



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ANDREZA RIBEIRO FERRAZ**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA  
SOBRE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À CÁRIE DENTÁRIA**

PIRACICABA

2020

**ANDREZA RIBEIRO FERRAZ**

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA  
SOBRE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À CÁRIE DENTÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Doutoranda Alejandra Del Carmen Brenes Alvarado

Coorientador: Prof(a). Dr(a). Carolina Steiner Oliveira Alarcon

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA ANDREZA RIBEIRO FERRAZ ORIENTADA PELA DOUTORANDA ALEJANDRA DEL CARMEN BRENES ALVARADO.

PIRACICABA

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

F413e Ferraz, Andreza Ribeiro, 1996-  
Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre microrganismos associados à cárie dentária / Andreza Ribeiro Ferraz. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Alejandra del Carmen Brenes Alvarado.  
Coorientador: Carolina Steiner Oliveira Alarcon.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilmes. 2. Cárie dentária. 3. Fotoquimioterapia. 4. Lasers. I. Brenes Alvarado, Alejandra del Carmen, 1981-. II. Steiner-Oliveira, Carolina, 1981-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

### Informações adicionais complementares

#### **Palavras-chave em inglês:**

Biofilms

Dental caries

Photochemotherapy

Lasers

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 27-11-2020

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, pois sem Ele nada do que conquisei até agora seria possível, a cada empecilho que superava sentia que estava ao meu lado. À minha família, a qual sempre me apoiou em todos os momentos. E, em especial, à minha querida avó, que se ainda estivesse neste mundo estaria muito orgulhosa de todos nós.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº: 2019/22450-4.

Ao Programa de Formação Interdisciplinar Superior (ProFIS) que permitiu meu ingresso nesta Universidade, meu eterno carinho por esse lindo programa.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do atual reitor Marcelo Knobel, por todas as oportunidades e pelos programas de permanência estudantil, os quais permitiram minha permanência na faculdade.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pelas oportunidades de aprendizado.

À minha orientadora, Alejandra Del Carmen Brenes Alvarado, a qual me ajudou em todos os passos deste trabalho, teve paciência de me explicar cada dúvida até que eu finalmente entendesse e que me acalmou nos momentos em que achei não ter capacidade de continuar. Agradeço por todo o auxílio, atenção e por ajudar a conduzir este trabalho diante de todas as limitações e dificuldades. Muito obrigada, você é uma excelente professora!

À professora Carolina Steiner Oliveira Alarcon, por ter me aceito como aluna de Iniciação Científica, pela oportunidade de trabalhar em um projeto com a senhora, pela inspiração por ser uma profissional tão dedicada e que ama o que faz, por todo aprendizado ao longo desses anos durante as aulas e nos atendimentos clínicos. Obrigada até pelos “puxões de orelha”, os quais me impulsionaram a estudar e aprender cada vez mais e por tudo o que ainda está por vir, afinal ainda temos um projeto para terminar. Agradeço de coração por esta oportunidade, a senhora é um exemplo de profissional!

Aos meus professores do Ensino Médio, Jeferson e Severina, sem os quais eu não teria desenvolvido a capacidade para chegar até aqui. Obrigada por acreditarem no meu potencial e por me impulsionarem a ir adiante, mesmo quando eu não queria estudar.

Ao meu monitor do PIC-Jr, Paulo Blade, o qual foi o primeiro a me mostrar esse mundo da pesquisa de forma leve, engraçada e enriquecedora. Eu nunca mais ouvirei falar sobre genética sem lembrar de você.

Aos meus pais que me ajudaram e me deram suporte durante todos os anos da faculdade, que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e objetivos e sempre acreditaram em mim, me dando forças e me impulsionando a nunca desistir. Obrigada por tudo o que vocês fizeram, nunca terei palavras para agradecer tudo o que vocês fazem por mim. Espero um dia poder recompensar pelo menos um pouco de todo esse sacrifício. Amo muito vocês.

Aos meus queridos irmãos por sempre abastecerem meu estoque de energético e à minha irmãzinha por sempre tirar minha concentração da pesquisa para mostrar vídeos engraçados (neste exato momento em que escrevo está me mostrando bichinhos fofos e tubarões) e por me levar lanchinhos da madrugada, sem vocês teria sido muito mais difícil. Obrigada por ajudarem a manter minha sanidade mental. Amo vocês.

