



## Artículo Original

Efecto fotodinámico de Azul de metileno y Azul de toluidina, sobre biofilm de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*Photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilm

DOI

<https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2021.144.1321>José Antonio Alanya-Ricalde<sup>1,a</sup>, Lugo Miranda-Barriga<sup>2,b</sup>, Monica Yizely Llanos-Carazas<sup>1,c</sup>, Sheila Acurio-Medina<sup>1,d</sup>, Franklin Miranda-Solis<sup>3,4,e</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto fotodinámico de azul de metileno (MB) y azul de toluidina (TBO) activadas con láser terapéutico sobre biofilms de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. **Material y métodos:** Se analizaron 61 muestras de biopelículas, en medios de cultivo cerebro corazón (BHI) por 6 días, las muestras se dividieron en 4 grupos y se sumergieron en: grupo experimental en MB al 0,01% y TBO al 0,05%, grupo control positivo en gluconato de clorhexidina (CHX) al 0,12% y grupo control negativo en cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%. Las muestras de MB y TBO fueron irradiadas con láser terapéutico con una longitud de onda de 660 nm, y 9 J/cm<sup>2</sup> de potencia, cada bloque de esmalte estuvo en cultivo post irradiación. las muestras pasaron a cultivo, para la cepa *S. mutans* y *C. albicans* por separado. El método empleado fue el de diluciones seriadas para la cuantificación de UFC luego de 5 días de cultivo. Para el análisis se usó T de student y Anova de un factor. **Resultados:** encontrando diferencias estadísticas entre los cuatro grupos de experimentación en el crecimiento microbiano (ANOVA p<0,05), al análisis con el grupo control positivo, no hubo diferencias significativas entre MB frente al *S. mutans* y *C. albicans*, en contraste con el TBO que mostro diferencias significativas (p<0,05). **Conclusión:** el MB y TBO muestran en laboratorio, una disminución en el crecimiento de las cepas del biofilm, el TBO mostro mejor efecto a la reducción de crecimiento del *S. mutans* y *C. albicans*.

**Palabras Clave:** *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Biopelículas, Láser terapéutico (Fuente: DeCS-BIREME).

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the photodynamic effect of methylene blue (MB) and toluidine blue (TBO) activated with therapeutic laser on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms. **Material and methods:** Sixty-one biofilm samples were analyzed in brain heart culture media (BHI) for 6 days, the samples were divided into 4

## FILIACIÓN

1. Escuela profesional de Estomatología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Andina del Cusco, Cusco, Perú.
2. Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Andina del Cusco, Cusco, Perú.
3. Universidad Andina del Cusco, Cusco, Perú.
4. Escuela profesional de Medicina Humana, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.
  - a. Maestro en Docencia Universitaria.
  - b. Biólogo.
  - c. Magister en Docencia e Investigación en Salud.
  - d. Estudiante de pregrado.
  - e. Magister(c) docencia universitaria.

## ORCID

1. José Antonio Alanya-Ricalde / [0000-0003-4752-9983](https://orcid.org/0000-0003-4752-9983)
2. Lugo Miranda-Barriga / [0000-0003-0742-874X](https://orcid.org/0000-0003-0742-874X)
3. Monica Yizely Llanos-Carazas / [0000-0002-3179-8751](https://orcid.org/0000-0002-3179-8751)
4. Franklin Miranda-Solis / [0000-0001-5235-7819](https://orcid.org/0000-0001-5235-7819)
5. Sheila Acurio-Medina / [0000-0002-8620-9619](https://orcid.org/0000-0002-8620-9619)

## CORRESPONDENCIA

José Antonio Alanya-Ricalde  
Urb. Ttio, pasaje Miraflores Y-1-27, 401 08007 Wanchaq - Cusco.  
Contacto: 984700368

## EMAIL

[jalanya@uandina.edu.pe](mailto:jalanya@uandina.edu.pe)

## CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores niegan conflictos de interés.

## FINANCIAMIENTO

El presente estudio fue parcialmente financiado por la Universidad Andina del Cusco con partida presupuestal N° 20-00018

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

José Antonio Alanya-Ricalde y Lugo Miranda-Barriga  
-Concepción y diseño del trabajo; -Recolección/obtención de resultados; -Análisis e interpretación de datos; -Redacción del manuscrito; -Aprobación de su versión final; -Aporte de material de estudio; -Obtención de financiamiento; -Asesoría técnica o administrativa.

Monica Yizely Llanos-Carazas, Franklin Miranda Solis y Sheila Acurio-Medina  
-Análisis e interpretación de datos; -Redacción del manuscrito; -Revisión crítica del manuscrito; -Aprobación de su versión final; -Asesoría estadística; -Asesoría técnica o administrativa.

