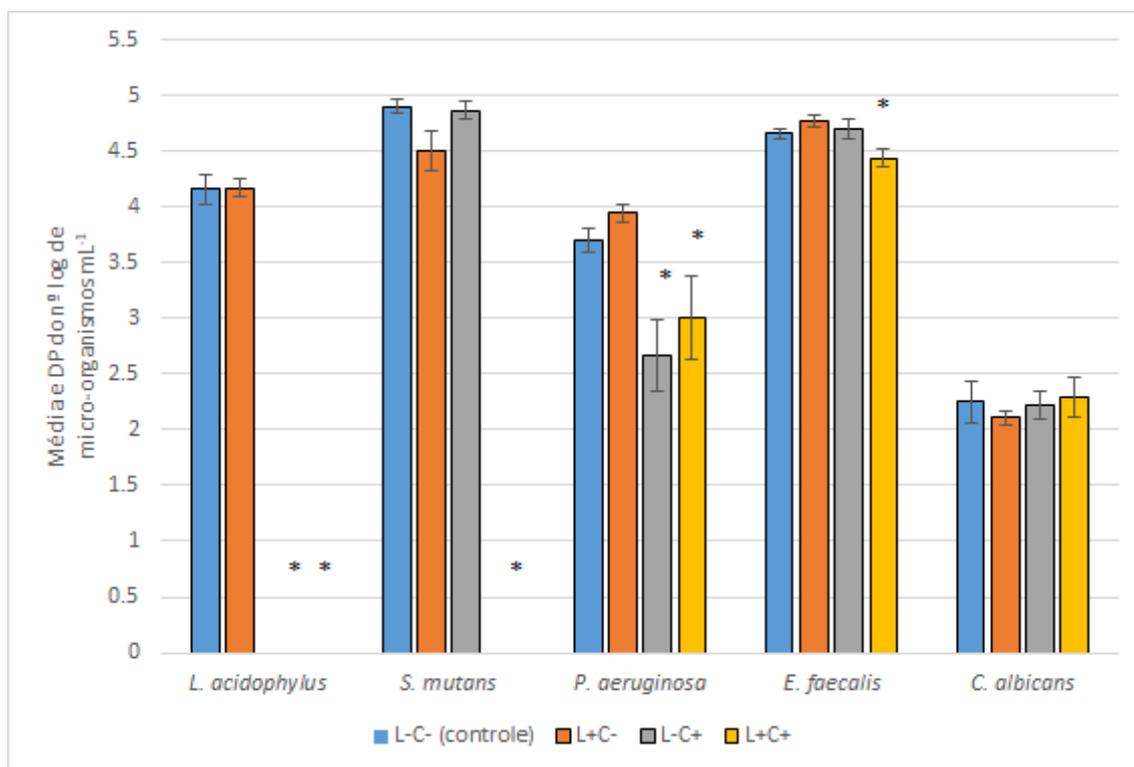
RESULTADOS

Estudo 1: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (1J/10 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre células planctônicas de cepas-padrões

PDT in vitro para células planctônicas

Foi evidenciado com o teste com cepas-padrões que a espécie de *Lactobacillus acidophylus* é bastante sensível à ação antimicrobiana do corante azul de toluidina a 0,01%, uma vez que apenas com a aplicação do corante, sem associação ao laser, houve uma redução de 100% do número de colônias. A espécie de *Streptococcus mutans* também apresentou sensibilidade ao corante, mas a associação do laser com o corante foi mais eficiente. Já as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* não obtiveram uma redução total do número de colônias como resposta a algum dos tratamentos, mas apresentaram uma redução de seu valor quando o tratamento L+C+ foi aplicado ou quando apenas o corante foi colocado, no caso das *P. aeruginosas*. Por outro lado, os resultados obtidos com a espécie de *Candida albicans* demonstram que não houve uma redução significativa do número de colônias em nenhum dos tratamentos realizados. Esses dados estão demonstrados no gráfico 1.

Gráfico 1- Média e desvio padrão do número log de células viáveis mL⁻¹ obtidos após tratamentos com corante azul de toluidina associado ou não à laserterapia de baixa potência (L-C+, L+C- e L+C+) de diferentes espécies microbianas como: *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. (* diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (L-C-), teste t de Wilcoxon, p < 5%



Fonte: autoria própria (2019)

Estudo 2: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina sobre biofilme de isolados clínicos

PDT *in vitro* para células de biofilme

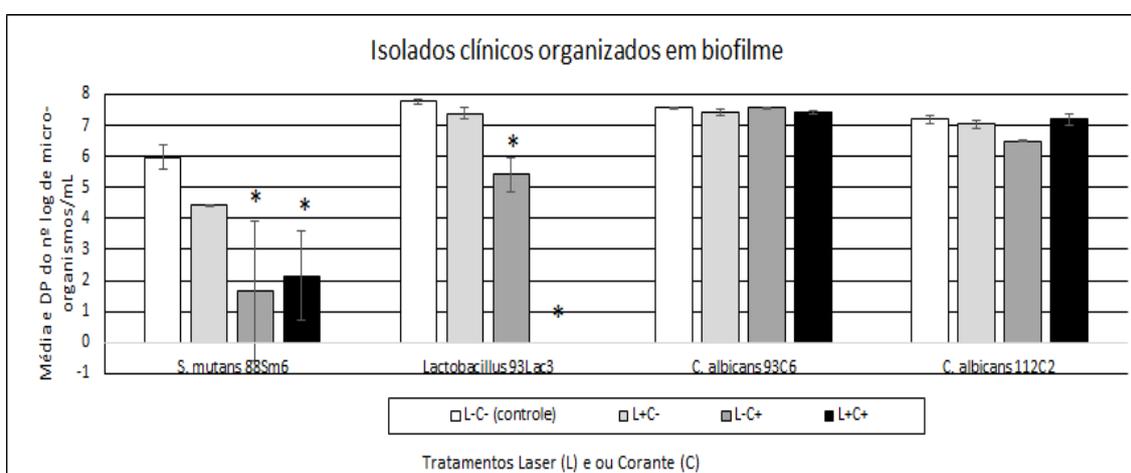
A cepa 88Sm6, da espécie *Streptococcus mutans*, ao ser submetida ao experimento, apresentou uma redução expressiva ao comparar o grupo controle (L-C-) com o grupo 4 (L+C+). Além disso, observou-se uma redução igualmente significativa da quantidade de células viáveis ao tratar esse isolado apenas com o corante azul de toluidina (grupo 2). Dados mostrados no gráfico 2.

Já em relação ao isolado clínico 93Lac3, da espécie *Lactobacillus acidophylus*, pode-se observar uma redução de 100% ao aplicar o tratamento completo (grupo 4), bem como também se evidencia uma redução estatisticamente significativa das células do

biofilme ao comparar o tratamento apenas com o corante (grupo 2) com o grupo controle. Esse resultado também pode ser visto no gráfico 2.

