



## Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas

*Effect of photodynamic therapy mediated by methylene blue in cariogenic bacteria*

João Paulo Figueiró Longo<sup>[a]</sup>, Ricardo Bentes de Azevedo<sup>[b]</sup>

<sup>[a]</sup> Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF - Brasil, e-mail: jplongo82@gmail.com

<sup>[b]</sup> Professor titular da Universidade de Brasília (UnB) – Departamento de Genética e Morfologia. Coordenador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Nanobiotecnologia do Centro-Oeste. Brasília, DF - Brasil.

---

### Resumo

**Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das alterações na concentração de fotossensibilizador e fluência de energia de irradiação de *laser* vermelho (660 nm) na viabilidade de culturas bacterianas derivadas de dentina cariada humana após a aplicação da terapia fotodinâmica (TFD) mediada pelo azul de metileno (AM). **Material e método:** Utilizaram-se culturas bacterianas derivadas de amostras de dentina cariada de pacientes e uma linhagem de *Escherichia coli*. Utilizaram-se formulações de azul de metileno nas concentrações de 25 e 50 µg/mL para a aplicação da TFD. Foi utilizada fonte de *laser* vermelho (660 nm) na potência de 40 mW com três fluências diferentes (6,8; 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup>). **Resultados:** O tratamento com AM nas duas concentrações testadas (25 e 50 µg/mL) não apresentou atividade antimicrobiana em todas as culturas bacterianas testadas. Para as culturas bacterianas derivadas de dentina cariada, a fluência de energia de 6,8 J/cm<sup>2</sup> não promoveu efeito fotodinâmico quando combinada com AM; as energias de 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup> foram efetivas na redução da carga microbiana, sendo a fluência de 61,65 J/cm<sup>2</sup> a mais indicada para a aplicação da TFD antimicrobiana. As culturas de *E. coli* foram suscetíveis à atividade antibacteriana da TFD nas três fluências de energia testadas. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a TFD mediada pelo AM nas duas concentrações testadas (25 e 50 µg/mL) e combinada com a irradiação de *laser* nas fluências de 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup>, promoveu uma diminuição significativa da carga bacteriana das culturas derivadas de amostras de dentina cariada testadas.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica. Cárie dental. Azul de metileno.

## Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy (PDT) mediated by methylene blue (MB) in two concentrations (25 e 50 µg/mL) and different red laser (660 nm) energy irradiation on bacterial suspensions derived from infected carious dentine samples. **Material and method:** Bacterial suspensions derived from infected dentine samples and *Escherichia coli* cell suspensions were used in this study. MB in two concentrations (25 e 50 µg/mL) alone or in combination with red laser (660 nm) irradiation in different energies (6,8; 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup>) were used to apply PDT in the bacterial suspensions. **Results:** MB alone had no significant antibacterial effect against the tested bacterial suspensions. In bacterial suspensions derived from infected carious dentine, MB combined with 6,8 J/cm<sup>2</sup> laser irradiation did not show the antibacterial effect of PDT. Laser irradiation with 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup> combined with MB treatment, produced a significant antibacterial effect, but 61,65 J/cm<sup>2</sup> was the most effective tested laser energy. Bacterial suspensions of *E. coli* were decreased their bacterial load in all tested laser energies. **Conclusion:** The results presented in this study suggest that PDT mediated by MB in both tested concentrations (25 e 50 µg/mL) could be used in effectively antibacterial clinical protocols in dentistry.

**Keywords:** Photodynamic therapy. Dental caries. Methylene blue.

## Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica utilizada para o tratamento de tumores superficiais e infecções locais que combina a utilização de fármacos fotossensíveis, conhecidos como fotossensibilizadores (FS), ativados por luz em comprimento de onda específico. A ativação desses FSs pela luz conduz essas moléculas a situações de grande instabilidade química que serão estabilizadas pela transferência de energia do FS às moléculas do meio. Formam-se na presença de oxigênio, íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs). A liberação dessas EROs promove o efeito citotóxico da TFD sobre as células-alvo (1-3).