## REVISIÓN DE PARES

Recibido: 07/07/2021  
Aceptado: 14/09/2021

## COMO CITAR

Alanya-Ricalde, J., Miranda-Barriga, L., Llanos-Carazas, M., Acurio-Medina, S., & Miranda-Solis, F. Efecto fotodinámico de Azul de metileno y Azul de toluidina, sobre biofilm de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Revista Del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo, 2021, 14(4), 459 - 465. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2021.144.1321>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.  
Versión Impresa: ISSN: 2225-5109  
Versión Electrónica: ISSN: 2227-4731  
Cross Ref. DOI: 10.35434/rcmhnaaa  
OJS: <https://cmhnaaa.org.pe/ojs>

groups and immersed in: experimental group in 0.01% MB and 0.05% TBO, positive control group in 0.12% chlorhexidine gluconate (CHX) and negative control group in 0.9% sodium chloride (NaCl). The MB and TBO samples were irradiated with therapeutic laser with a wavelength of 660 nm, and 9 J/cm<sup>2</sup> of power, each enamel block was in post-irradiation culture. The samples were cultured separately for the *S. mutans* and *C. albicans* strains, the method used was that of serial dilutions for the quantification of CFU after 5 days of culture. For the analysis, Student's T and Anova of one factor were used.

**Results:** finding statistical differences between the four experimental groups in microbial growth (ANOVA  $p < 0.05$ ), in the analysis with the positive control group, there were no significant differences between MB versus *S. mutans* and *C. albicans*, in contrast to the TBO that showed significant differences ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** MB and TBO show in laboratory, a decrease in the growth of biofilm strains, TBO showed better effect in reducing the growth of *S. mutans* and *C. albicans*.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Biofilms, Therapeutic laser. (Source: DeCS-BIREME).

## INTRODUCCIÓN

La terapia fotodinámica (PDT), se ha desarrollado como una alternativa para el tratamiento del cáncer, se ha descrito que no tiene efectos secundarios, ni riesgo alguno sobre los tejidos, destruye las células por necrosis o apoptosis, y puede utilizarse para la destrucción localizada de tejido vivo con crecimiento anormal<sup>(1,2)</sup>. Por lo tanto, otras enfermedades como las infecciones bacterianas, fúngicas y víricas, que tienen en común las características de la proliferación celular descontrolada y presencia de células microbianas infecciosas, que podrían tratarse con PDT, denominándose terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT por sus siglas en inglés) o Inactivación foto-dinámica (PDI en inglés)<sup>(3,4)</sup>.

Por otra parte, se conoce que gérmenes como el *S. mutans* y *C. albicans* pueden crear condiciones para formar biofilms<sup>(5)</sup>, lo cual, produce una interface sólido-líquida entre una superficie y un medio acuoso, proporcionando un entorno ideal para la fijación y crecimiento de los microorganismos<sup>(6,7)</sup>. Por consiguiente, los biofilms son generales en la Naturaleza y se encuentran prácticamente en todo cuerpo natural de agua en el mundo<sup>(4,8)</sup> y también en superficies como plástico, vidrio<sup>(7,9)</sup> y dientes<sup>(10,11)</sup>.

Asimismo, se sabe que la resistencia de las bacterias a los antibióticos sigue aumentando, por lo que se debe buscar una alternativa que controle eficazmente los patógenos sin provocar resistencia a los medicamentos. Por este motivo, existe una búsqueda constante de terapias alternativas con sustancias derivadas de plantas y otros compuestos con propiedades antibacterianas. En este sentido, uno de los métodos alternativos es la terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT)<sup>(12)</sup>, cuyo efecto en el siguiente principio: la luz visible activa una molécula esencialmente no tóxica, el llamado fotosensibilizador (PS), para producir especies reactivas de oxígeno que pueden matar bacterias. Sin selectividad a la oxidación. El azul de metileno y el azul de toluidina son colorantes utilizados en técnicas de tinción histológica. Se han presentado varios estudios<sup>(13-17)</sup> donde se han evaluado la efectividad de estas tinciones los resultados son diversos debido a las diferentes metodologías empleadas, así mismo mecanismo de foto activación entre otros diferentes enfoques.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto fotodinámico de Azul de metileno (MB) y Azul de toluidina (TBO), sobre biofilms de *S. mutans* y *C. albicans*, realizado in vitro, en el laboratorio de la facultad de ciencias de la salud

de la Universidad Andina del Cusco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de estudio

Se diseñó un estudio experimental in vitro donde analizaron muestras de biofilm de *S. mutans* y *C. albicans* en placas de esmalte las cuales se les aplicó terapia fotodinámica de dos soluciones fotosensibles, para comparar los efectos de este sobre el crecimiento microbiano de los biofilms.