Para *C. albicans* 93C6 e 112C2, não foram observadas reduções estatisticamente significativas da quantidade de células viáveis em relação ao controle (gráfico 2).

Gráfico 2- Média e desvio padrão do número log de células viáveis mL⁻¹ após tratamentos com corante azul de toluidina associado ou não à laserterapia de baixa potência (L-C+, L+C- e L+C+) de diferentes cepas de *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na forma planctônica e em biofilme (* diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (L-C-), teste Wilcoxon, p< 5%)



Fonte: autoria própria (2020)

Estudo 3: Terapia fotodinâmica com laser vermelho de baixa potência (9J/90 segundos) associada ao corante Azul de Toluidina ou Própolis Vermelha sobre células planctônicas e de biofilme de cepas-padrões

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em relação aos micro-organismos Gram-positivos, como *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* CCT3440 e *Lactobacillus acidophylus* ATCC 4356, pôde-se observar que o corante azul de toluidina, em sua menor concentração (0,005%), conseguiu promover um efeito inibitório, tanto associado ao laser, como quando utilizado isoladamente. Esse resultado foi semelhante ao obtido com a própolis vermelha, que conseguiu inibir essas cepas, principalmente ao realizar a terapia fotodinâmica, em que a CIM foi de 162,5 µg/mL (tabela 1).

Entretanto, os resultados obtidos com a cepa Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* foram um pouco diferentes, uma vez que o corante azul de toluidina não

conseguiu promover ação inibitória ao ser utilizado de forma isolada ou em associação à laserterapia, nem mesmo em sua maior concentração (0,01%). Por sua vez, foi evidenciada uma atividade inibitória da própolis vermelha nas duas formas de tratamento (tabela 1).

Já os dados obtidos com as cepas de *Candida albicans* ATCC 36802 e SC 5314 não foram satisfatórios, visto que não houve ação inibitória dos corantes em nenhuma das concentrações utilizadas, tanto ao observar o tratamento sem PDT, como utilizando a PDT (tabela 1).

Tabela 1- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos fotossensibilizadores azul de toluidina e própolis vermelha sem e com PDT, sobre células planctônicas de micro-organismos de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophylus* e *Candida albicans*. *PDT (9J/90seg) e ** PDT (9J/120seg)

Espécies de Micro-organismos	sem PDT		com PDT	
	Azul de Toluidina %	Própolis vermelha µg/mL	Azul de Toluidina %	Própolis vermelha µg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> * ATCC 29212	≤ 0.005%	1500-3000	≤ 0.005%	≤ 162.5
<i>Streptococcus mutans</i> * CCT3440	≤ 0.005%	1500-3000	≤ 0.005%	≤ 162.5
<i>Lactobacillus acidophylus</i> ATCC 4356*	≤ 0.005%	325-750	≤ 0.005%	≤ 162.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619**	> 0.01%	1500-3000	> 0.01%	1500-3000
<i>Candida albicans</i> ** ATCC 36802	> 0.01%	> 6000 (-)	> 0.01%	> 6000 (-)
<i>Candida albicans</i> ** SC 5314	> 0.01%	> 6000 (-)	> 0.01%	> 6000 (-)

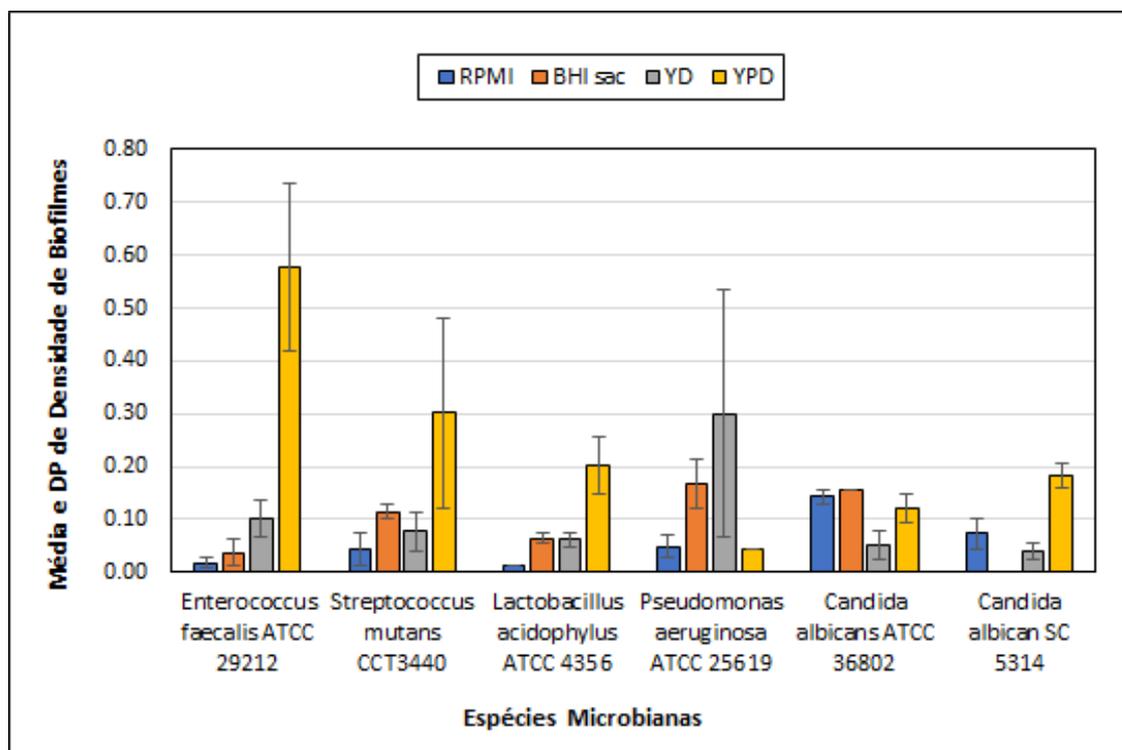
Fonte: autoria própria (2022)

Densidade dos biofilmes

Em relação aos testes para avaliar o melhor meio para formação de biofilme, os resultados mostraram que o meio YPD induziu a formação de um biofilme de maior

densidade celular para a maioria das cepas testadas, como: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans*. Já o meio YD é favorável para cepa *Pseudomonas aeruginosa* (gráfico 3).

