

UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM BIOENGENHARIA

MOHAMED ABDUL KARIM SALEH

**TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM AZUL DE
METILENO E UREIA EM *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

Antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue and urea in *Escherichia coli*
and *Staphylococcus aureus*.

SÃO PAULO

2020

MOHAMED ABDUL KARIM SALEH

TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM AZUL DE METILENO E UREIA EM *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial photodynamic therapy with methylene blue and urea in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro

Co orientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Núñez

Trabalho final de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, como complementação de créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

SÃO PAULO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S155t SALEH, Mohamed Abdul Karim
Terapia fotodinâmica antimicrobiana com azul de metileno e ureia em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* / Mohamed Abdul Karim Saleh. - São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
35 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro.
Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Cristina Nuñez.
Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós- graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil.

1. Antimicrobiano. 2. Azul de metileno. 3. Terapia Fotodinâmica. 4. Ureia. I. Navarro, Ricardo Scarparo. II. Nuñez, Silvia Cristina. III. Título.

CDD 620.82

**FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E BANCO DE TESES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO
TRABALHO**



Termo de Autorização

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página
WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses
da CAPES**

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

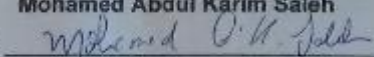
A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA
COM AZUL DE METILENO E UREIA EM *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS – ESTUDO *IN VITRO*"

Houve alteração do Título: sim () não (X)

Autor(es):

Discente: **Mohamed Abdul Karim Saleh**

Assinatura: 

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Ricardo Scarparo Navarro**

Assinatura: 

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 30/03/2020

TERMO DE APROVAÇÃO



TERMO DE APROVAÇÃO

MOHAMED ABDUL KARIM SALEH

"EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA COM AZUL DE METILENO
E UREIA EM *ESCHERICHIA COLI* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* – ESTUDO *IN*
VITRO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Ricardo Scarparo Navarro (presidente-orientador)

Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a) Dr.(a) Angela Toshie Araki (UNICSUL)

São Paulo, 30 de março de 2020.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Ricardo Scarparo Navarro

Houve alteração do Título: sim () não (X)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha esposa Maria Paula por toda a ajuda, dedicação, incentivo e compreensão pelos momentos ausentes devido à elaboração deste trabalho.

Ao meu filho Lorenzo, que mesmo com a pouca idade, soube compreender quando não pude dar atenção pelo tempo que merecia.

A minha mãe que sempre me incentivou aos estudos ao lado do meu pai, que mesmo não estando presente fisicamente, me ajudou com seu legado.

Aos meus irmãos, sobrinhos, amigos próximos, colegas de trabalho e de curso e alguns pacientes, o meu obrigado pelo apoio e pelas dicas.

Agradeço à todos os professores que durante o curso de Mestrado em Bioengenharia me incentivaram e me passaram seus ricos conhecimentos.

Agradecimento especial ao meu querido orientador Ricardo S. Navarro na qual criei uma amizade e fez com que eu me tornasse um profissional mais habilitado para a execução de pesquisa científica, abrindo novos caminhos para a minha carreira profissional.

Agradecimento especial também à professora, coordenadora e coorientadora Sílvia que tornou esse trabalho viável, colocando suas ideias e dando as diretrizes para a sua elaboração; além do grande incentivo, desde o início, à pesquisa. Parabéns ao grande trabalho que executa no comando do curso, sendo uma inspiração.

Não posso deixar de agradecer também a professora Alessandra por toda ajuda prestada, principalmente na parte laboratorial. Sua ajuda metodológica foi fundamental para a execução do trabalho.

E agradecer a professora Amanda por todas as dicas durante a fase de construção do projeto, pela ajuda material e pelo incentivo na busca de conhecimento.

Agradeço imensamente a Silvana por toda ajuda na execução do experimento, por sua paciência, por todo trabalho que foi fundamental. Parabéns por sua dedicação, servindo de inspiração na aplicação laboratorial.

Obrigado também a Sara pelas tarefas cumpridas, por sua vontade e empenho!

Obrigado ao Marcio que se esforçou ao máximo para termos toda a estrutura e sempre buscou meios e alternativas para a conclusão do experimento.

Obrigado Dênis pela força, ajuda e incentivo. Com você o trabalho foi mais produtivo e divertido.

Agradeço a Universidade Brasil pela Bolsa que me fez permitir cursar o Mestrado de Bioengenharia e me deu meios para o desenvolvimento do presente trabalho.

Obrigado aos funcionários do Instituto que sempre foram solícitos.

CONTEXTO DO ESTUDO NO PROGRAMA

Dissertação do Programa de Mestrado em Bioengenharia relacionada a área de concentração **Fotobiomodulação, biomarcadores e sistemas de diagnóstico**, tendo como linha de pesquisa: **Agentes eletrofísicos em saúde** como parte do projeto: **Processos oxidativos avançados. Relevância para a Bioengenharia**: O presente estudo propõe comparar *in vitro* a eficácia do processo de descontaminação em pontas diamantadas odontológicas utilizando a aPDT, com azul de metileno associado ou não a ureia e laser vermelho em microrganismos em suspensão, sendo uma prova de conceito para determinar uma metodologia com excelência em novos experimentos *in vitro* e posteriormente *in vivo*. A terapia fotodinâmica por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e processos oxidativos promove efetiva ação antimicrobiana em diferentes campos da Saúde, mostrando as possibilidades de aplicações da Fotônica e dos processos oxidativos avançados como campo de estudo da Bioengenharia aplicada as diferentes áreas da saúde. .

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é a técnica na qual um agente fotossensibilizador (FS) na presença de oxigênio é ativado por uma luz de comprimento de onda específico, ressonante ao FS, gerando pelo processo fotodinâmico radicais livres e espécies reativas de oxigênio que são citotóxicos para as células alvo, promovendo a morte microbiana por dano oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da aPDT utilizando azul de metileno (MB) e MB com ureia em bactérias gram negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) e gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em suspensão, para avaliar a ação desagregadora da ureia em FS fenotiazínicos. Pontas diamantadas odontológicas esterilizadas foram contaminadas após serem colocadas dentro de tubos de ensaio contendo uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL de *E. coli* e de *S. aureus* em suspensão, e mantidas por 16 h (*over night*) em estufa bacteriológica para cultivo a 37°C. Após contaminação, as pontas foram divididas em três grupos (n= 9): Grupo MB (MB + laser vermelho); Grupo UMB (MB aditivado de ureia + laser vermelho); Grupo CST (controle sem tratamento). As pontas contaminadas foram depositadas em tubos Eppendorf contendo solução aquosa de MB (60 µM) para o grupo MB e MB diluído em solução aquosa de ureia (60 µM) para o grupo UMB. Após 1 minuto de tempo de pré-irradiação foi realizada a irradiação com laser de baixa potência vermelho com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, perpendicular e em contato com o tubo por 3 minutos (um minuto e meio por cima e o mesmo tempo por baixo), sendo entregue 18 J de energia total. Os resultados apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC/ml) mostraram que os grupos MB e UMB apresentam estatisticamente superior redução microbiana comparados ao grupo CST ($p < 0,05$) para as bactérias Gram negativa (*E. coli*) e gram positiva (*S. Aureus*) em suspensão. A redução microbiana do grupo com ureia (UMB) não foi estatisticamente superior que o grupo sem ureia (MB) para ambos microrganismos em suspensão ($p > 0,05$). Portanto, pode-se concluir que a aPDT com MB e UMB promoveram efetiva ação antimicrobiana, e o fator de desagregação que a ureia promove em FS fenotiazínicos, nesse experimento *in vitro* não foi determinante para reduzir a quantidade de microrganismos em suspensão.