Existem publicações a respeito da TFD desde o início do século XX, porém, somente no final de 1980 aplicou-se efetivamente essa tecnologia na saúde humana; primeiramente no tratamento de tumores malignos superficiais e, em seguida, no tratamento de infecções locais, fúngicas e bacterianas. Na odontologia, a TFD já foi utilizada como tratamento de lesões pré-malignas de mucosa, como adjuvante na terapêutica periodontal e endodôntica, bem como no tratamento de prevenção da cárie (3).

Para o tratamento de infecções bucais, os derivados de fenotiazinas, azul de metileno e azul de

toluidina foram os fármacos fotossensibilizadores mais estudados na literatura. Diversos estudos clínicos relataram a aplicação da TFD, mediada por FSs, no tratamento de periodontite e na descontaminação endodôntica. No entanto, existe certa dificuldade na comparação desses artigos pelo fato de que os padrões utilizados na TFD, como concentração de fotossensibilizador, variam desde 5 µg/mL (4) até 10 mg/mL (5-7), além do tipo e da dose de energia luminosa serem geralmente diferentes (1).

Com relação aos estudos *in vitro* e *ex vivo* que avaliam a efetividade da TFD sobre bactérias cariogênicas, a grande variância de padrões de dosimetria e concentração de FS torna a comparação entre os estudos complexa (8-11). Dentro desse contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência das alterações na concentração de fotossensibilizador e na fluência de energia de irradiação de *laser* vermelho (660 nm) na viabilidade de culturas bacterianas derivadas de dentina cariada humana após a aplicação da TFD mediada pelo azul de metileno. Os principais achados deste estudo são que ambas as concentrações testadas, 25 e 50 µg/mL, foram efetivas na geração de efeito bactericida fotodinâmico contra as culturas bacterianas testadas. Quanto às fluências de energia testadas, a energia de 61,65 J/cm<sup>2</sup> apresentou os melhores efeitos bactericidas quando combinada com as soluções fotossensibilizadoras de azul de metileno.

## Material e método

### Solução fotossensibilizadora e fonte do *laser*

As soluções de azul de metileno (25 e 50 µg/mL) foram preparadas separadamente em concentrações iniciais de 250 e 500 µg/mL de azul de metileno diluídas em álcool absoluto. Essas soluções iniciais foram diluídas em solução tampão (fosfato) para atingir as concentrações finais de 25 e 50 µg/mL respectivamente. Utilizou-se equipamento emissor de *laser* vermelho (MMOptics™, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm e potência máxima de saída de 40 mW.

### Culturas bacterianas derivadas de dentina cariada e *E. coli*

Para o estabelecimento de culturas derivadas de amostras de dentina cariada, pacientes em tratamento para remoção de tecido cariado foram devidamente informados sobre a coleta das amostras e seus respectivos objetivos. Como forma de formalizar essas informações, os pacientes assinaram um termo de compromisso livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 068/2008).

Raspas de dentina cariada obtidas de lesões de cárie de dois pacientes foram coletadas e imediatamente inseridas em um Eppendorf contendo 1 mL de meio de cultura BHI (Brain-Hearth-Infusion, Sigma™) líquido. As amostras foram transportadas para o laboratório (tempo médio de 60 minutos), o conteúdo agitado em sistemas de agitação Vortex™ por 60 segundos e o sobrenadante transferido para um tubo Falcon contendo 10 mL de meio BHI líquido. Essa cultura foi mantida sob agitação (200 rpm) por 48 horas a 37 °C em estufa com Shaker (Certomat - Biotech International™).

Separaram-se amostras dessa cultura em tubos Eppendorfs contendo 1 mL, com aproximadamente 10<sup>9</sup> células/mL e mantidas em geladeira (4 °C) para utilização em um período máximo de três semanas. Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultravioleta permaneceu ligada por 25 minutos antes do uso.

Utilizaram-se culturas bacterianas de *E. coli*, linhagem ATCC BL21 (DE3) (bactéria gram-negativa), mantidas em cultura sob condições idênticas às utilizadas para as culturas de amostras de dentina cariada.