Gráfico 3- Média e Desvio Padrão de Densidade de biofilme de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* CCT 3440, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Candida albicans* ATCC 36802 e *Candida albicans* SC5314 para os seguintes meios: BHI contendo 0,5% de sacarose, RPMI, YD (1,5% de extrato de levedura e 1% de glicose) e YPD (1,5% de extrato de levedura, 2,5% de peptona e 1% de glicose), em microaerofilia



Fonte: autoria própria (2022)

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) de fotossensibilizadores com e sem PDT sobre biofilmes maduros

Como não houve atividade inibitória dos tratamentos com fotossensibilizadores com e sem PDT após 5 minutos de exposição dos biofilmes maduros aos corantes (dados não mostrados), repetiu-se o mesmo protocolo de tratamento após 24h de exposição aos fotossensibilizadores, seguindo-se com a PDT (9J, 90 seg).

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) de fotossensibilizadores sem e com PDT ou fototerapia (9J/90 seg) sobre biofilmes maduros, após 24h de exposição ao corante

Espécies de Micro-organismos	<u>sem PDT</u>		<u>com PDT</u>	
	Azul de Toluidina %	Própolis vermelha µg/mL	Azul de Toluidina %	Própolis vermelha µg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 0.01%	1625-3250	> 0.01%	< 1625
<i>Streptococcus mutans</i> CCT3440	> 0.01%	3250-7500	> 0.01%	1625-3250
<i>Lactobacillus acidophylus</i> ATCC 4356	> 0.01%	7500-15000	> 0.01%	< 1625
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	> 0.01%	> 15000	> 0.01%	7500-15000
<i>Candida albicans</i> ATCC 36802	> 0.01%	7500-15000	> 0.01%	7500-15000
<i>Candida albicans</i> SC 5314	> 0.01%	> 15000	> 0.01%	7500-15000

Fonte: autoria própria (2022)

Pôde-se observar a ausência de uma concentração bactericida mínima pelo corante azul de toluidina a 0,01%. Diferente do obtido com a própolis vermelha, principalmente ao associá-la à laserterapia, em que houve uma ação bactericida mínima, a depender da concentração utilizada, tanto para cepas Gram-positivas, como Gram-negativas e leveduras. Bactérias Gram-negativas e leveduras foram mais resistentes (tabela 2).

DISCUSSÃO

Segundo Yamashita e Takeshita (2017), o microbioma bucal reflete a condição local e sistêmica de um indivíduo, uma vez que a alta diversidade microbiana presente neste ambiente, está geralmente associada a presença de dentes cariados, doença periodontal, endodôntica, má higienização bucal, bem como, às doenças sistêmicas preexistentes e condições ambientais influenciadas pelo tipo de dieta, uso crônico de tabaco e/ou álcool, hipossalivação, entre outros.

Conforme Gong, *et al.* (2019), *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. são considerados os responsáveis para o início e progressão da cárie dental, respectivamente, bem como *Candida* spp., um patógeno oportunista, que é capaz de promover a manutenção do processo cariogênico. Segundo Costa, *et al.* (2011), leveduras desse gênero microbiano, principalmente da espécie *Candida albicans*, está associada a infecções oportunistas da cavidade bucal, a exemplo da candidíase oral.

Em adição a isso, espécies bacterianas Gram-negativas também são comuns nas infecções endodônticas primárias e podem persistir após o tratamento químico-mecânico (PQM), com enfoque para as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Fusobacterium nucleatum*, capazes de liberar produtos citotóxicos, como endotoxinas de lipopolissacarídeos (LPS), que induzem reação inflamatória, com consequente reabsorção óssea nos tecidos periapicais (JACINTO *et al.*, 2005; SIQUEIRA e RÔÇAS, 2008). Ademais, bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, podem ser encontradas em canais radiculares não tratados, além de que estão associadas às falhas na terapia endodôntica (TENNERT *et al.*, 2014). Tendo isso em vista, a terapia fotodinâmica é uma opção para o tratamento de infecções locais e controle de infecções bucais.

No estudo 1, a associação do corante azul de toluidina com 1J de energia do laser vermelho de baixa potência, durante 10 segundos, sugere uma possível atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre esses micro-organismos patogênicos, principalmente em relação às bactérias promotoras da cárie dental, como é o caso de *S. mutans* e *L. acidophylus*, uma vez que houve uma redução de 100% das células planctônicas bacterianas analisadas no grupo 4 (laserterapia + corante), em ambas as espécies. Tal resultado corrobora com os achados de Aziz, *et al.* (2018), em que o crescimento de lactobacilos pôde ser minimizado ao utilizar a PDT, embora o corante utilizado em sua pesquisa tenha sido o azul de metileno. Esses dados também estão de acordo com a pesquisa realizada por Hamika, *et al.* (2013), em que submeteu uma cepa

padrão de *S. mutans* ao mesmo corante, na mesma concentração e em um mesmo tempo de pré-irradiação, diferenciando apenas o emissor de luz que foi o LED.

Entretanto, ainda no estudo 1, pôde-se observar, em todos os grupos com tratamento (grupos 2, 3 e 4), a ausência de uma redução estatisticamente significativa das células planctônicas de *Candida albicans* em relação ao grupo controle (grupo 1). Muito disso pode estar associado às características morfológicas de *Candida* spp., incluindo a termotolerância, a expressão de genes de resistência aos antifúngicos e a produção de enzimas extracelulares, como hemolisinas, fosfolipases e proteinases (MARCOS-ARIAS *et al.*, 2009) que podem contribuir direta ou indiretamente na resistência à PDT e ao corante. Inclusive, segundo Cernáková, *et al.* (2017), a morfologia de *C. albicans* tem um importante papel na redução da susceptibilidade da espécie ao tratamento, uma vez que a presença de pseudohifas e pseudomicélios interferem na ação da terapia fotodinâmica, além de que algumas cepas podem formar clamidósporos (células fúngicas de parede espessa), essas estruturas são formadas principalmente nos biofilmes orais.

Além desses dados, é importante ressaltar a complexidade da microbiota oral, visto que os micro-organismos, muitas vezes, estão organizados em biofilme. Segundo Bowen, *et al.* (2017), os micro-organismos presentes nessa estrutura estão envoltos por uma matriz expolissacarídica que permite que as células se organizem em ecossistemas coesos, onde ocorrem interações cooperativas e antagônicas dentro de um meio químico e físico diverso, em que há diferentes comportamentos microbianos, pH variado e disponibilidade de nutrientes, permitindo a criação de nichos com distintos potenciais patogênicos. Além disso, conforme Krzyściak, *et al.* (2013), a capacidade do micro-organismo em formar biofilme permite que ele seja mais resistente a antibióticos e a mudanças ambientais. Isso confere uma resistência ainda maior da cepa a diversos tratamentos, incluindo a terapia fotodinâmica.