El presente esquema determina el diseño del experimento de posprueba con grupos control negativo y positivo:

G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G0	--	O4

### Población y muestra

La población estuvo compuesta por 61 muestras de biofilms de cepas *S. mutans* ATCC®25175TM y *C. albicans* ATCC®10231TM cultivadas en placas de esmalte de 4 x 4mm, desarrollados en un frasco hermético el cual se denominó "Biorreactor".

La muestra de 61 biofilms se dividieron de la siguiente manera: (G1)Grupo 1(MB): 26 biofilms en los que se aplicó solución de azul de metileno (MB) al 0,01%(X1), (G2)Grupo 2(TBO): 26 biofilms en los que se aplicó solución de azul de toluidina (TBO) al 0,05%(X2), (G3) Grupo 3(CONTROL POSITIVO): 3 biofilms en los que se les aplicó Gluconato de clorhexidina (CHX) al 0,12% como control positivo(X3), (G0)Grupo 0(CONTROL NEGATIVO): 3 biofilms en los que no se les aplicó terapia alguna las cuales fueron grupo control negativo.

### Variable del estudio

Se consideró como variable principal (dependiente) el crecimiento microbiano del Biofilm de *S. mutans* y *C. albicans* (UFC), La variable efecto fotodinámico (independiente) fue la aplicación de solución de MB al 0,01%, TBO al 0,05%, ambas irradiadas con Laser terapéutico 660nm para producir el efecto fotodinámico, CHX al 0,12% como grupo control positivo.

### Procedimiento

**Cultivo planctónico Cepas bacterianas:** Las cepas bacterianas utilizadas en el grupo de desarrollo de biofilm denominado "de fisura o coronal"<sup>(6,18)</sup> fueron *S. mutans*

ATCC®25175TM y *C. albicans* ATCC®10231TM, se utilizó dos cultivos los cuales fueron agar sangre enriquecido y agar Sabouraud 4% glucosado (@VM906938006 MERK) respectivamente para el crecimiento planctónico de las cepas en placas Petri (2 por cada cepa).

**Procedimiento de elaboración del fotosensibilizador:** Se preparó las sustancias MB (Azul de metileno (C.I. 52015) ®FN1006150636 MERK) polvo preparado a 0,005g en 50 ml de agua destilada para dar una concentración de 0,01% y TBO (Azul de toluidina (C.I.52040) ®CAS N° 6586-04-5 BIOLAB REAGENT) polvo preparado a 0,025g en 50ml de agua destilada para dar una concentración de 0,05% puras.

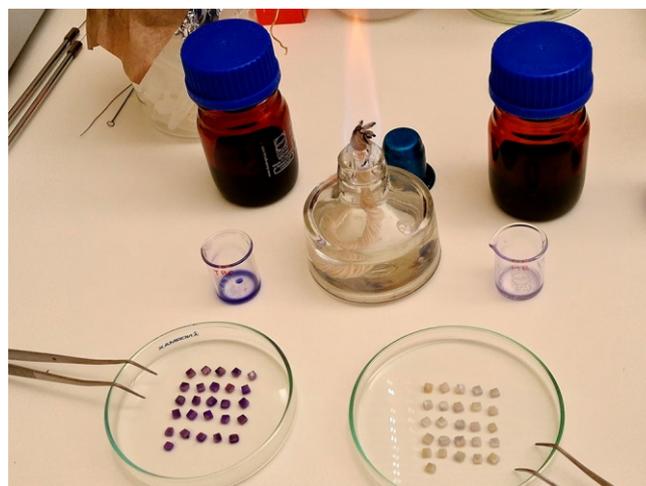
**Preparación de los bloques de esmalte:** 61 bloques de esmalte fueron preparados a partir de 40 piezas dentarias las cuales fueron 25 premolares y 15 molares extraídos anteriormente y almacenados, fueron rehidratados con glicerina al 93% por una hora y luego sumergidos en solución de timol al 0,5% durante 1 hora a temperatura ambiente, las piezas dentarias se cortaron con una máquina de marca Derek motors DRK-150 los cuales se completaron en bloques de 4x4mm de esmalte, el grosor de los bloques es de 1.5mm aproximadamente, la medición se hizo con un calibrador digital de la marca TRUPER(0,01mm-0,0005”). Se procuró que no existiera tejido de dentina en cada bloque, verificando que sea tejido puro en cada caso. Para el proceso de eliminación de residuos superficiales o barro producto del corte se sumergió las placas en EDTA trisódico al 17% (MAQUIRA®80322400049), durante dos minutos y seguidamente NaCl al 0,9% (BRAUN MEDICAL), durante un minuto(19), luego de la desinfección se esterilizaron las muestras sumergidas en el caldo infusión Cerebro Corazón (BHI, por su siglas en inglés Brain Heart Infusion de marca ISO 6880®VM879793923 MERK) y se separaron tres muestras de esmalte que sirvieron como control negativo durante 48 horas a 37 °C como verificación de condiciones de pureza e inocuidad<sup>(20)</sup>.