### Terapia fotodinâmica sobre culturas bacterianas

Para a aplicação da TFD, amostras (1 mL) de cultura bacteriana contendo aproximadamente 10<sup>9</sup> células/mL (OD = 0,8) foram centrifugadas (3000 rpm/3 minutos) para remoção do excesso de meio de cultura. Removeu-se o sobrenadante de meio de cultura, adicionando-se 1 mL de solução de azul de metileno de 25 ou 50 µg/mL ao tubo de ensaio contendo o *pellet* bacteriano. Manteve-se conjunto sob agitação de 200 rpm em estufa com Shaker (Certomat - Biotech International™) a 37 °C durante 5 minutos para a internalização do azul de metileno pelas células bacterianas. Para os grupos controle, a solução de azul de metileno foi substituída por tampão fosfato estéril.

Após o período de internalização, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, com a finalidade de remover o sobrenadante de tampão fosfato ou fotossensibilizador. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato com descarte de 900 µL, bem como foram ressuspensos os 100 µL restantes em 1000 µL de tampão fosfato estéril. Essa diluição objetivou atingir concentração de aproximadamente 10<sup>6</sup> bactérias/mL. Em placa de 96 poços essas suspensões bacterianas em tampão fosfato foram plaqueadas. Cada poço refere-se a um diferente grupo experimental, recebendo 200 µL da suspensão. A distribuição separada dos poços tem por objetivo minimizar os efeitos da irradiação com *laser* nos diferentes grupos experimentais. Apresenta-se, na Figura 1, sequência de tratamento dos diferentes grupos experimentais.

Realizou-se a dosimetria da energia aplicada para as culturas bacterianas tomando por base a área superficial de um poço de uma placa de cultura de 96 poços (~ 0,35 cm<sup>2</sup>); a variação da energia é determinada pelo tempo de exposição. As energias utilizadas neste estudo correspondem à energia de 1, 3 ou 9 minutos de irradiação (Figura 2).

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Grupo experimental	Poço	Internalização AM - 5 minutos	Laser (660 nm) (40mW)
Controle	A1	PBS	—
AM 25 ou 50 µg/mL	B1	AM 25 ou 50 µg/mL	—
AM (25 ou 50 µg/mL) + laser	A12	AM 25 ou 50 µg/mL	1 minuto = 6,8 J/cm <sup>2</sup>
AM (25 ou 50 µg/mL) + laser	H1	AM 25 ou 50 µg/mL	3 minutos = 61,65 J/cm <sup>2</sup>
AM (25 ou 50 µg/mL) + laser	D6	AM 25 ou 50 µg/mL	9 minutos = 20,55 J/cm <sup>2</sup>

**Figura 1** - Esquema de aplicação da terapia fotodinâmica nas suspensões bacterianas com os respectivos tratamentos experimentais. Utilizou-se uma placa de 96 poços separada para cada cultura bacteriana e para cada concentração de AM

(a) Dose: 
$$\frac{P \text{ (W)} \times t \text{ (s)}}{\text{área do poço}} = \text{p. ex. } \frac{0,04 \text{ (W)} \times 60 \text{ (s)}}{0,35 \text{ (cm}^2\text{)}} = 6,85 \text{ J/cm}^2$$

Onde P (W) do laser é fixa: 40 mW = 0,04 W; área do poço é fixa: 0,35 cm<sup>2</sup>

(b)

1 minuto	~ 6,85 J/cm <sup>2</sup>
3 minutos	~ 20,55 J/cm <sup>2</sup>
9 minutos	~ 61,65 J/cm <sup>2</sup>

**Figura 2** - (a) Fórmula para a determinação da dose de energia utilizada nos experimentos. (b) Referência da densidade de energia aplicada nos diferentes tempos de aplicação de *laser*

### Quantificação bacteriana por meio de contagem de unidades formadoras de colônias

Após a aplicação dos tratamentos, as suspensões bacterianas foram diluídas em PBS (1:10), em seguida plaqueadas (300  $\mu$ L) em placas de Petri contendo meio BHI-Agar. As suspensões bacterianas foram espalhadas nas placas de petri com auxílio de esferas de vidro autoclavadas. As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 37 °C. Após 24 horas de incubação, retiraram-se as placas da estufa para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para cada grupo experimental, foram preparadas três placas (n = 3). Repetiu-se o conjunto de experimentos duas vezes para confirmação dos resultados.