Tendo isso em vista, observa-se no estudo 2 que os biofilmes da cepa *Streptococcus mutans* 88Sm6 continuou a apresentar um resultado significativo ao realizar a terapia fotodinâmica, apesar da condição desfavorável que o biofilme promove. Além disso, observou-se uma redução igualmente relevante da quantidade de células viáveis ao tratar esse isolado apenas com o corante azul de toluidina (grupo 2), o que difere do resultado obtido no estudo 1, em que essa mesma cepa obteve reduções significativas no grupo 4 (L+C+) e no grupo 3 (L+C-), mostrando que um mesmo isolado clínico, a depender da situação, pode se comportar de maneiras diferentes. Esse resultado corrobora com o achado por Steiner-Oliveira, *et al.* (2016), em que espécies de *S. mutans*,

encontradas em lesões de cárie em dentina de pacientes infantis, tiveram sua quantidade reduzida expressivamente ao serem submetidas à PDT.

Em adição, o isolado clínico de *Lactobacillus* spp. 93Lac3 reduziu em 100% suas células viáveis após tratamento de laserterapia com o corante azul de toluidina, reforçando os resultados observados no estudo 1. De acordo com Wu, *et al.* (2019), a espécie de lactobacilos não é capaz de formar um biofilme complexo, tornando-o susceptível às condições testadas na presente pesquisa, em que o laser vermelho de baixa potência emitia 9J de energia, durante 90 segundos.

Por sua vez, não se pôde observar novamente uma redução estatisticamente significativa da quantidade de células viáveis dos 2 isolados clínicos da espécie de *Candida* spp., em relação ao grupo controle. Isso difere dos resultados relatados por Costa *et al.* (2011), uma vez que demonstraram uma redução da quantidade de células viáveis ao comparar o grupo controle com o grupo que recebeu o tratamento completo com emissor de luz e fotossensibilizador. Entretanto, esse estudo utilizou o LED azul, com emissão de 36J por 180 segundos, associado aos corantes rosa bengala ou eritrosina, condições diferentes a dessa pesquisa. Mesmo que esse estudo tenha utilizado isolados clínicos de *Candida* spp., crescidas em biofilme monoespécie, a utilização desses dois tipos diferentes de fotossensibilizadores pode ter contribuído para a obtenção de um resultado positivo, visto que a estrutura química desses reagentes pode ter uma maior afinidade à estrutura do fungo, permitindo uma melhor ação da PDT.

A partir disso, outros corantes, como a própolis vermelha, passaram a ser considerados para a realização da terapia fotodinâmica. Isso, pois os compostos fenólicos e flavonoides podem atribuir à própolis propriedades antimicrobianas, antissépticas, antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias, que podem potencializar os efeitos da PDT (FIANCO *et al.*, 2013). Ademais, Castro, *et al.* (2007) reforçam que a atividade antimicrobiana da própolis pode estar diretamente associada à quantidade desses compostos bioativos, em que a maior concentração de fenóis e flavonoides determina um maior potencial microbicida do produto.

Sendo assim, pôde-se observar no estudo 3, resultados satisfatórios ao analisar a concentração inibitória mínima (CIM) do corante azul de toluidina e da própolis vermelha, associados à laserterapia sobre células planctônicas de micro-organismos Gram-positivos, visto que esses fotossensibilizadores, em suas menores concentrações, 0,005% e 162,5 µg/mL, respectivamente, conseguiram promover a inibição dessas cepas. Isso corrobora com os achados de Fonseca, *et al.* (2020), em que a associação da PDT

com a própolis mostrou-se eficaz contra micro-organismos Gram-positivos. De acordo com esse estudo, muito disso pode estar associado à capacidade dos flavonoides e outros compostos aromáticos presentes na própolis agirem na parede celular desses micro-organismos. Ademais, destaca-se o resultado obtido no estudo de Siqueira, *et al.* (2014), no qual a utilização da própolis vermelha foi efetiva especificamente contra *E. faecalis*, podendo ser considerada uma alternativa para auxiliar no tratamento endodôntico.

Por sua vez, o extrato de própolis foi capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 1500-3000 µg/ml, tanto ao utilizá-la isoladamente, como em associação ao laser vermelho de baixa potência, o que reforça as propriedades antibactericidas da própolis. Isso está de acordo com a literatura, como mostra a pesquisa realizada por Furtado Júnior, *et al.* (2019) que demonstraram, em seu estudo, a redução efetiva de micro-organismos Gram-negativos após a utilização da própolis, na concentração de 1%, em um dentifrício fluoretado (1500 ppm). Entretanto, esse resultado difere com os achados nos estudos de Fonseca, *et al.* (2020), em que a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, foi resistente ao tratamento com o fotossensibilizador de extrato alcóolico seco de própolis (22%), tanto isoladamente, como em ação conjunta com o laser vermelho de baixa potência, também utilizado com potência de 100mW, durante 90 segundos.

Esses dados diferenciam-se do obtido com o corante azul de toluidina, em que observou ser necessário uma concentração maior que 0,01% para a possível obtenção de um resultado positivo. Muito disso pode estar relacionado à morfologia das bactérias Gram-negativas, que possuem uma membrana externa com permeabilidade reduzida e é constituída por lipopolissacarídeos, os quais contribuem para a resistência desse tipo de bactéria à ação de antibióticos, corantes e à defesa do hospedeiro, limitando a difusão dos reagentes no citosol bacteriano (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013). Essas características morfológicas, inclusive, justificam o aumento do tempo de exposição ao laser para 120 segundos para essa espécie bacteriana. De acordo com Reis, *et al.* (2019), a eficiência da PDT está diretamente relacionada à densidade de energia, potência emitida e tempo de exposição da cepa à luz.

Esses resultados adquiridos com o corante azul de toluidina vão de encontro ao proposto por Nagata, *et al.* (2012) em seu estudo, que afirma que esse fotossensibilizador tem a capacidade de inibir tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. Porém,

corroborar com os achados de Sperandio, *et al.* (2013), tendo em vista a não efetividade da PDT sobre micro-organismos Gram negativos a não ser que essa terapia seja associada a outros mecanismos, como o pré-tratamento das células com EDTA.

Já em relação aos resultados referentes à CIM dos fotossensibilizadores sobre células planctônicas de fungos, pôde-se observar que ambas as cepas de *Candida albicans* não sofreram inibição, com ou sem a associação da laserterapia nas condições avaliadas (9J/90segs), sendo necessária uma concentração maior do que a utilizada dos dois corantes, para que haja uma possível eficácia da terapia. Muito desse resultado pode ser consequência da exposição prolongada desse micro-organismo a drogas, como azóis, resultando em uma alteração genética irreversível, bem como favorecendo a existência de mecanismos de resistência, como bombas de efluxo, tolerância, difusão restrita e formação de biofilmes (ALVES *et al.*, 2019).