Palavras chave: Antimicrobiano, azul de metileno, Terapia fotodinâmica, ureia.

ABSTRACT

Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) is the technique in which a photosensitizing agent (FS) in the presence of oxygen is activated by a light of specific wavelength, resonating with the FS, generating free radicals and reactive oxygen species through the photodynamic process that are cytotoxic to target cells, promoting microbial death from oxidative damage. The objective of this study was to evaluate the efficiency of aPDT using methylene blue (MB) and MB with urea (UMB) in the gram negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and in the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in suspension, to evaluate the urea disintegrator action in phenothiazine FS. Sterilized diamond burs for dental use were contaminated after being placed in test tubes containing an approximate concentration of 10^8 CFU/mL of *E. coli* and *S. aureus*, and left for 16 hours (over night) in a bacteriological incubator for cultivation at 37°C . After contamination, the tips were divided into three groups (n= 9): Group MB (group treated with MB + red laser); UMB Group (Treatment group with MB plus urea + red laser); C Group (control group without treatment). The contaminated tips were deposited in Eppendorf tubes containing $60\ \mu\text{M}$ aqueous MB solution for the MB group and MB diluted in $60\ \mu\text{M}$ aqueous urea solution for the UMB group. After 1 minute of pre-irradiation time, irradiation was performed with a red laser with a wavelength of 660 nm, power of 100 mW, perpendicular and in contact with the tube for 3 minutes (one and a half minutes above and the same time for low), with 18 J of total energy being delivered. The results presented in colony-forming units (CFU/ml) showed that the MB and UMB groups showed a significantly higher reduction of microorganisms compared to the C group ($p < 0.05$), both in Gram negative (*E. coli*) and gram positive bacteria (*S. aureus*) in suspension. The microbial reduction of the urea group (UMB) was not significantly higher than the group without urea (MB) in both microorganisms in suspension ($p > 0.05$). Therefore, it can be concluded that aPDT with MB and UMB promoted effective antimicrobial action in the evaluated microorganisms in suspension, the disintegration factor that urea promotes in phenothiazine FS, in this in vitro study was not decisive to reduce the amount of microorganisms in suspension.

Keywords: Antimicrobial, methylene blue, photodynamic therapy, urea.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃOpág. 14
2. HIPÓTESEpág. 17
3. OBJETIVOpág. 18
4. ARTIGOpág. 19
5. CONCLUSÃOpág. 33
REFERÊNCIASpág. 34
ANEXO Apág. 37
ANEXO Bpág. 38
ANEXO Cpág. 39

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês *Antimicrobial Photodynamic Therapy- aPDT*), é utilizada para o tratamento oncológico e terapia antimicrobiana, mostrando-se um método eficaz por meio de processos oxidativos. Vantagens como a alta seletividade aos tecidos alvo, o não desenvolvimento de resistência microbiana com doses repetidas [1], a capacidade de eliminar microrganismos rapidamente, segurança no uso, facilidade de aplicação, ausência de sintomatologia dolorosa e ausência de efeitos colaterais térmicos tem encorajado a utilização da aPDT para uma grande variedade de aplicações clínicas [2].

A aPDT é a técnica na qual um agente fotossensibilizante, denominado fotossensibilizador (FS), é ativado por uma luz de comprimento de onda específico ressonante ao FS, desencadeando a produção de oxigênio singlete, superóxidos e radicais livres (espécies reativas de oxigênio), que são citotóxicos para as células alvo [3, 4]. Esta modalidade de tratamento é também denominada quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana, desinfecção foto-ativada ou desinfecção ativada pela luz.

A produção de espécies reativas de oxigênio é caracterizada pelo consumo fotoquímico de oxigênio [5] e ocorre pela indução de dois tipos de reações. Na reação tipo I há transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de diferentes tipos de radicais livres, superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, enquanto que, na reação tipo II, há transferência de energia ao oxigênio pela mudança no *spin* do elétron, levando à produção de oxigênio singlete ou superóxido, que são espécies altamente reativas [6]. Ambas levam à morte celular pela oxidação de moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos [7].

A ação da aPDT se estende a bactérias, fungos, leveduras, vírus e protozoários, dependendo do FS e da fonte de luz utilizada sendo, portanto, de grande utilidade no combate a infecções localizadas [8]. No entanto, a terapia tem ação diferente sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido às diferenças estruturais nas paredes celulares. As primeiras são mais suscetíveis a eliminação pela aPDT. As bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa complexa, com duas camadas lipídicas que atuam como uma barreira

entre a célula e o ambiente, o que dificulta sua morte [5].

O sucesso da aPDT está diretamente relacionado à utilização do FS, cuja escolha depende da fonte de luz utilizada. Mais de 400 compostos entre corantes, drogas, substâncias químicas ou naturais apresentam propriedades fotossensibilizadoras [5, 9]. Dentre as principais substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com potencial fotoativo estão os corantes fenotiazínicos, as fitalocianinas, as clorinas, as porfirinas, os xantenos e os monoterpênicos [10]. Para ser considerado ideal, este composto precisa possuir características foto físicas, químicas e biológicas favoráveis, baixa citotoxicidade, simplicidade na formulação, alta estabilidade, solubilidade em meio aquoso, afinidade e capacidade de penetração nas células bacterianas, alto coeficiente de absorção na região do espectro de excitação da luz, capacidade de transferir energia para gerar espécies reativas de oxigênio e foto estabilidade elevada [4], além de possuírem ação local [10] e apresentarem um intervalo de tempo curto entre o período de administração e o máximo de absorção pelo tecido [11].

Os corantes fenotiazínicos, cuja estrutura fundamental é composta por um anel aromático tricíclico, como o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT), são os mais utilizados e amplamente estudados para a realização da terapia fotodinâmica [1, 8] e são ativados pela luz no espectro de 620 a 700 nm (comprimento de onda vermelha) [4, 8]. O AM e o AT apresentam características químicas e físico-químicas semelhantes, com natureza hidrofílica, baixo peso molecular e carga positiva que facilita a passagem pela parede bacteriana [4], induzindo danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos [12]. O AT apresenta como vantagem adicional uma afinidade pelo lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas sendo, em geral, mais efetivo que o AM.