### Análise estatística

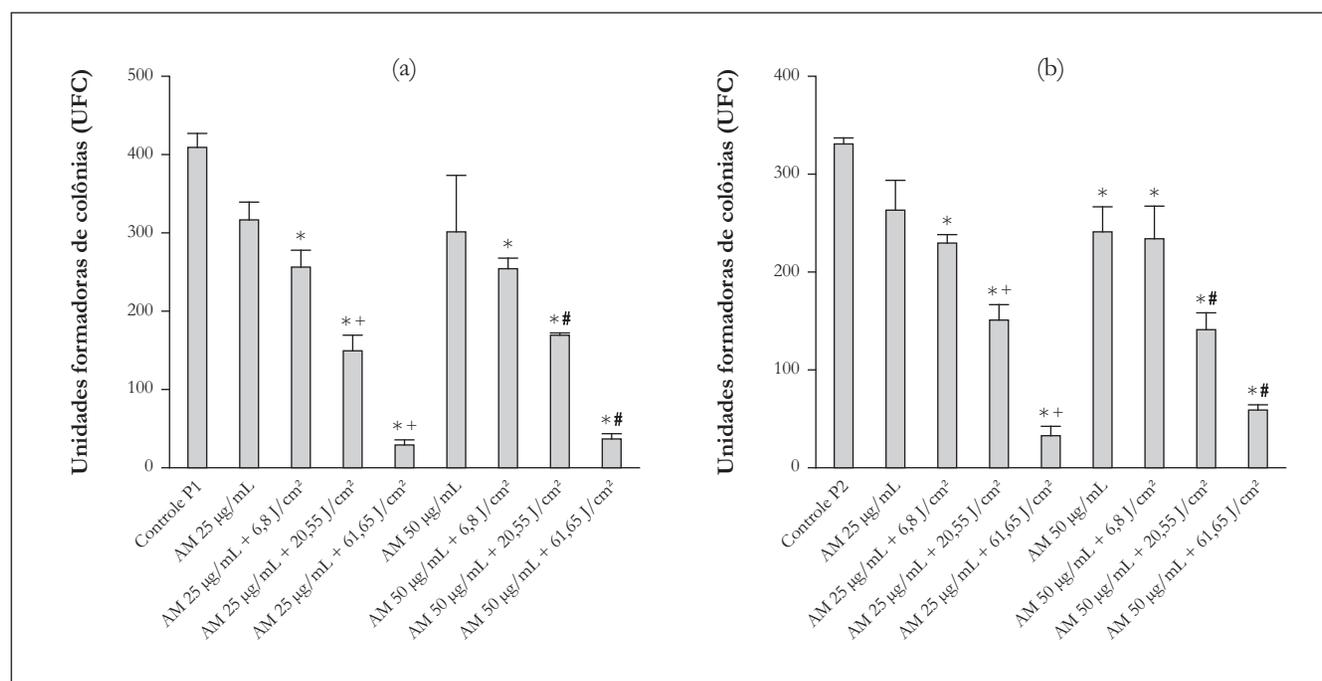
Calculou-se a média e o desvio-padrão dos valores obtidos na contagem das UFC nas três placas de cada grupo experimental e analisaram-se

as diferenças entre esses valores pelos testes de ANOVA e Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para o valor de  $p < 0,001$ .