Como não houve resultados positivos da PDT com azul de toluidina e própolis após 5 minutos de exposição aos corantes sobre os biofilmes maduros, aumentou-se o período de exposição para 24 horas visando melhor incorporação do fotossensibilizador, visto que de acordo com Plotino *et al.* (2019) o tempo de pré-irradiação constitui um elemento chave na PDT, permitindo a obtenção de uma terapia fotodinâmica promissora. Nessa etapa do experimento foi possível verificar que a própolis vermelha após 24h de exposição e posterior tratamento com laser vermelho de baixa potência, nas condições testadas (9J/90segs), foi capaz de eliminar em 100% as células de biofilmes maduros de todas as espécies testadas, em concentrações variadas a depender da espécie (de 1625 a 15000 µg/mL). Ademais, é possível observar a ausência da ação bactericida pelo corante azul de toluidina na concentração 0,01%, mesmo após 24h de exposição, ressaltando a eficácia da própolis vermelha como um potencial fotossensibilizador a ser utilizado na prática clínica, principalmente como curativo de longa duração de canais radiculares com necrose pulpar.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível observar que a terapia fotodinâmica associada ao corante azul de toluidina possui atividade antibacteriana sobre cepas padrões, principalmente contra micro-organismos Gram-positivos, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, principais causadores da cárie dental, com exceção da espécie *Candida albicans*, em que não foi evidenciada redução significativa das células viáveis da espécie. Um resultado similar pôde ser observado ao analisar a ação antimicrobiana da fototerapia sobre biofilmes de isolados clínicos de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. e *Candida albicans*.

Ademais, através dos dados obtidos com esse estudo, nota-se que nas concentrações de 1625-15000 µg/mL da formulação tamponada de própolis (24h de exposição) associada à laserterapia (9J/90seg) houve destruição total dos biofilmes de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Isso oferece a perspectiva de aplicabilidade clínica desse produto na prática endodôntica, principalmente como curativo de demora. Vale ressaltar que o preparo mecânico, juntamente com a desinfecção prévia do canal podem potencializar o efeito antimicrobiano da formulação proposta nesse trabalho.

Mais pesquisas serão necessárias para validar a utilização desse material *in vivo*. Ademais, devido à ausência da ação inibitória ou bactericida do corante azul de toluidina na concentração 0,01% (concentração comercialmente utilizada na endodontia) com ou sem laser, sobre biofilmes maduros, ressalta-se a relevância do produto contendo própolis para a prática clínica mencionada.

REFERÊNCIAS

ABDELKARIM-ELAFIFI, H., PARADA-AVENDAÑO, I., ARNABAT-DOMINGUEZ, J. **Photodynamic Therapy in Endodontics: A Helpful Tool to Combat Antibiotic Resistance: A Literature Review.** *Antibiotics (Basel)*. Sep 13;10(9):1106. doi: 10.3390/antibiotics10091106. PMID: 34572688; PMCID: PMC8468135, 2021.

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. **The History of Photodetection and Photodynamic Therapy.** *Photochemistry and Photobiology*, 74: 656-669. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2), 2001.

AFRASIABI, S.; POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N.; AMINIAN, M.; BAHADOR, A. **Anti-biofilm and anti-metabolic effects of antimicrobial photodynamic therapy using chlorophyllin-phycoerythrin mixture against *Streptococcus mutans* in experimental biofilm caries model on enamel slabs.** *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Mar;29:101620. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101620. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31841686, 2020.

AMARAL, R. R. et al. **Photodynamic therapy in endodontics: review of literature.** *RFO UPF [online]*. vol.15, n.2, pp. 207-211. ISSN 1413-4012., 2010.

ALVES, F. et al. **Photodithazine-mediated antimicrobial photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* in vivo.** *Medical Mycology*, v. 57, n. 5, p. 609-617, 2019.

AZIZ, A. et al. **Comparison of the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy with two mediators against *Lactobacillus acidophilus* in vitro.** *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 21, p. 357-362. ISSN 1873-1597. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29409897>>, Mar 2018.

BOWEN, W.H.; BURNE, R.A.; WU, H.; KOO, H. **Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments.** *Trends Microbiol*. 2018 Mar;26(3):229-242. doi: 10.1016/j.tim.2017.09.008. Epub. PMID: 29097091; PMCID: PMC5834367, 2017 Oct 30.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. **Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica.** Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512- 1516, 2007

CERNÁKOVÁ, L.; DIŽOVÁ, S.; BUJDÁKOVÁ, H. **Employment of methylene blue irradiated with laser light source in photodynamic inactivation of biofilm formed by *Candida albicans* strain resistant to fluconazole.** Med Mycol. 55(7):748-753. doi: 10.1093/mmy/myw137. PMID: 28053149, 2017 Oct 1.

COSTA, A.C.; RASTEIRO, V.M.; PEREIRA, C.A.; ROSSONI, R.D.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O. **The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*.** Mycoses. 55(1):56-63. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21668520, Jan 2012.

EDUARDO, C. P. et al. **Photodynamic therapy as a complementary benefit in the dental clinic.** Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent. [online]. vol.69, n.3, pp. 226-235. ISSN 0004-5276, 2015.

FIANCO, A. L. B. et al. **Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna).** Revista Liberato (Novo Hamburgo), 2013.

FONSECA, A.M.V.; SAMPAIO, G.H.L.; ARAUJO, W.P.; da SILVA, R.E.; RIBEIRO, F.O.S.; BRITO, M.D.P.; SOUSA, F.B.M.; TORRES, A.A.; ARAÚJO, A.R.; PINTO, A.S.B. **Photodynamic Therapy With Propolis: Antibacterial Effects on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* Analysed by Atomic Force Microscopy.** J Lasers Med Sci. 2020 Fall;11(Suppl 1):S107-S112. doi: 10.34172/jlms.2020.S17. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33995978; PMCID: PMC7956024.

FURTADO JÚNIOR, J.H.C.; VALADAS, L.A.R.; FONSECA, S.G.D.C.; LOBO, P.L.D.; CALIXTO, L.H.M.; LIMA, A.G.F.; de AGUIAR, M.H.R.; ARRUDA, I.S.; LOTIF, M.A.L.; RODRIGUES NETO, E.M.; FONTELES, M.M.F. **Clinical and**

Microbiological Evaluation of Brazilian Red Propolis Containing-Dentifrice in Orthodontic Patients: A Randomized Clinical Trial. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;8532701. doi: 10.1155/2020/8532701. PMID: 32063987; PMCID: PMC6996680, 2020 Jan 21.

GONG, J.; PARK, H.; LEE, J.; SEO, H.; LEE, S. **Effect of Photodynamic Therapy on Multispecies Biofilms, Including *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Candida albicans*.** Photobiomodul Photomed Laser Surg. May;37(5):282-287. doi: 10.1089/photob.2018.4571. Epub 2019 Apr 5. PMID: 31084564, 2019.