A adição de ureia a formulações aquosas de FS poderia melhorar a eficiência de fotos sensibilizadores fenotiazínicos [13] devido as suas características que levam a desagregação do FS pois o AM tende a se agregar, interferindo negativamente na geração de oxigênio singlete [14, 15]. A ureia enfraquece as ligações hidrofóbicas, altera a constante dielétrica e aumenta a tensão superficial da água, que geralmente causa uma diminuição nas interações substrato-substrato, como aqueles encontrados em pares de íons. A ureia estabiliza os monômeros da solução (e conseqüentemente reduz concentração de dímero) do AM, permitindo aPDT ser mais eficiente em *Candida albicans* [13].

Este estudo propõe avaliar *in vitro* a eficácia do processo de descontaminação com AM e AM com ureia em pontas diamantadas odontológicas utilizando aPDT com Laser Vermelho em bactéria gram negativa *E. coli* e em bactéria gram positiva *S. aureus* em suspensão, sendo uma prova de conceito para determinar uma metodologia mais apurada em novos experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a adição de ureia ao azul de metileno aumente a eficiência do FS fenotiazínico.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da aPDT utilizando AM e AM com ureia em microrganismos.

Objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência do AM e do AM com ureia na bactéria gram negativa *E. coli*;
- Avaliar a eficiência do AM e do AM com ureia na bactéria gram positiva *S. aureus*.

4. ARTIGO

Introdução

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é a técnica na qual um agente fotossensibilizante, denominado fotossensibilizador (FS), na presença de oxigênio é ativado por uma luz de comprimento de onda específico ressonante ao FS, desencadeando pela reação fotodinâmica a produção de oxigênio singlete, superóxidos e radicais livres (espécies reativas de oxigênio-ROS), que são citotóxicos para as células alvo [1]. A produção de espécies reativas de oxigênio é denominada consumo fotoquímico de oxigênio [2] e ocorre pela indução de dois tipos de reações. Na reação tipo I há transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de diversos tipos de radicais livres, superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, enquanto que, na reação tipo II, há transferência de energia ao oxigênio pela mudança no *spin* do elétron, levando à produção de oxigênio singlete ou superóxido, que são espécies altamente reativas. Ambas levam à morte celular pela oxidação de moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos [3].

A ação da aPDT se estende a bactérias, fungos, leveduras, vírus e protozoários, dependendo do FS e da fonte de luz utilizada, sendo, portanto, de grande utilidade no combate à infecções localizadas. Vantagens como alta seletividade aos tecidos alvo, não desenvolvimento de resistência microbiana com doses repetidas, capacidade de eliminar micro-organismos rapidamente, segurança no uso, facilidade de aplicação, ausência de sintomatologia dolorosa e ausência de efeitos colaterais térmicos têm encorajado a utilização da aPDT para uma grande variedade de aplicações clínicas [4].

No entanto, a terapia tem ação diferente sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido às diferenças estruturais nas paredes celulares. As primeiras são mais suscetíveis a eliminação pela aPDT. As bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa complexa, com duas camadas lipídicas que atuam como uma barreira entre a célula e o ambiente, o que dificulta sua morte [2].

Os corantes fenotiazínicos, cuja estrutura fundamental é composta por um anel aromático tricíclico, como o azul de metileno (AM) e o azul de toluidina (AT), são os mais utilizados e amplamente estudados para a realização da terapia fotodinâmica, e são ativados pela luz no espectro de 620 a 700 nm (luz vermelha)

[5]. O AM e o AT apresentam características químicas e físico-químicas semelhantes, com natureza hidrofílica, baixo peso molecular e carga positiva que facilita a passagem pela parede bacteriana [1], induzindo danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos [5].

A adição de ureia a formulações aquosas de FS poderia melhorar a eficiência de FS fenotiazínicos [6] devido as suas características que levam a desagregação do FS [7]. A ureia enfraquece as ligações hidrofóbicas, altera a constante dielétrica e aumenta a tensão superficial da água, que geralmente causa uma diminuição nas interações substrato-substrato, como aqueles encontrados em pares de íons. A ureia estabiliza os monômeros da solução (e conseqüentemente reduz concentração de dímero) do AM, permitindo aPDT ser mais eficiente em *Candida albicans* [6].

Este estudo propõe comparar *in vitro* a eficácia do processo de descontaminação com AM e AM com ureia em pontas diamantadas odontológicas, utilizando aPDT com Laser Vermelho em bactéria gram negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) e em bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) em suspensão, sendo uma prova de conceito para determinar uma metodologia com excelência em novos experimentos *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

Material e métodos

Amostras bacterianas e cultivo

As amostras bacterianas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923) foram gentilmente cedidas pelo laboratório de microbiologia da Universidade Brasil (São Paulo) para condução da pesquisa.

Para o cultivo dos microrganismos de *E. coli* e de *S. aureus*, 100 µL da solução das bactérias foram incubadas em 10 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI - *Brain Heart Infusion*) esterilizados, em tubo de ensaio, e foram levados para estufa bacteriológica a 37°C por 8 horas.

Para controle inicial, os tubos com bactérias foram padronizadas com turbidez 7 da escala McFarland, com número aproximado de bactérias na ordem de 21×10^8 .

Procedimento

Todo procedimento foi realizado no Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil em Itaquera, São Paulo-SP.

Pontas diamantadas cônicas (Fava, São Paulo-SP, Brasil) esterilizadas, de uso odontológico foram utilizadas para o experimento. Elas foram contaminadas após serem colocadas com pinças estéreis dentro dos tubos de ensaio contendo uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL de *E. coli* e de *S. aureus*; uma ponta diamantada foi colocada em um tubo de ensaio contendo apenas o caldo BHI estéril para verificação da esterilização. Foram deixadas todas as pontas diamantadas odontológicas em seus respectivos caldos por 16 horas (*over night*) na estufa bacteriológica para cultivo a 37°C.

Após contaminação das pontas diamantadas e cultivo por 16 horas, as pontas foram divididas em três grupos: Grupo MB (grupo tratamento com AM + luz vermelha), n=9; Grupo UMB (grupo tratamento com AM aditivado de ureia + luz vermelha) n=9 Grupo CST (grupo controle sem tratamento, sem utilização de FS e de sem laser), n=9 (tabela1).

Tabela 1: grupos experimentais

Grupo tratamento com azul de metileno (MB)	Azul de metileno + laser vermelho	n=9
Grupo tratamento com azul de metileno aditivado de ureia (UMB)	Azul de metileno com ureia + Laser vermelho	n=9
Grupo controle sem tratamento (CST)	FS (-) Laser vermelho (-)	n=9

As pontas diamantadas foram depositadas em tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo solução aquosa de AM (diluído em água MiliQ) na concentração de 60 μ M para o grupo MB, e AM diluído em solução aquosa de ureia na concentração de 60 μ M para o grupo UMB. Ficaram imersas nos respectivos FS por um período de 1 minuto antes de receber a irradiação com o laser vermelho (tempo de pré-irradiação-TPI).