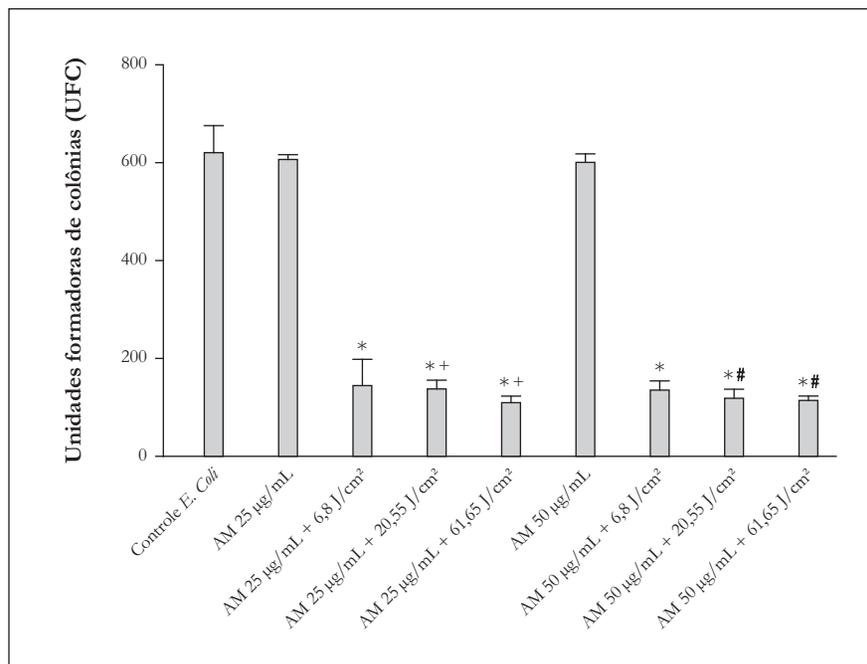
### Resultados e discussão

A Figura 3 mostra os resultados obtidos na contagem das UFC das culturas bacterianas derivadas de dentina cariada das amostras dos dois pacientes utilizadas neste estudo (P1 e P2). A Figura 4 mostra os resultados das culturas de *E. coli* após os respectivos tratamentos experimentais (*E. coli*).

O tratamento com as soluções de azul de metileno testadas (25 e 50  $\mu$ g/mL) isoladamente não apresentaram efeito citotóxico nas culturas bacterianas. A redução da carga bacteriana foi significativa quando o tratamento com AM nas duas concentrações (25 e 50  $\mu$ g/mL) foi combinado com irradiação *laser* na fluência de 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup>. A TFD (25 e 50  $\mu$ g/mL) com 6,8 J/cm<sup>2</sup> não foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana em comparação ao tratamento com AM sozinho.



**Figura 3** - Atividade antimicrobiana em diferentes concentrações e com diferentes fluências de irradiação de laser sobre culturas bacterianas derivadas de amostras de dentina cariada. Cultura bacteriana P1 (a) e P2 (b). \*Representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) ao controle P1 e P2. +Representa diferença significativa ao AM 25  $\mu$ g/mL. # Representa diferença significativa ao AM 50  $\mu$ g/mL.

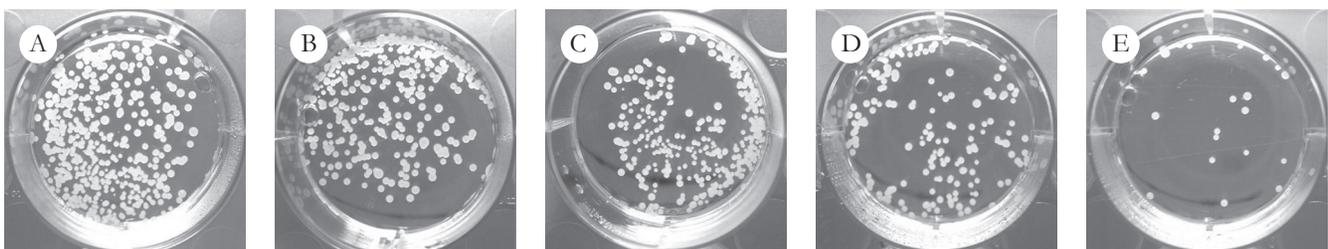


**Figura 4** - Atividade antimicrobiana em diferentes concentrações e com diferentes fluências de irradiação de *laser* sobre culturas bacterianas de *E. coli*. \*Representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ) ao controle

Os resultados apresentados na Figura 3 (b) (P2) são semelhantes aos descritos para P1, onde a combinação de AM nas duas concentrações testadas (25 e 50 µg/mL) com *laser* promoveu a redução significativa da viabilidade bacteriana com as fluências de 20,55 J/cm<sup>2</sup> e 61,65 J/cm<sup>2</sup>. O tratamento com AM sozinho foi diferente significativamente do controle somente na concentração de 50 µg/mL. A TFD com 6,8 J/cm<sup>2</sup> não promoveu a redução da viabilidade bacteriana em comparação ao tratamento com AM sozinho nas duas concentrações testadas.