HAKIMIHA, N. et al. **The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources.** J Appl Oral Sci, v. 22, n. 2, p. 80-4, ISSN 1678-7765. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24676576>>, Apr 2013.

JACINTO, R.C.; GOMES, B.P.; SHAH, H.N.; FERRAZ, C.C.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J. **Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth.** J Med Microbiol. Aug;54(Pt 8):777-83., 2005.

KRZYŚCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŚCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. **The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 33(4):499-515. doi: 10.1007/s10096-013-1993-7. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24154653; PMCID: PMC3953549, 2014 Apr.

KAMIYA, R.U. et al. **Saliva artificial com sistema de nanopartículas de gantrez e potenciais antissépticos bucais, para o tratamento de xerostomia oncológica.** PIBIT 2018-2019, 2019.

LIMA, B.A.; BERLINCK, R.G.B.; GONÇALVES, R.B.; KAMIYA, R.U. **Halistanol sulfate A and rodriguesines A and B are antimicrobial and antibiofilm agents against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*.** Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy 6: 651-659, 2014.

MARCOS-ARIAS, C.; ERASO, E.; MADARIAGA, L.; AGUIRRE, J.M.; QUINDÓS, G. **Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers.** *Mycoses*. 54(4):e10-6. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01812.x. Epub 2009 Dec 17. PMID: 20028461, Jul 2011.

NAGATA, J.Y; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V.R.; TERADA, R.S.; GRACIANO, A.X.; BAESSO, M.L.; HAYACIBARA, M.F. **Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties.** *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Jun;9(2):122-31. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.11.006. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22594982, 2012.

NÖR, F.; NÖR, C.; BENTO, L.W.; ZHANG, Z.; BRETZ, W.A.; NÖR, J.E. **Propolis reduces the stemness of head and neck squamous cell carcinoma.** *Arch Oral Biol*. May;125:105087. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105087. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33639480; PMCID: PMC8532192, 2021.

de OLIVEIRA, B.P.; AGUIAR, C.M.; CÂMARA, A.C.; de ALBUQUERQUE, M.M.; CORREIA, A.C.; SOARES, M.F. **The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique.** *Photodiagnosis Photodyn Ther*. Sep;12(3):436-43. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.05.004. Epub 2015 May 22. PMID: 26007242, 2015.

PLOTINO, G.; GRANDE, N.M.; MERCADE, M. **Photodynamic therapy in endodontics.** *Int Endod J*. Jun;52(6):760-774. doi: 10.1111/iej.13057. Epub 2018 Dec 25. PMID: 30548497, 2019.

PRAÏMO, E.J.; KWAŚNY, M.; ŁAPIŃSKI, M.; MIELCZAREK, A. **Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases.** *Adv Clin Exp Med*. Jul-Aug;25(4):799-807. doi: 10.17219/acem/32488. PMID: 27629857, 2016.

RAJESH, S.; KOSHI, E.; PHILIP, K.; MOHAN, A. **Antimicrobial photodynamic therapy: An overview.** *J Indian Soc Periodontol*. Oct;15(4):323-7. doi: 10.4103/0972-124X.92563. PMID: 22368354; PMCID: PMC3283927, 2011.

REIS, A.C.M.; REGIS, W.F.M.; RODRIGUES, L.K.A. **Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: An alternative approach for reducing cariogenic bacteria.** Photodiagnosis Photodyn Ther. 26:179-189. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.03.012. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30898559, 2019 Jun.

SFORCIN, J.M. **Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis.** Phytother Res. Jun;30(6):894-905. doi: 10.1002/ptr.5605. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26988443, 2016.

SIQUEIRA, A L. et al. **Study of antibacterial action of hydroalcoholic extract of propolis red on *Enterococcus faecalis*.** Revista de Odontologia da UNESP [online]. v. 43, n. 6 [Accessed 30 November 2022], pp. 359-366. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1807-2577.1005>>. ISSN 1807-2577, 2014.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N. **Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures.** J Endod; 34: 1291-1301, 2008.

SPERANDIO, F.F.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. **Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria.** Recent Pat Antiinfect Drug Discov ;8(2):108-20. doi: 10.2174/1574891x113089990012. PMID: 23550545; PMCID: PMC3740068, 2013 Aug.

STEINER-OLIVEIRA, C.; LONGO, P.L.; ARANHA, A.C.; RAMALHO, K.M.; MAYER, M.P.; de PAULA EDUARDO, C. **Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin.** J Biomed Opt. 20(10):108003. doi: 10.1117/1.JBO.20.10.108003. PMID: 26502235, 2015 Oct.

de SOUZA-E-SILVA, C.M et al. **Carbon dioxide laser and bonding materials reduce enamel demineralization around orthodontic brackets.** Laser Med Sci, v. 28, n. 1, p. 111-8, ISSN 1435-604X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22441828>>, Jan 2013.

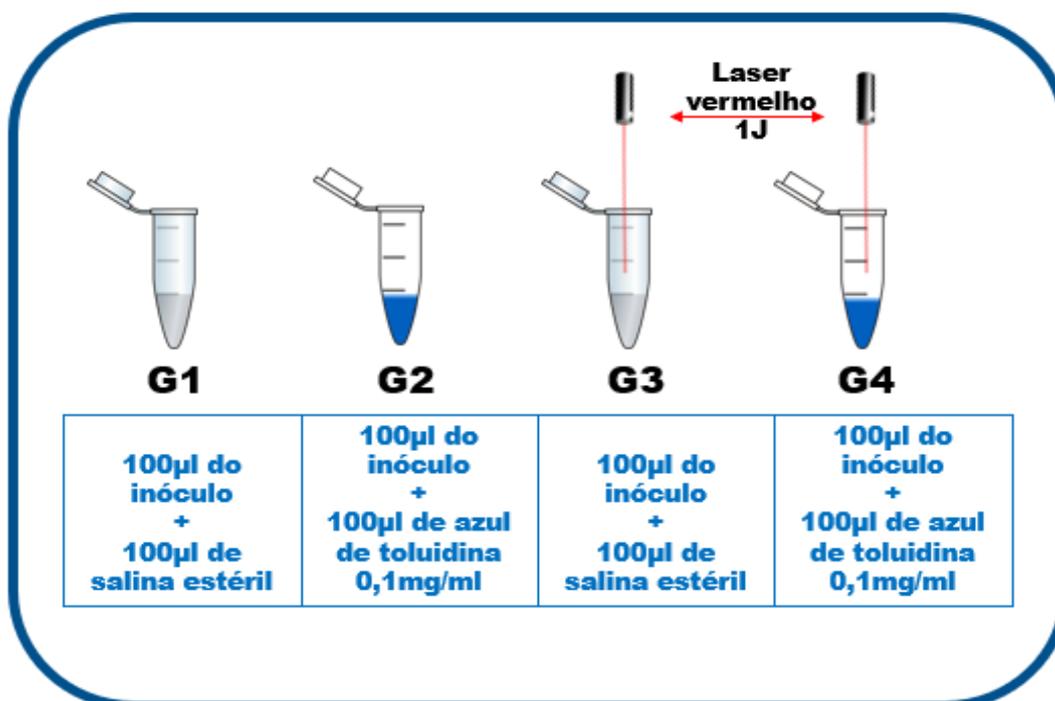
de SOUZA SILVA, T.; SILVA, J.M.B.; BRAUN, G.H.; MEJIA, J.A.A.; CCAPATINTA, G.V.C.; SANTOS, M.F.C.; TANIMOTO, M.H.; BASTOS, J.K.; PARREIRA, R.L.T.; ORENHA, R.P.; BORGES, A.; BERRETTA, A.A.; VENEZIANI, R.C.S.; MARTINS, C.H.G.; AMBRÓSIO, S.R. **Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria.** Chem Biodivers. Aug;18(8):e2100307. doi: 10.1002/cbdv.202100307. Epub 2021 Jun 22. PMID: 34086414, 2021.