Logo após o tempo de pré irradiação (TPI), foi realizada a irradiação com

laser vermelho (Laser DUO®, MM Optics; São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, desinfetado com álcool 70% previamente e posteriormente a proteção com filme de PVC, realizando procedimento de irradiação perpendicular e em contato com o tubo por 3 minutos (figura 1) (um minuto e meio por cima e o mesmo tempo por baixo do tubo), sendo entregue 18 J de energia total (9 J de energia por cima e a mesma energia por baixo do tubo). Antes da irradiação de cada grupo a potência do equipamento Laser foi aferida usando um detector calibrado (Laser Check®, MM Optics; São Carlos, Brasil), e o operador utilizou óculos de proteção apropriado para o comprimento de onda laser durante toda a irradiação.

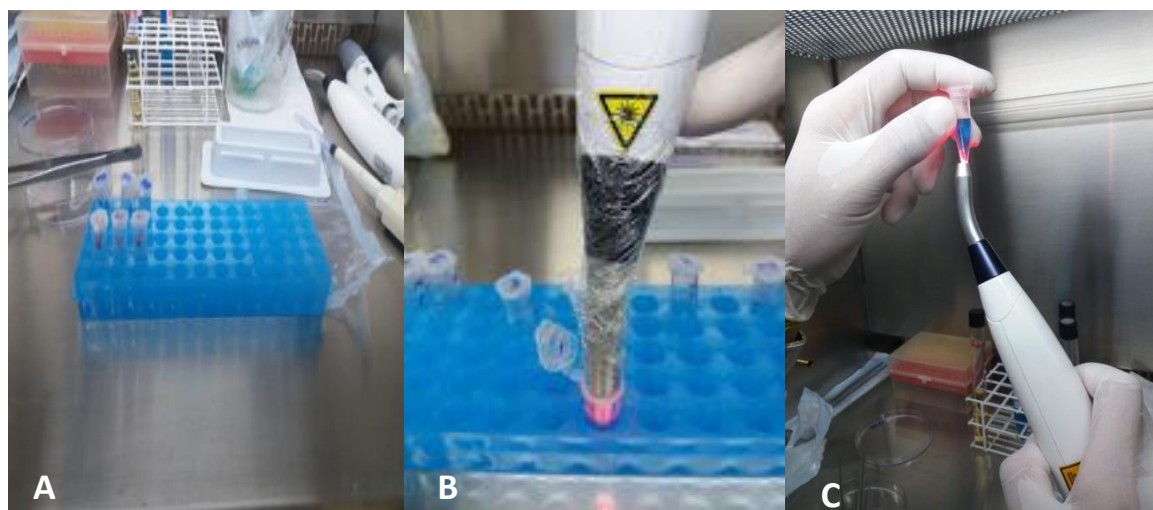


Figura 1- Imagens ilustrativas do experimento nos grupos aPDT: A- Tempo de pré-irradiação (TPI; 1 min), B- Irradiação da amostra com laser vermelho por um minuto e meio por cima do Eppendorf. C- Irradiação da amostra com laser vermelho por um minuto e meio por baixo do Eppendorf. (fonte: autor)

Depois da irradiação para descontaminação, as pontas diamantadas foram retiradas dos tubos Eppendorfs contendo os FS e colocadas em um novo Eppendorf esterilizado, contendo PBS estéril (tampão fosfato salina) até cobrir a ponta diamantada. Imediatamente, esse Eppendorf foi levado para uma centrífuga (Sigma® 2-16 PK, Osterode am Harz, Alemanha) à 3000 RPM por 8 minutos.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante de PBS e a ponta diamantada, sobrando apenas o *pellet* no final do tubo Eppendorf, no qual foi acrescido 100 μ L de PBS estéril com auxílio de uma pipeta. Levou-se ao agitador Vortex Mixer ® (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) por 1 minuto para diluição do conteúdo. Deste conteúdo, pegaram-se 100 μ L e colocou-se na microplaca para ser

feito a diluição seriada.

Realizado a diluição seriada, foram retiradas 10 μ L de cada diluição para inocular as placas contendo meio de cultura BHI para determinação do número de unidades formadoras de colônias presentes em cada ponta diamantada. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C por 16 horas. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram expressos em UFC.

Resultados

No presente estudo três pontas diamantadas odontológicas foram contaminadas com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e divididas nos diferentes grupos: CST- controle sem tratamento, MB- aPDT com azul de metileno e laser vermelho UMB- aPDT com azul de metileno associado a ureia e laser vermelho.

As amostras de material microbiológico foram coletadas e submetidas ao processamento laboratorial para realização da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) nas diferentes diluições. O experimento foi realizado em triplicata e a partir dos dados originais de UFC de cada grupo (n= 9) foram realizados cálculos das médias dos diferentes grupos.

Os dados foram submetidos a análise estatística descritiva para obtenção das medidas de tendência central (médias) e de variabilidade (desvio-padrão) (UFC/ml em log) para as variáveis quantitativas estudadas. Posteriormente foi realizada a análise estatística inferencial e aplicados os testes não paramétricos. As análises foram realizadas usando o *software* IBM SPSS 20.0 (CA, Estados Unidos).

Análise Descritiva

Os resultados descritivos mostraram que os grupos MB e UMB apresentam os valores na contagem microbiana (UFC/ml em log) inferiores em relação ao grupo CST, tanto para a bactéria gram negativa (*E. coli*) como para a gram positiva (*S. aureus*) em suspensão, como pode ser observado no gráfico da figura 2 com resultados das médias e desvio-padrão dos diferentes grupos experimentais (UFC/ml em log).

Análise Inferencial

A análise estatística inferencial dos dados (UFC/ml) mostrou pelo teste de Shapiro-Wilk a distribuição não normal dos dados na curva. A partir disso foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, nesse por ser um teste não paramétricos os valores médios originais (UFC/ml) foram transformados em postos médios, e posteriormente utilizado o Teste de Dunn para comparação entre os grupos ($p < 0,05$) como pode-se observar em Anexos (gráfico da figura 2).

Na análise estatística inferencial, primeiramente foi avaliada a normalidade dos dados pelos teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn para avaliação entre os grupos. Foi estabelecido nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas usando o *software* IBM SPSS 20.0 (CA, Estados Unidos).