**Procedimiento de cultivo bacteriológico y elaboración del biofilm:** Para el desarrollo de biofilm de fisura se realizó inicialmente el cultivo planctónico en placas Petri en Agar sangre de la cepa *S mutans* ATCC®25175TM y en Agar Sabouraud (@VM906938006 MERK) de la cepa *Candida Albicans* ATCC®10231TM. Luego se procedió a pasar las cepas a medio líquido de 2ml de infusión BHI a tres muestras por cepa, se dejó crecer a 37 °C durante 48 horas. Luego de las 48 horas se inoculó los 10µl de la muestra que mostró mayor crecimiento bacteriano (de acuerdo al estándar Mc Farland 0,5) tanto de la cepa *S mutans* como de la cepa *Candida* en un solo frasco de infusión de 30 ml BHI el cual llamamos Biorreactor. Para el desarrollo del biofilm de fisura se prepararon 61 bloques de esmalte en saliva artificial de la marca Salival®, Perú, para la formación de película adquirida durante 2 horas, antes de sumergirlas en la infusión de 30 ml BHI del biorreactor antes mencionado. Todos los bloques fueron sumergidos en el biorreactor. Se mantuvo a una temperatura de 37 °C y agitación del medio para simular el movimiento o flujo de sustancias en boca. El proceso duro de 72 a 96 horas para el desarrollo del biofilm por completo (Figura 1).



**Figura 1.**  
Biorreactor de elaboración del biofilm con placas de esmalte en el interior 6to día.

**Procedimiento de foto activación:** Se retiró los bloques de esmalte del biorreactor para proceder a sumergirlos durante 1 minuto en la solución de MB y TBO dividiendo las muestras a 26 unidades de forma aleatoria para cada fotosensibilizador, del mismo modo se separó 3 bloques para control negativo que fueron sumergidos en NaCl al 0,19% y 3 bloques para control positivo sumergidos en 30ml de Gluconato de clorhexidina al 0,12% puro (PERIOGARD COLGATE ®OPEXP05). Luego de este proceso se retiraron las muestras de las soluciones y se procedió a colocar en una placa Petri (Figura 2) de acuerdo a cada grupo (Grupo 1 y Grupo 2) para la irradiación de laser de luz roja con longitud de onda 660nm ±10nm (100mW±20%) de la Marca DMC modelo Therapy EC. Con emisión de luz continua.



**Figura 2.**  
Muestras luego de sumergirlas en las soluciones colocadas en una placa Petri listas para irradiación

El tiempo de irradiación fue de acuerdo a indicaciones del fabricante de 9J/cm<sup>2</sup> por 90 segundos, a una distancia de 0,5cm cubriendo ambos lados del bloque de esmalte (Figura 3).



Figura 3.

Irradiación de laser de luz roja con longitud de onda 660nm ±10nm (100mW±20%) de la Marca DMC modelo Therapy EC.

La manipulación del bloque se realizó con pinzas estériles en autoclave al 134°C con una P° de 200 kPa, para evitar contaminación alguna. Seguidamente se colocó cada bloque de esmalte en un tubo de ensayo de sellado hermético con solución de infusión de BHI, para crecimiento de cultivo pos irradiación, a 37° por 48 horas. Luego de esto se homogenizó la muestra en un vórtex y se procedió al cultivo en placas Petri con medio enriquecido de agar Mueller-Hinton (@VM779137714 MERK). Para la cepa *Streptococcus mutans* (Figura 4) y placas Petri con Agar Ogye (@VM 897178940 MERK), para la cepa *Candida* (Figura 5), mediante el método empleado fue el de diluciones seriadas. Posteriormente se analizó los resultados de 2 a 5 días de cultivo, donde se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de acuerdo a la observación directa y conteo de unidades de acuerdo a las características y la morfología de las cepas.



Figura 4.

Placa Petri con medio enriquecido de Mueller Hinton. Para la cepa *Streptococcus mutans*.



Figura 5.