Os dados de contagem de UFC para *E. coli* após os tratamentos experimentais, apresentados na Figura 4, mostra que o tratamento sozinho com AM nas duas concentrações testadas não foi bactericida e que a combinação com irradiação *laser* nas três fluências testadas (6,8; 20,55 e 61,65 J/cm<sup>2</sup>) promoveu uma redução significativa na contagem de UFC.

Algumas imagens representativas das placas de cultura com diferentes números de UFC apresentadas pelas culturas bacterianas após os respectivos tratamentos são mostradas na Figura 5.



**Figura 5** - Placas de cultura com diferentes números de UFC apresentadas pelas culturas bacterianas após os respectivos tratamentos. (a) Controle; (b) AM (25 ou 50 µg/mL); (c) TFD (AM + 6,8 J/cm<sup>2</sup>); (d) TFD (AM + 20,55 J/cm<sup>2</sup>); (e) TFD (AM + 61,65 J/cm<sup>2</sup>)

Estes resultados sugerem que as duas concentrações de AM testadas, 25 e 50 µg/mL, foram efetivas na aplicação da TFD contra as culturas bacterianas derivadas de amostras de dentina cariada. Das três doses de energia de luz testadas, a que promoveu o melhor efeito bactericida foi 61,65 J/cm<sup>2</sup>, quando combinada com as soluções fotossensibilizadoras de AM testadas. Esses resultados podem ser úteis para fundamentar protocolos de aplicação clínica da TFD em lesões cáries e para outros tipos de infecções bucais. Sendo técnica indolor, não invasiva e sem efeitos colaterais importantes, a TFD apresenta potencial de aplicação como forma de tratamento antimicrobiano mais confortável e efetiva aos pacientes (3).

A TFD com finalidades antimicrobianas é alternativa promissora para o controle de infecções locais na prática médica e odontológica (12-14). Apresenta como possíveis vantagens a limitação de alguns efeitos adversos comuns a outros métodos antimicrobianos, aplicação simples e rápida, largo espectro de atuação antimicrobiana, custo relativamente baixo e segurança de aplicação em pacientes imunossuprimidos. (15).

Diversos estudos já demonstraram a efetividade da aplicação da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno em diferentes linhagens de culturas bacterianas isoladas (4, 16-18); recentemente, estudos têm sido realizados com suspensões bacterianas mais complexas, com mais de uma espécie bacteriana presente (8, 19). Comparações entre os resultados obtidos nas culturas de amostras de dentina (Figuras 3) e de *E. coli* (Figura 4), demonstram que as culturas isoladas de *E. coli* foram mais suscetíveis ao efeito antimicrobiano da TFD mediada pelo azul de metileno. Esses resultados sugerem que existem espécies bacterianas nas amostras de dentina cariada com diferentes níveis de suscetibilidade aos efeitos da TFD mediada pelo AM.

A ideia de utilizar amostras polimicrobianas, em vez de linhagens isoladas, é mimetizar as infecções observadas na clínica, em que sempre estão presentes amostras formadas por diferentes espécies bacterianas. A associação dessas diferentes espécies na formação de biofilmes é extremamente importante para o desenvolvimento de resistência bacteriana a protocolos antibióticos. Uma espécie bacteriana pode se tornar mil vezes mais resistente ao efeito antimicrobiano de uma substância quando estiver associada em comunidades microbianas (8, 19). Os

mecanismos envolvidos nesse processo de resistência passam desde a proteção física da comunidade até a inativação enzimática das moléculas antimicrobianas por outras espécies presentes no biofilme.