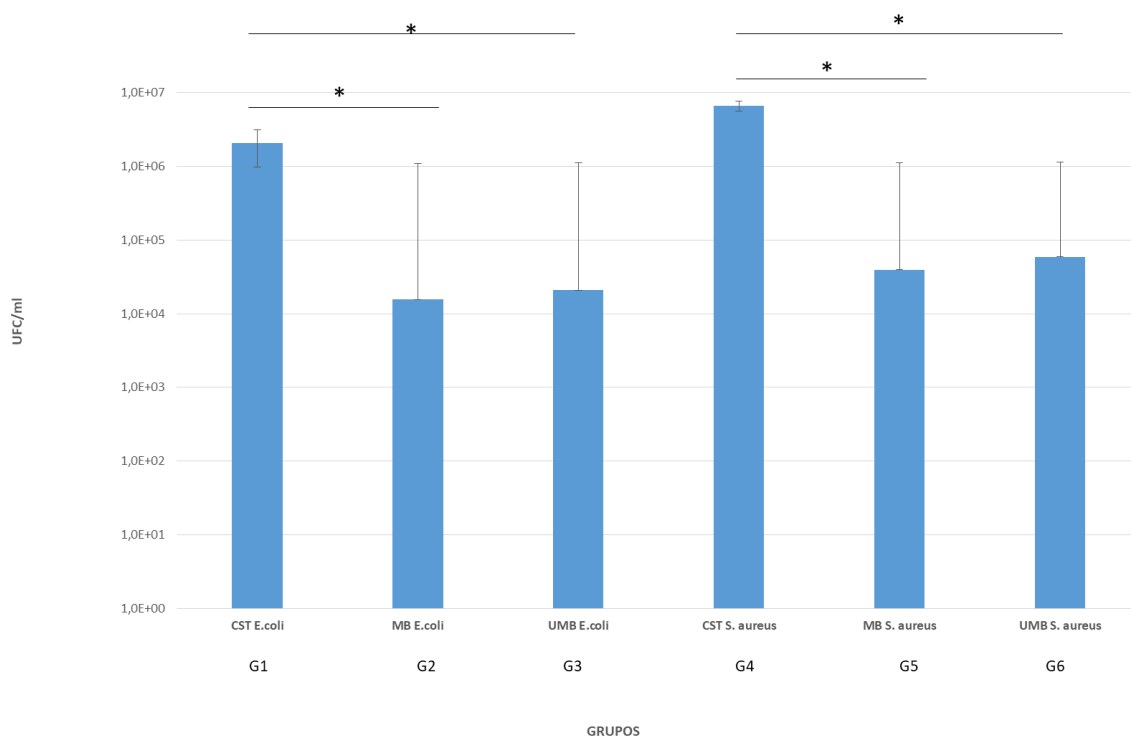


Figura 2- Gráfico dos resultados dos valores médios \pm desvio-padrão (UFC/ml em log) dos grupos experimentais CST *E. Coli* (CST Ec), MB *E. Coli* (MB Ec), UMB *E. Coli* (UMB Ec), CST *S. aureus* (CST Sa), MB *S. aureus* (MB Sa), UMB *S. aureus* (UMB Sa). Análise estatística há diferenças estatísticas significativas entre os grupos analisados (* $p < 0,05$).

As análises estatísticas inferencial dos dados mostraram que os grupos MB e UMB apresentaram considerável redução microbiana ($p < 0,05$) para a bactéria *E. coli* em suspensão comparados ao grupo CST (gráfico da figura 2) (grupos G2 e G3 comparados ao G1).

O mesmo pode se observar para a bactéria *S. aureus* em suspensão, mostrando relevante redução microbiana ($p < 0,05$) nos grupos MB e UMB comparados ao grupo CST (gráfico da figura 2) (grupos G5 e G6 comparados ao G4). Tais achados, com as limitações do estudo *in vitro* mostram a efetividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica com MB e UMB em microrganismos em suspensão avaliados no presente estudo.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os grupos CST para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em suspensão (gráfico da figura 2) (grupos G1 e G4).

Para a bactéria *E. coli* em suspensão não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os grupos de aPDT com MB e UMB (G2 e G3), bem como para a bactéria *S. aureus* não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os grupos de aPDT com MB e UMB (G5 e G6) (gráfico da figura 2), mostrando que o presente estudo com microrganismos em suspensão, não confirmou a efetividade desagregadora da ureia associada ao AM na aPDT *in vitro*.

A ação da ureia em associação com o azul de metileno na aPDT não promoveu efeitos nas diferentes espécies bacterianas gram positivas e negativas, devendo considerar na ação fotodinâmica as diferenças ultra estruturais e de composição dessas espécies bacterianas, e o estudo ter sido realizado com microrganismos em suspensão e não em biofilme *in vitro* ou *in vivo* em condições clínicas.

Interessante observar que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os grupos de aPDT com tratamento de MB para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em suspensão (G2 e G5). O mesmo foi observado com o tratamento de UMB para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em suspensão (G3 e G6), mostrando serem similares apesar de uma tendência de superioridade da média do UMB *E. coli* em relação ao UMB *S. aureus*, mesmo apresentando características ultra estruturais diferentes em suas membranas celulares sendo uma gram positiva e outra gram negativa.

Finalmente, os valores foram convertidos em resultados da fração de sobrevivência microbiana (UFC/ml) mostrando a nítida diferença de microrganismos remanescentes entre os grupos MB e UMB e o grupo CST para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em suspensão (gráfico da figura 2), ficando evidente a efetividade

antimicrobiana da aPDT, e similaridade de ambas as técnicas com MB e UMB, como foi confirmada pela análise estatística inferencial demonstrada (gráfico da figura 2).

Discussão

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) apresenta efetiva ação antimicrobiana e aplicações em diferentes áreas da saúde, e é uma terapia baseada na associação de um FS, uma fonte de luz com comprimento de onda específico e oxigênio, gerando pelo processo fotodinâmico a produção de espécies reativas de oxigênio promovendo a morte microbiana por dano oxidativo. O AM é o principal FS utilizado nos estudos e prática clínica. Atualmente buscam novos FS ou a associação com compostos químicos, visando aumentar a efetividade antimicrobiana [1, 5, 6, 8, 9].

Esse estudo tem por intuito utilizar a técnica de aPDT em bactérias em suspensão com FS fenotiazínicos adicionado de ureia, para determinar parâmetros e definir um protocolo de utilização para ser seguido em outros experimentos em biofilme e *in vivo*, pois o AM tende a se agregar, interferindo negativamente na geração de oxigênio singleto [6, 10, 11].

Os grupos MB e UMB apresentaram maior redução de microrganismos se comparados ao grupo controle, tanto em bactéria gram negativa (*E. coli*) quanto em bactéria gram positiva (*S. aureus*), não sendo observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos nas espécies bacterianas, considerando as diferenças e as características ultra estruturais e de composição dessas bactérias. A diferença existente entre a parede celular de bactérias Gram-positivas e a membrana celular de Gram-negativas afeta a eficácia da PDT visto que as bactérias Gram-positivas geralmente são mais susceptíveis, pois sua parede externa é única e, sendo porosa, permite aos FS se difundirem para locais mais sensíveis da célula. As bactérias Gram-negativas possuem membrana externa complexa dificultando a penetração do FS, muitas vezes não produzindo o efeito desejado [8, 12, 13].