Conteo de UFC de acuerdo a la observación directa en placa Petri con Agar Ogye para la cepa *Candida albicans*.

### Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados en el programa SPSS Statistics 24 (IBM, Licencia institucional Universidad Andina del Cusco). Se planteó el análisis previo de la distribución normal de las UFC mediante Prueba de Shapiro-Wilks

( $p > 0,05$ ). En el análisis descriptivo para las variables de interés se calcularon promedios y desviaciones estándar, se dividieron las muestras en bases logarítmicas mostrando Log 10 en base 3, para poder compararlos más específicamente de acuerdo a la cantidad de UFC. Se utilizaron prueba de t de Student para datos independientes por pares de acuerdo a la especie bacteriana o cepa, se consideró que el valor de  $p < 0,05$  es estadísticamente significativo.

Del mismo modo se hizo comparaciones por pares con el control positivo y Anova de un factor para probar la hipótesis planteada, tomando en cuenta el control negativo, control positivo, grupo MB y TBO.

### Aspecto ético

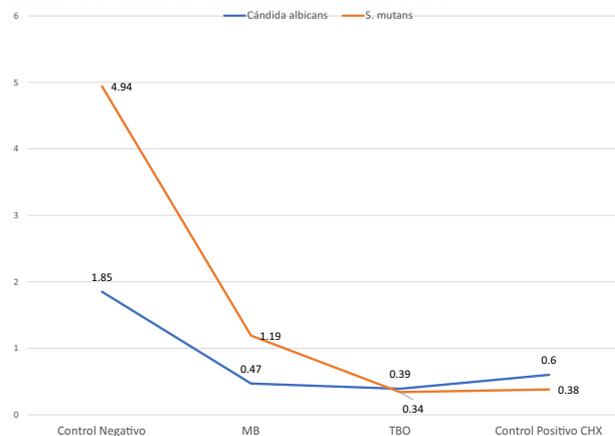
La presente investigación está adherida a las normas de Helsinki para la investigación en sujetos por pares de acuerdo a la especie bacteriana o cepa tos humanos. Sin embargo no se contemplan aspectos éticos en vista que el análisis en su totalidad fue desarrollado por cepas ATCC o de referencia, así mismo el desarrollo del biofilm fue desarrollado in vitro, logrando así los objetivos del presente estudio.

En cuanto a los bloques de esmalte, se recolectaron piezas extraídas por colegas odontólogos que las tenían almacenadas lo cual se consideró como material inerte que de acuerdo a las normas éticas el retiro de las piezas dentaria no fue en perjuicio del paciente sino todo lo contrario (caries, infección o motivos terapéuticos ortodónticos), salvaguardando el principio de Beneficencia de estos. No fue posible solicitar consentimiento para el uso de sus muestras en vista de que el tratamiento fue realizado anteriormente.

## RESULTADOS

Se muestra que el efecto fotodinámico de Azul de metileno (MB) y Azul de toluidina (TBO) in vitro, reduce el crecimiento bacteriano comparado con el control negativo y control positivo (gráfico 1). Así mismo la *C. albicans* y el *Streptococcus mutans* mostraron menor crecimiento en el grupo TBO en comparación con el Control positivo ( $p < 0,05$ ), (Tabla 1).

Gráfico 1. Medias de Crecimiento Bacteriano de *S. mutans* y *Candida albicans*, pos irradiación de MB, TBO, control Negativo v CHX (control positivo) log 103.



\*\**Candida Albicans* / ANOVA ( $p < 0,05$ )  
\**S. mutans* / ANOVA ( $p < 0,05$ )

**Tabla 1. Prueba estadística T de Student por pares de crecimiento microbiano de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans* pos irradiación de solución fotosensible MB y TBO con CHX (control positivo) log10<sup>3</sup>.**

		(Media ± Ds) UFC	p-valor*
<i>Candida albicans</i>	MB 0,01% (n=6)	0,47 ±0,121	0,159
	CHX 0,12 % (n=3)	0,60 ±0,1	
	TBO 0,05% (n=4)	0,39 ±0,097	
	CHX 0,12 % (n=3)	0,60±0,1	
<i>Streptococcus mutans</i>	MB 0,01% (n=19)	1,19±0,84	0,216
	CHX 0,12 % (n=2)	0,38±0,023	
	TBO 0,05% (n=2)	0,34±0,001	
	CHX 0,12 % (n=2)	0,38±0,023	

\* T de student, MB: Azul de Metileno al 0,01% CHX: Gluconato de clorhexidina al 0,12% TBO: Azul de toluidina 0,05%, UFC(x10<sup>3</sup>)

Al hacer el análisis de los grupos de las dos soluciones fotodinámicas se encontró que no existen diferencias para la *Candida* (p>0,05), pero si se encontró diferencias estadísticas en el crecimiento bacteriano *Streptococcus mutans* donde el TBO tiene mejor efecto esta bacteria en comparación con el MB (Tabla 2).