TENNERT, C.; FELDMANN, K.; HAAMANN, E.; AL-AHMAD, A.; FOLLO, M.; WRBAS, K.T.; HELLWIG, E.; ALTENBURGER, M.J. **Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections.** BMC Oral Health. 14:132. doi: 10.1186/1472-6831-14-132. PMID: 25366394; PMCID: PMC4236465, Nov 2014.

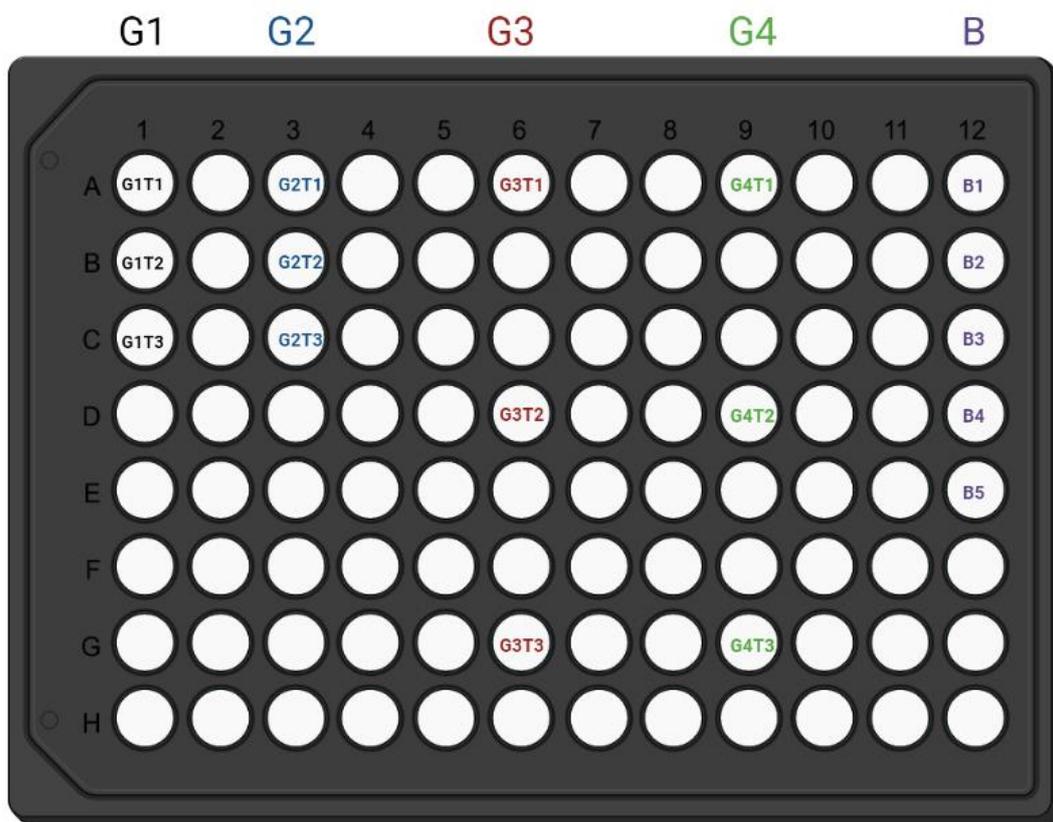
YAMASHITA, Y.; TAKESHITA, T. **The oral microbiome and human health.** J Oral Sci. 59(2):201-206. doi: 10.2334/josnusd.16-0856. PMID: 28637979, 2017.

WU, M.; XU, L.; CAI, Z.; HUANG, S.; LI, Y.; LEI, L.; HUANG, X. **Disinfection of Cariogenic Pathogens in Planktonic Lifestyle, Biofilm and Carious Dentine with Antimicrobial Photodynamic Therapy.** Photochem Photobiol. Jan;96(1):170-177. doi: 10.1111/php.13161. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31483869, 2020.

ANEXO A – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE LASERTERAPIA IN VITRO DO ESTUDO 1



ANEXO B – MAPEAMENTO DA MICROPLACA DO PROTOCOLO DE LASERTERAPIA IN VITRO DO ESTUDO 2



G1 e G3: 200 μ L de salina estéril

G2 e G4: 200 μ L de corante azul de toluidina (0,01%)

G3 e G4: 9J de laser vermelho durante 90s (DMC)