Porém o grupo ureia (UMB) não teve um desempenho superior ao grupo MB, não sendo a ureia, portanto, nesse experimento com microrganismos em suspensão, um fator determinante na redução bacteriana apesar dela exercer quimicamente desagregação do FS fenotiazínico [6, 7, 14, 15].

O AM tem sido amplamente utilizado na aPDT. No entanto, os mecanismos de ação (Tipo I ou Tipo II) são definidos por seu estado de agregação. Nesse sentido, a identificação entre agregação, mecanismos de ação e eficácia contra os microrganismos, bem como o estabelecimento de meios e formulações que possam favorecer os mecanismos mais eficazes, é essencial para se melhorar a eficácia da aPDT [7, 16, 17].

Apesar dos diferentes tratamentos disponíveis e efetivos com antibióticos, cada vez mais tem se buscado tratamentos alternativos, sendo controlada sua prescrição pelas agências regulatórias de saúde em todo o mundo [18].

Devido ao uso indiscriminado da terapia antibiótica, levando a resistência microbiana, sendo a causa de morbidade e mortalidade devido às bactérias denominadas “super-resistentes” encontradas principalmente no ambiente hospitalar, os efeitos colaterais sistêmicos das drogas, o custo ao sistema de saúde, ação inicial lenta das terapias, a interação medicamentosa em pacientes que fazem uso de medicações para doenças de base, é incentivado e alvo de estudo de terapias alternativas [5, 6, 10, 17, 18].

Nas terapias antimicrobianas alternativas ou coadjuvantes busca-se a eficácia, rapidez, custo, baixa toxicidade e segurança na aplicação clínica. Dentro deste contexto a aPDT vem de encontro como recurso terapêutico em diferentes condições clínicas na área da saúde [1, 6, 18].

O dodecil sulfato de sódio foi o único que melhorou a eficácia do AM na aPDT em uma cultura de *C. Albicans* no qual foram testados, em biofilme, vários veículos incluindo a ureia 1 mol/L [10]. Esse estudo mostra que a possível desagregação do MB pela ureia, nesse caso, não foi tão eficiente, vindo de encontro com o nosso trabalho. Mas o AM com ureia teve um tempo menor de exposição para eliminar totalmente a *C. Albicans* se comparado ao AM sem ureia em outro experimento [6].

A utilização do AM em forma de gel foi testada para melhorar à geração de EROs, comparando gel carbopol (CBP) e gel de hidroxietilcelulose (HEC) com adição ureia a 10%, etanol também a 10% ou água. Os melhores resultados foram obtidos em CBP com etanol10% e HEC 10% em água [19]. Diferentemente, nosso estudo mostrou que a ureia não obteve resultados muito inferiores quando adicionado ao AM.

O AM foi avaliado em água deionizada e solução salina a 0,9% para redução bacteriana em *E. coli*, tendo como melhor redução bacteriana o AM associado à água

deionizada [11] vindo de encontro com nosso experimento que usou a mistura do AM com água deionizada no grupo MB. Tanto no grupo MB quanto no grupo UMB foram utilizadas a concentração de 60 μ M de AM, sendo que as concentrações terapêuticas de AM com aPDT variam de 30 μ M a 100 μ M [6, 10, 11, 12, 20]. Em outra pesquisa usando AM a 50 μ g/mL [21] concluiu que cepas de *S. aureus* e *E. coli*, ambas ATCC, em suspensão apresentaram sensibilidade a aPDT, enquanto que, em concentrações inferiores, ambas as bactérias apresentaram-se resistentes ao efeito fotodinâmico.

O que se deve ponderar é que a aplicação de aPDT *in vivo*, por conter secreções como a saliva que leva a um efeito hipocrômico e conseqüente agregação do MB [20] e, também, substâncias que promovam captura do FS [11] no local de aplicação, servindo de concorrência para aPDT, pode fazer com que o poder desagregador da ureia [6, 7, 11, 22] seja intensificado pela menor quantidade de FS disponíveis para a aPDT, no que resulta numa maior ação antimicrobiana e em um menor tempo de exposição se comparado ao grupo sem ureia. Já em uma situação *in vitro* utilizando bactérias em suspensão, por não existir captura, e, portanto concorrência do FS, a ação do grupo sem ureia potencializou ao máximo o uso de AM, não sendo então a ureia, neste trabalho, determinante na redução bacteriana.

Outro aspecto importante é que a ação da aPDT atua tanto nas células, promovendo morte e alterações na membrana, quanto na matriz extra celular, interrompendo a estrutura do biofilme [8], sendo que no trabalho apresentado foi realizado em bactérias em suspensão *in vitro*, sendo processos e efeitos diferentes da aPDT em comparação as condições de biofilme *in vitro* e *in vivo* (condições clínicas), com uma maior organização estrutural, alterando a efetividade de ação das espécies reativas de oxigênio nos microrganismos, portanto condições diferentes, e nesses casos o fator de desagregação da ureia poderia ser fundamental para uma maior redução bacteriana como mostrado em estudos prévios da associação da uréia na aPDT [6, 7].

Assim sendo, no presente estudo a ureia, apesar de exercer quimicamente desagregação do FS fenotiazínico, não resultou diminuição bacteriana melhor que o grupo que utilizou apenas o AM, e por isso, os dois grupos, com e sem ureia, tiveram resultados próximos.

O estudo mostrou que a aPDT com AM ou com AM e ureia promoveram efetiva e superior redução microbiana comparados ao grupo controle para as

bactérias Gram negativa (*E. coli*) e gram positiva (*S. Aureus*) em suspensão. A redução microbiana da aPDT do grupo com ureia (UMB) não foi superior ao grupo sem ureia (MB) para ambos microrganismos em suspensão. O fator de desagregação que a ureia possui em FS fenotiazínicos, nesse experimento *in vitro*, não foi determinante para reduzir a quantidade de microrganismos em suspensão.

Referências

- [1] Trindade A.C., Figueiredo J.A.P., Steier L., Weber J.B.B. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015. 33(3): 175-182.
- [2] Singh S., Nagpal R., Manuja R., Manuja N., Tyagi S.P. Photodynamic therapy: na adjunct to conventional root canal disinfection strategies. *Aust Endod J.* 2015; 41: 54-71.
- [3] Melo M.A., Rolim J.P., Passos V.F., Lima R.A., Zanin I.C., Codes B.M., Rocha S.S., Rodrigues L.K. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal for management of deep caries lesion. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12(4): 581- 586.
- [4] Bumb S.S., Bhaskar D.J., Agali C.R., Punia H., Gupta V., Singh V., Kadtane S., Chandra S. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(11): ZC67-ZC71.
- [5] Garcia V., Longo M., Fernandes L.A., Gualberto-Júnior E.C., Santinoni C.S., Bosco A.F., Nagata M.J.H., Theodoro L.H. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2014; 49: 584-594.
- [6] Núñez S.C., Yoshimura T.M., Ribeiro M.S., Junqueira H.C., Maciel C., Coutinho-Neto M.D., Baptista M.S. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2015; 150: 31–37. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018.
- [7] Núñez S.C., Garcez A.S., Ribeiro M.S. PDT Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. 2019; Vol. 2: 153-154.
- [8] Garcez A.S., Núñez S.C., Azambuja N. Jr., Fregnani E.R., Rodriguez H.M.H.,

Hamblin M.R., Suzuki H., Ribeiro M.S. Effects of photodynamic therapy on Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms by bioluminescence imaging and scanning electron microscopic analysis. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31: 519-525.