**Tabla 2. Prueba estadística T de Student por pares de crecimiento bacteriano de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans* pos irradiación de solución fotosensible MB comparado con TBO expresado en log10<sup>3</sup>.**

	Sustancia fotosensible	(Media ± Ds) UFC	p-valor*
<i>Candida albicans</i>	MB	0,471±0,121	0,282
	TBO	0,390±0,09	
<i>Streptococcus mutans</i>	MB	1,188±0,840	0,001
	TBO	0,337±0,001	

\* T de student; MB: Azul de Metileno al 0,01% CHX: Gluconato de clorhexidina al 0,12% TBO: Azul de toluidina 0,05%, UFC(x10<sup>3</sup>)

## DISCUSIÓN

La formación de biofilm sobre la superficie de las piezas dentarias le confiere a las bacterias que lo conforman una resistencia superlativa a la acción de antimicrobianos<sup>(18,21)</sup>, dentro de los tratamientos convencionales el tratamiento de elección en la actualidad es el enjuague bucal con contenido de clorhexidina al 0,12%, estudiado por Takenaka et al<sup>(22)</sup>, el cual indicó que existen pruebas sólidas para determinar el buen efecto antibiofilm o propiedad antibiopelícula de la CHX, este estudio es corroborado por varios autores<sup>(23-26)</sup> quienes demostraron el efecto antibiofilm del CHX sobre todo sin combinaciones. En el presente estudio se determinó el efecto de la CHX como control positivo sobre el cual se desarrolló la comparación de las diferencias de efectos de las sustancias fotosensibles MB y TBO donde se halló diferencias estadísticas en el crecimiento bacteriano luego de la aplicación de CHX y TBO en biofilm de *Streptococcus* y *Candida* (p<0,05). Asimismo, el TBO tuvo mayor efecto en la reducción del crecimiento bacteriano que el control positivo (CHX) (p<0,05).

Las dosis empleadas de las sustancias fotosensibles fueron de

0,01% de MB<sup>(8,27,28)</sup>, referente a la concentración utilizada<sup>(29)</sup> realizo un estudio en el cual determino que la efectividad antibacteriana del MB no depende de la concentración, sin embargo se recomienda esta concentración como la más efectiva. El TBO fue utilizado en una concentración de 0,05%<sup>(30,31)</sup> estas soluciones utilizadas son fotoactivadas con Luz laser rojo de baja potencia. El efecto de la luz láser se determina cuando un fotosensibilizador es estimulado por su longitud de onda óptima y se convierte del estado de baja energía a un estado triple de vida media alta y altamente energizado, lo que resulta en una reacción entre el fotosensibilizador, las moléculas ambientales y el oxígeno extracelular que conduce a la producción de oxígeno singlete y otros radicales libres que causan daño tisular<sup>(32)</sup>, en el presente estudio se utilizó laser de baja potencia con longitud de onda 660nm ±10nm (100mW±20%) demostrando la efectividad de este en el crecimiento bacteriano de las cepas del biofilm, en los diversos estudios<sup>(32)</sup> mencionados se puede evidenciar diferentes longitudes de onda sin embargo todas coinciden en luz visible con una longitud de onda equivalente<sup>(30)</sup> o cercana<sup>(33)</sup> (630nm), El efecto antimicrobiano se da por la producción de Especies Reactivas de oxígeno donde oxígeno singlete es el principal responsable en la muerte de las células microbianas<sup>(33,34)</sup>.

El MB es una de las sustancias más utilizadas en la terapia fotodinámica, existen estudios donde ya se aplica la concentración utilizada en diversos tratamientos como coadyuvante al tratamiento periodontal<sup>(35,36)</sup>, sin embargo todavía aparecen estudios in vitro donde se muestra mejor efectividad de otras sustancias fotosensibilizadores<sup>(32,33)</sup>, de todas formas está demostrado su efecto fotodinámico en contra de las bacterias componentes de biofilm<sup>(37,38)</sup> sin embargo se necesitan más estudios para evidenciar su verdadera potencia antibiofilm.

En el presente estudio se determinó que el TBO presenta mejor efecto antimicrobiano sobre el *S Mutans* en el grupo Log 103 de UFC (p<0,05), el mismo resultado se presenta en el estudio de Misba<sup>(39)</sup> que determinó una reducción de bioformación de 49% para el TBO en comparación del 39% de MB.