B: poços para análise do biofilme da cepa em questão

T1: triplicata 1

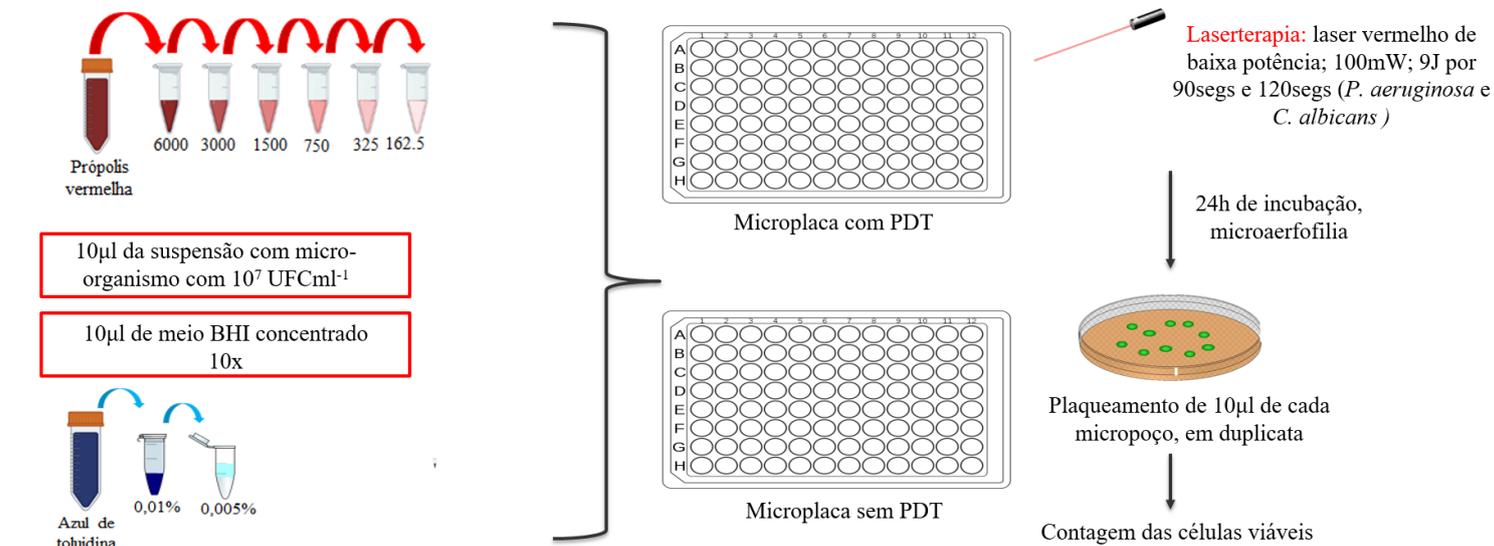
T2: triplicata 2

T3: triplicata 3

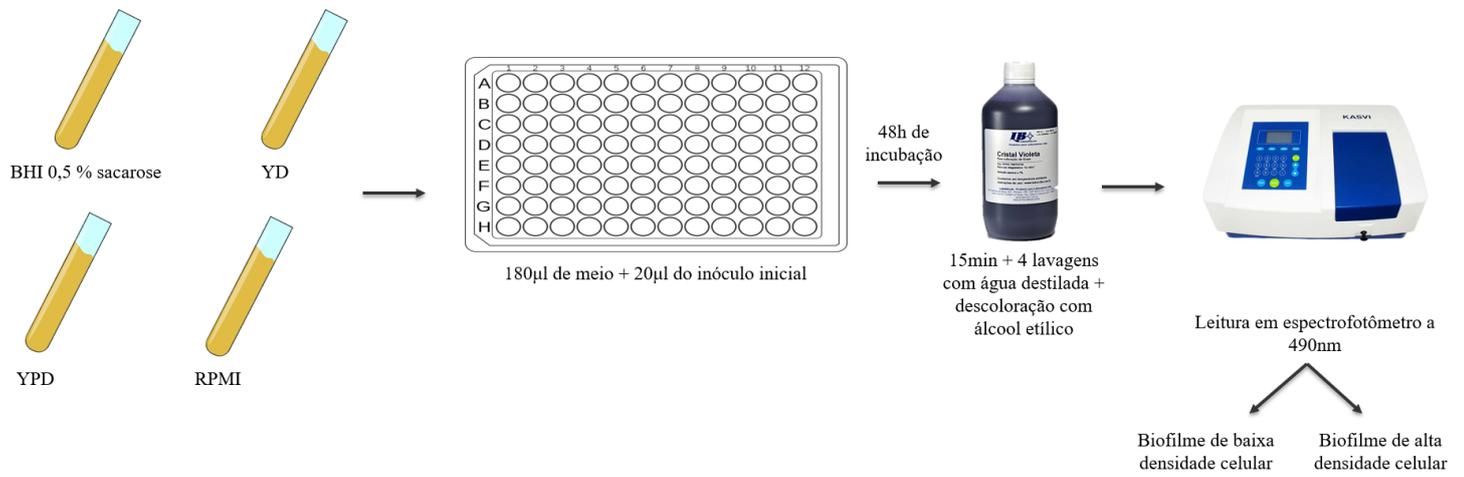
ANEXO C – MICROPLACA UTILIZADA NO ESTUDO 2



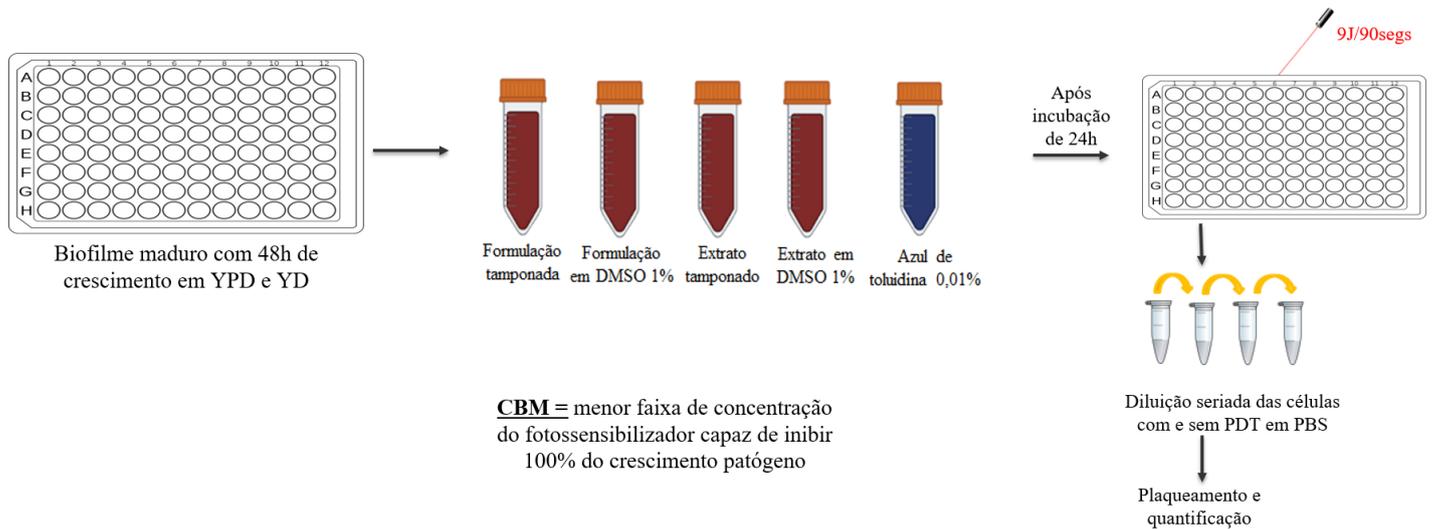
ANEXO D – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ESTUDO 3



ANEXO E – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DO MEIO MAIS ADEQUADO PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME DO ESTUDO 3



ANEXO F – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO DE PRÓPOLIS COM MAIORES ÍNDICES INIBITÓRIOS DO ESTUDO 3



**ANEXO G – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DA
CONCETRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA DO ESTUDO 3**