[9] Soares R.B., Myakawa W., Navarro R.S., Baptista A., Ribeiro M.S., Núñez S.C. (2018). Photodynamic therapy to destroy pneumonia associated microorganisms using external irradiation source. In *Light-Based Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases*, Proceedings of SPIE 10479, 1047917.

[10] Da Collina G.A., Freire F., Santos T.P.C., Sobrinho N.G., Aquino S., Prates R.A., Pavani C. Controlling Methylene Blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using Photodynamic Therapy. *Photochemical & Photobiological Sciences.* 2018; 17(10): 1355-1364. doi:10.1039/c8pp00238j.

[11] Núñez S.C., Garcez A.S., Kato I.T., Yoshimura T.M., Gomes L., Baptista M.S., Ribeiro M.S. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2014; 13(3): 595. doi:10.1039/c3pp50325a.

[12] Cai Z., Li Y., Wang Y., Chen S., Jiang S., Ge H., Lei L, Huang X. Antimicrobial effects of photodynamic therapy with antiseptics on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium surface. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2018; 25: 382–388. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.01.024.

[13] Yow, Cmn, Fung, K, Wong, KC. Photodynamic inactivation of multidrug resistant pathogens in Hong Kong. *Hong Kong Med J*, 2011;17(Suppl 2):S24-8.

[14] Mukerjee P., Ghosh A.K. The effect of urea on methylene blue, its self-association, and interaction with polyelectrolytes in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry.* 1963; 67(1): 193–197. doi:10.1021/j100795a047.

[15] Patil K., Pawar R., Talap P. Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu4NBr and urea. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000; 2(19): 4313–4317. doi:10.1039/b005370h.

[16] Demidova T.N., Hamblin M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004; 17: 245–254.

[17] Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3:436–450.

[18] Barroso R.A.. Eficácia da Terapia Fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador *Hypericum perforatum* e Laser em baixa intensidade sobre Biofilmes monotípicos de *Propionebacterium acnes*. Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Brasil. São Paulo. 2018. 35 p.

[19] Costa L.A.G., Pereira H.K.M., Fontes A., Falcão J.S.A., Santos B.S. Géis poliméricos contendo azul de metileno como novas formulações para terapia fotodinâmica. Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2017, 377-380.

[20] Núñez S.C., Garcez A.S., Gomes L., Baptista M.S., Ribeiro M.S. Methylene blue aggregation in the presence of human saliva. Proceedings Volume 6846, Mechanisms for Low-Light Therapy III; 684608 (2008) <https://doi.org/10.1117/12.763503> Event: SPIE BiOS, 2008, San Jose, California, United States.

[21] Cavalcanti, TM. Avaliação do efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica a laser: estudo in vitro. Dissertação (Mestrado). Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

[22] Dias L.G., Florenzano F.H., Reed W.F., Baptista M.S., Souza S.M.B., Alvarez E.B., Politi M.J. Effect of Urea on Biomimetic Systems: Neither Water 3-D Structure Rupture nor Direct Mechanism, Simply a More “Polar Water.” *Langmuir*. 2002; 18(2): 319–324. doi:10.1021/la010176u.

[23] Cieplik F., Tabenski L., Buchalla W., Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00405.

[24] Garcez A.S., Arantes-Neto J.G., Sellera D.P., Fregnani E.R. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015; 12: 575-580.

[25] Robres P., Aspiroz C., Rezusta A., Gilaberte Y. Utilidad de la terapia fotodinámica en el manejo de la onicomicosis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2015; 106(10): 795–805. doi:10.1016/j.ad.2015.08.00.

[26] Soria-Lozano P., Gilaberte Y., Paz-Cristobal M., Pérez-Artiaga L., Lampaya-Pérez V., Aporta J., Rezusta A. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiology*. 2015; 15(1): 1-8. doi:10.1186/s12866-015-0524-3.

[27] Chiniforush N., Pourhajbagher M., Shahabi S., Bahador A. Clinical approach of high technology techniques for control and elimination of endodontic microbiota. *J Lasers Med Sci*. 2015; 6(4): 139-150.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão o presente estudo mostrou que a aPDT com AM ou com AM e ureia promoveram superior redução microbiana comparados ao grupo controle para bactéria Gram negativa (*E. coli*) e gram positiva (*S. Aureus*) em suspensão.

A redução microbiana da aPDT do grupo com ureia (UMB) não foi superior ao grupo sem ureia (MB) para ambos microrganismos em suspensão.

O fator de desagregação que a ureia possui em FS fenotiazínicos, nesse experimento *in vitro*, não foi determinante para reduzir a quantidade de microrganismos em suspensão.

REFERÊNCIAS

1. Rineh A., Bremner J.B., Hamblin M.R., Ball A.R., Tegos G.P., Kelso M.J. Attaching NorA efflux pump inhibitors to methylene blue enhances antimicrobial photodynamic inactivation of *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* *in vitro* and *in vivo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018, 2736–2740. doi:10.1016/j.bmcl.2018.02.041.
2. Bumb S.S., Bhaskar D.J., Agali C.R., Punia H., Gupta V., Singh V., Kadtane S., Chandra S. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an *in vitro* study. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(11): ZC67-ZC71.
3. Azizi B., Budimir A., Bago I., Mehmeti B., Jakovljević S., Kelmendi J., Stanko A.P., Gabrić D. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and light-activated disinfection on contaminated zirconia implants: An *in vitro* study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2018; 21: 328–333. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.01.017.
4. Trindade A.C., Figueiredo J.A.P., Steier L., Weber J.B.B. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2015. 33(3): 175-182.
5. Singh S., Nagpal R., Manuja R., Manuja N., Tyagi S.P. Photodynamic therapy: an adjunct to conventional root canal disinfection strategies. *Aust Endod J*. 2015; 41: 54-71.
6. De Freitas M.T.M., Soares T.T., Aragão M.G.B., Lima R. A., Duarte S., Zanin I.C.J. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2017; 35(5): 239–245. doi:10.1089/pho.2016.4108.
7. Melo M.A., Rolim J.P., Passos V.F., Lima R.A., Zanin I.C., Codes B.M., Rocha S.S., Rodrigues L.K. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal for management of deep caries lesion. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015; 12(4): 581- 586.
8. Foggiato A.A., Silva D.F., Castro, R.C.F.R. Effect of photodynamic therapy on surface decontamination in clinical orthodontic