Darmani y col.<sup>(40)</sup> encontró reducción en el crecimiento de microorganismos como *S mutans* por efecto de TBO,<sup>(30)</sup> encontró una reducción de crecimiento de *S mutans* es mejor pero a una irradiación de 180J/cm2 en comparación con el nuestro que solo 9J/cm2=90 segundos. Otro estudio<sup>(33)</sup>, utilizo una dosis de 5J/cm2.. Existe evidencia para determinar que la concentración de la irradiación de la Luz podría aumentar el efecto del fotosensibilizador<sup>(32)</sup>, no existe evidencia de la efectividad de la Luz laser roja y Otras fuentes de luz como el led azul.

Todos los hallazgos deben interpretarse con cautela, una de las limitaciones en el estudio fue el recuento directo de las UFC realizadas por el especialista, que, al no contar con un equipo contador de colonias, se sujeta a error humano.

Se concluye que tanto el MB y TBO muestran en laboratorio, una disminución en el crecimiento de las cepas del biofilm, el TBO mostró mejor efecto a la reducción de crecimiento del *S. mutans* y *C. albicans* frente al control positivo y MB.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ding C, Zhang F, Gao Y, Li Y, Cheng D, Wang J, et al. Antibacterial Photodynamic Treatment of Porphyromonas gingivalis with Toluidine Blue O and a Non-Laser Red Light Source Enhanced by Dihydroartemisinin. *Photochem Photobiol.* 2021;97(2):377-84. DOI: <https://doi.org/10.1111/php.13333>.
- Romaní J. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Unexplored New Field. *Actas Dermosifiliogr.* 2017;108(6):500. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2017.01.012>.
- Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: A critical review. *Laser Physics.* 2016;26(12):1-23. DOI: 10.1088/1054-660X/26/12/123001.
- Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol* [Internet]. 2014 [citado el 27 de diciembre de 2020]; 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00405>.
- Negrón M, Molgatin S. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires: Panamericana; 2018.
- Marsh P, Martin MV, Lewis MAO, Williams DW. Microbiología oral. 5ª ed. Caracas: Amolca; 2011.
- Nazar C J. Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello* [Internet]. 2007 [citado el 27 de diciembre de 2018];67(1):161-72. DOI: 10.4067/S0718-48162007000100011.
- Méndez DAC, Gutierrez E, Dionisio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci.* 2018;33(3):479-87. DOI: 10.1007/s10103-017-2379-3.
- Saito Y, Fujii R, Nakagawa K-I, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of Fusobacterium nucleatum biofilm formation by Porphyromonas gingivalis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(1):1-6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00380.x>.
- Salli KM, Ouweland AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2015 [citado el 23 de junio de 2021];7. DOI: 10.3402/jom.v7.26149.
- Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranyake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res* [Internet]. 2011;14(2):87-94. Disponible en: <https://www.quintessence-publishing.com/deu/en/article/851685>
- Silva Teófilo MÍ, de Carvalho Russi TMAZ, de Barros Silva PG, Balhaddad AA, Melo MAS, Rolim JPML. The Impact of Photosensitizer Selection on Bactericidal Efficacy Of PDT against Cariogenic Biofilms: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* marzo de 2021; 33: 102046. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102046>.
- 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. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [Internet]. 2005 [citado el 10 de mayo de 2019];2(3):175-91. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
- Pereira AC, Romeiro RL, Costa ACBP, Machado AKS, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of Candida albicans, Staphylococcus aureus, and Streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2011 [citado el 16 de enero de 2019];26(3):341-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0852-3>.
- Fumes AC, Romualdo PC, Monteiro RM, Watanabe E, Corona SAM, Borsatto MC. Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy with diode laser. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018 [citado el 10 de mayo de 2019];33(1):67-73. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2336-1>.
- Rout B, Liu C-H, Wu W-C. Increased anti-biofilm efficacy of toluidine blue on Staphylococcus species after nano-encapsulation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [Internet]. 2018 [citado el 17 de febrero de 2020];21:190-200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.007>.
- Tseng S-P, Hung W-C, Chen H-J, Lin Y-T, Jiang H-S, Chiu H-C, et al. Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [Internet]. 2017 [citado el 17 de febrero de 2020];50(1):46-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.12.007>.
- Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2ª. Madrid: Interamericana-McGraw Hill; 2010. 677 p.
- Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on Enterococcus faecalis biofilm in dentin. *J Endod.* 2011;37(3):363-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.036>.
- Darrene L-N, Cecile B. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [citado el 22 de marzo de 2021];2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7461047>.