A TFD é a combinação entre fármacos fotossensibilizadores e luz em comprimento de onda específico. As concentrações de AM testadas (25 e 50 µg/mL) não apresentaram diferenças no desenvolvimento do efeito bactericida. Em contrapartida, as três doses de energia testadas apresentaram diferentes citotóxicos para as culturas bacterianas testadas. O padrão de geração de EROs e, conseqüentemente, o efeito bactericida de TFD é específico para cada tipo de fármaco FS. Das três fluências de energia testadas nesse estudo (6,85; 20,55; 61,65 J/cm<sup>2</sup>) a de 61,65 J/cm<sup>2</sup> foi a mais efetiva, porém, as menores doses de energia também promoveram o efeito fotodinâmico do AM contra as culturas bacterianas testadas. O aumento da fluência de energia promove um aporte maior de fótons na região-alvo que irão interagir de maneira mais intensa com as moléculas de AM e, conseqüentemente, gerar uma cascata de EROs maior e por final um efeito bactericida mais pronunciado (9, 20).

Para a aplicação no tratamento de lesões cáries, a produção de radicais livres – e a conseqüente citotoxicidade para células bacterianas – não são os únicos efeitos biológicos observados quando drogas fotossensíveis são combinadas com a iluminação de *laser* vermelho em baixa potência. A aplicação de *laser* em baixa potência nas lesões profundas de cárie também tem sido levantada como uma metodologia para induzir a regeneração do tecido pulpar por meio da biomodulação positiva desse tecido. Os mecanismos de biomodulação ligada à aplicação de *laser* relacionam-se com a estimulação da atividade de citocromos mitocondriais fotossensíveis, responsáveis pela síntese de ATP e conseqüente estimulação das mais diversas atividades celulares (21-23).

Os resultados apresentados neste estudo corroboram outros apresentados na literatura, mostrando que a TFD mediada pelo AM é efetiva na diminuição da carga bacteriana de culturas de *E. coli* e de culturas polimicrobianas derivadas de amostras de dentina cariada. As duas concentrações de AM testadas (25 e 50 µg/mL) mostraram-se efetivas e a energia de *laser* que apresentou os melhores resultados na indução da TFD foi a de 61,65 J/cm<sup>2</sup>.

Esses resultados, juntamente com os diversos estudos da literatura, sugerem boas perspectivas

para a formulação de protocolos clínicos adequados para o tratamento de lesões cariosas e outras formas de infecções bucais com a terapia fotodinâmica.

### Conflito de interesses

Os autores declaram formalmente que não há conflito de interesses no presente artigo.

### Referências

1. Aristeo AT, Akira A, Koji M, Frank S, Anton S, Chen-Ying W, et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontology* 2000. 2009;51(1):109-140.
2. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;17(3):245.
3. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci*. 2007;22(2):83-91.
4. Araújo PV, Teixeira KI, Lanza LD, Cortes ME, Poletto LT. In vitro lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoamericana: AOL*. 2009;22(2):93.
5. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):877-84.
6. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2009;24(5):681-8.
7. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008;79(9):1638-44.
8. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res*. 2009;44(6):751-9.
9. Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomedicine Laser Surg*. 2008;26(4):281-7.
10. Lima JPM, de Melo MAS, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, dos Santos MN, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*. 2009;117(5):568-74.
11. Zanin ICJ, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrobial Chemoth*. 2005;56(2):324-30.
12. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysical and photochemical studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. *Eur J Pharm Sci*. 2004;23(2):131-8.
13. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dental Res*. 2007;86(8):694.
14. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera Jr. A, Teodoro GR, Zangaro 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.
15. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Photochem Photobiol B*. 2005;79(2):159-70.
16. Ferro S, Ricchelli F, Mancini G, Tognon G, Jori G. Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83(2):98-104.
17. George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*. 2008;84(3):734-40.
18. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(1):190-2.
19. Street CN, Gibbs A, Pedigo L, Andersen D, Loebel NG. In vitro photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture. *Photochem Photobiol*. 2009;85(1):137-43.

20. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2005;2(3):175-91.
21. Gao X. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009;16(1):4.
22. Tuby H, Maltz L, Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):227-33.
23. Skopin MD, Molitor SC. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermato Photoimmunol Photomed*. 2009;25(2):75-8.

Recebido: 01/15/2010

*Received:* 15/01/2010

Aprovado: 05/05/2010

*Approved:* 05/05/2010