- instruments. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2018. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.09.003.
9. Soria-Lozano P., Gilaberte Y., Paz-Cristobal M., Pérez-Artiaga L., Lampaya-Pérez V., Aporta J., Rezusta A. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiology. 2015; 15(1). doi:10.1186/s12866-015-0524-3.
 10. Garcez A.S., Arantes-Neto J.G., Sellera D.P., Fregnani E.R.. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015; 12: 575-580.
 11. Chiniforush N., Pourhajibagher M., Shahabi S., Bahador A. Clinical approach of high technology techniques for control and elimination of endodontic microbiota. J Lasers Med Sci. 2015; 6(4): 139-150.
 12. Garcia V., Longo M., Fernandes L.A., Gualberto-Júnior E.C., Santinoni C.S., Bosco A.F., Nagata M.J.H., Theodoro L.H. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. J Periodontol Res. 2014; 49: 584-594.
 13. Nuñez S.C., Yoshimura T.M., Ribeiro M.S., Junqueira H.C., Maciel C., Coutinho-Neto M.D., Baptista M.S. Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2015; 150:31–37. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.03.018.
 14. Núñez S.C., Ribeiro M.S, Garcez A.S. PDT Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019, 2 edição. 280 p. ISBN: 9788535291285
 15. Da Collina G.A., Freire F., Santos T.P.C., Sobrinho N.G., Aquino S., Prates R.A., Pavani C. Controlling Methylene Blue aggregation: a more efficient alternative to treat *Candida albicans* infections using Photodynamic Therapy. Photochemical & Photobiological Sciences. 2018; 17(10): 1355-1364. doi:10.1039/c8pp00238j.

16. Bianchi E.C., Silva E.J., Cezar F.A.G., Aguiar P.R., Bianchi A.R.R., Freitas C.A., Riehl H. Aspectos microscópicos da influência dos processos de esterilização em pontas diamantadas. *Materials Research*. 2003; 6(2): 203–210. doi:10.1590/s1516-14392003000200015.
17. Giusti J.S.M., Santos-Pinto L., Pizzolito A.C., Helmersson K., Carvalho-Filho E., Kurachi C., Bagnato V.S. Antimicrobial Photodynamic Action on Dentin Using a Light-Emitting Diode Light Source. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(4): 281–287. doi:10.1089/pho.2007.2149.
18. Percival S., Francolini I., Donelli G. Low-laser therapy as an antimicrobial and biofilm technology and its relevance to wound healing. *Future Microbiol*. 2015; 10(2): 255-269.
19. Sreekumar S., Varghese K., Abraham J.P., Jaysa J.J. An *in vitro* evaluation of the efficiency of various disinfection and sterilization methods to decontaminate dental handpieces. *J DentRes Rev*. 2018; 5:50-3.
20. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998; 42(1):13–28. doi:10.1093/jac/42.1.13.

ANEXO A

Postos médios dos grupos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis.

Teste de Kruskal-Wallis			
	Postos	Médias dos postos assumidos	Valor p
CST <i>E. coli</i>	G1	47.0000	0.0001*
MB <i>E. coli</i>	G2	17.0000	
UMB <i>E. coli</i>	G3	21.7778	
CST <i>S. aureus</i>	G4	44.0000	
MB <i>S. aureus</i>	G5	17.7778	
UMB <i>S. aureus</i>	G6	17.4444	

*Teste de Kruskal-Wallis mostrando valor de $p < 0,05$ portanto há diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

ANEXO B

Análise estatística Teste de Dunn, valor da diferença e comparação entre os postos médios dos grupos experimentais.

Teste de Dunn						
Diferença postos médios	G1	G2	G3	G4	G5	G6
G1	-	30.000*	25.2222*	3.0000 (NS)	29.2222*	29.5556*
G2	30.000*	-	4.7778 (NS)	27.0000*	0.7778 (NS)	0.4444 (NS)
G3	25.2222*	4.7778 (NS)	-	22.2222*	4.0000 (NS)	4.3333 (NS)
G4	3.0000 (NS)	27.0000*	22.2222*	-	26.2222*	26.5556*
G5	29.2222	0.7778 (NS)	4.0000 (NS)	26.2222	-	0.3333 (NS)
G6	29.5556*	0.4444 (NS)	0.4444 (NS)	26.5556*	0.3333 (NS)	-

Teste de Dunn comparação entre os postos médios, valor de $p < 0,05$ há diferenças estatísticas entre os grupos analisados (), NS– não há diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

ANEXO C

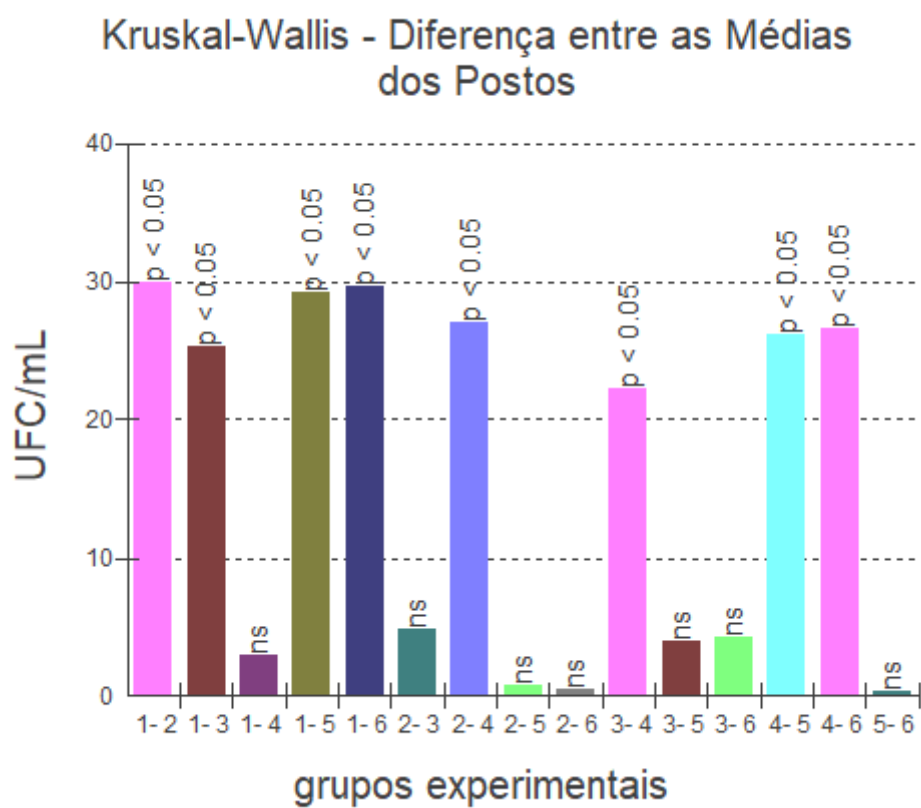


Gráfico da análise estatística teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn de comparação entre as médias dos postos (UFC/ml), com valor de $p < 0,05$ há diferenças estatísticas entre os grupos analisados e NS não há diferenças estatísticas entre os grupos analisados.