- Samaranyake L. Essential Microbiology for Dentistry - E-Book. [Internet]. Philadelphia: Elsevier; 2018 [citado el 25 de junio de 2021]. Disponible en: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5434802>.
- Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2019 [citado el 21 de junio de 2021]; 55(1): 33-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.07.001>.
- Casarin M, Pazinato J, Oliveira LM, Souza ME de, Santos RCV, Zanatta FB. Anti-biofilm and anti-inflammatory effect of a herbal nanoparticle mouthwash: a randomized crossover trial. *Braz Oral Res.* 2019;33:e062. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0062>.
- Jeyakumar J, Sculean A, Eick S. Anti-biofilm Activity of Oral Healthcare Products Containing Chlorhexidine Digluconate and Citrox. *Oral Health Prev Dent.* 2020;18(1):981-90. DOI: 10.3290/j.ohpd.a45437.
- Scheibler E, da Silva RM, Leite CE, Campos MM, Figueiredo MA, Salum FG, et al. Stability and efficacy of combined nystatin and chlorhexidine against suspensions and biofilms of Candida albicans. *Arch Oral Biol.* 2018; 89: 70-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.009>.
- Santos GO dos, Milanese FC, Greggiani BF, Fernandes MI, Oppermann RV, Weidlich P. Chlorhexidine with or without alcohol against biofilm formation: efficacy, adverse events and taste preference. *Braz oral res* [Internet]. 2017 [citado el 22 de junio de 2021];31. DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0032.
- Fumes AC, da Silva Telles PD, Corona SAM, Borsatto MC. Effect of aPDT on Streptococcus mutans and Candida albicans present in the dental biofilm: Systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:363-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.01.013>.
- Nemezio MA, de Souza Farias SS, Borsatto MC, Aires CP, Corona SAM. Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a Streptococcus mutans biofilm model. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;20:234-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.025>.
- Nie M, Deng DM, Wu Y, de Oliveira KT, Bagnato VS, Crielaard W, et al. Photodynamic inactivation mediated by methylene blue or chlorin e6 against Streptococcus mutans biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;31:101817. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101817.
- Balhaddad AA, AlQranei MS, Ibrahim MS, Weir MD, Martinho FC, Xu HHK, et al. Light Energy Dose and Photosensitizer Concentration Are Determinants of Effective Photo-Killing against Caries-Related Biofilms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):E7612. DOI: 10.3390/ijms21207612.
- Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [Internet]. 2007 [citado el 13 de septiembre de 2021];86(1):59-69. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2006.07.011.
- Azizi A, Shohrati P, Goudarzi M, Lawaf S, Rahimi A. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on streptococcus mutans bacterial colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:203-9. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.06.002.
- Misba L, Zaidi S, Khan AU. Efficacy of photodynamic therapy against Streptococcus mutans biofilm: Role of singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B.* 2018; 183: 16-21. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.024.
- Wiench R, Skaba D, Matys J, Grzech-Leśniak K. Efficacy of Toluidine Blue-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Candida spp. A Systematic Review. *Antibiotics* [Internet]. abril de 2021 [citado el 13 de septiembre de 2021];10(4):349. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040349>.
- Carvalho VF, Andrade PVC, Rodrigues MF, Hirata MH, Hirata RDC, Pannuti CM, et al. Antimicrobial photodynamic effect to treat residual pockets in periodontal patients: a randomized controlled

- clinical trial. J Clin Periodontol. 2015;42(5):440-7. DOI: 10.1111/jcpe.12393.
36. Balata ML, Andrade LP de, Santos DBN, Cavalcanti AN, Tunes U da R, Ribeiro ÉDP, et al. Photodynamic therapy associated with full-mouth ultrasonic debridement in the treatment of severe chronic periodontitis: a randomized-controlled clinical trial. J Appl Oral Sci. 2013;21(2):208-14. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-7757201302366>.
  37. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. Critical Reviews in Microbiology [Internet]. 2018 [citado el 28 de diciembre de 2018];44(5):571-89. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
  38. Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal M, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiology [Internet]. 2015 [citado el 2 de febrero de 2019];15(1):187. DOI: 10.1186/s12866-015-0524-3.
  39. Misba L, Abdulrahman H, Khan AU. Photodynamic efficacy of toluidine blue O against mono species and dual species bacterial biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;26:383-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.001>.
  40. Darmani H, Tawalbeh KH, Al-Hiyasat AS, Al-Akhras M-A. Comparison of the Photosensitivity of Biofilms of Different Genera of Cariogenic Bacteria in Tooth Slices. Pol J Microbiol. 2018;67(4):455-62. DOI: 10.21307/pjm-2018-053.