Ao restante da minha família, tios, tias e primos, que sempre torceram pelo meu sucesso. Obrigada por todas as mensagens e conversas de incentivo, amo vocês.

Às minhas amigas de Piracicaba por estarem ao meu lado todos esses anos, pelas conversas na escadinha da faculdade, pelos longos períodos de procrastinação, pelos desabafos e surtos compartilhados, pelas palavras de incentivo sempre que eu precisava e por nunca desistirem de mim, mesmo quando eu não respondia as mensagens. Amo cada uma de vocês com todo meu coração, obrigada por fazerem esse período muito mais feliz.

“Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã, porque o dia de amanhã cuidará de si mesmo. Basta a cada dia o seu mal”

Mateus 6:34

## RESUMO

Conceitos mais atuais sobre o controle da doença cárie visam o uso de técnicas minimamente invasivas. Dentre elas, o controle do consumo de sacarose, controle de biofilme, uso de produtos fluoretados e a remoção seletiva de tecido cariado, quando a dentina remanescente ainda é passível de remineralização após vedamento adequado com a restauração do dente. Entretanto, essa dentina preservada, está contaminada com bactérias no interior da lesão, podendo propiciar meios para que enzimas proteolíticas do hospedeiro se tornem ativas e degradem a matriz colágena da dentina. Entre outras terapias antimicrobianas, a terapia fotodinâmica se destaca por promover redução de microrganismos e, ao mesmo tempo, não propiciar resistência bacteriana, podendo ser um aliado ao tratamento da doença cárie tanto de forma preventiva quanto no tratamento de dentina cariada. Este tratamento utiliza um agente fotossensibilizador, que quando ativado por uma luz visível de comprimento de onda específico e na presença de oxigênio, pode gerar radicais livres de oxigênio que são capazes de promover morte celular. Diversos fotossensibilizadores e parâmetros de luz têm sido avaliados, no entanto, ainda não foi determinado um protocolo anticariogênico específico. Assim, novas alternativas surgem com o intuito de padronizar e melhorar o uso desse tipo de terapia, sendo algumas delas o uso de sais inorgânicos, nanopartículas, novos fotossensibilizadores e outros aliados. No presente trabalho, consideraremos os conhecimentos atuais do efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre microrganismos associados à carie dentária.

**Palavras-chave:** Biofilmes. Cárie Dentária. Fotoquimioterapia. Lasers.

## ABSTRACT

Recent trends on caries control are based on minimally invasive techniques such as sucrose intake control, biofilm removal, use of fluoridated products and selective caries removal prior to tooth restoration, considering when reminescent infected dentin can be re-mineralized with an adequate sealing. However, the preserved dentin is still contaminated by bacteria that could activate endogenous proteolytic enzymes that could cause degradation of the collagenic matrix of dentin. Among other antimicrobial therapies, the photodynamic therapy (PDT) can be highlighted as it promotes microbial reduction, while avoiding the development of bacterial resistance, hence appearing as a promising treatment for caries prevention and for disinfection of carious dentin. PDT uses a photosensitizing agent that after activation by light at a specific wavelength and in the presence of oxygen, produces free oxygen radicals that promote bacterial death. Several photosensitizers and light sources have been evaluated; however, a specific anticariogenic protocol for PDT in cavity disinfection has not been established. Hence, research has explored several options, trying to standardize this procedure, while improving the efficacy by studying new photosensitizers, the addition of inorganic salts and nanoparticles. This manuscript will review the current knowledge on the effects of antimicrobial PDT on caries associated microorganisms.

**Key Words:** Biofilms. Dental Caries. Photochemotherapy. Lasers.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Cárie dentária	14
3.1.1 Biofilmes e microrganismos associados à cárie dentária	14
3.1.2 Formação e progressão da lesão cariosa	16
3.1.3 Abordagem conservadora de lesões cariosas e desinfecção de cavidades	17
3.2 Lasers em odontologia	20
3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)	20
3.3.1 Aplicações da TFDa	21
3.3.2 Mecanismo de ação da TFDa	22
3.4 Efeito da TFDa em biofilmes cariogênicos	25
3.5 Efeito da TFDa em dentina cariada	31
3.6 Novas abordagens com a TFDa	34
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	61
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	61
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	62
Anexo 3 – Iniciação Científica	63

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença que apresenta uma alta prevalência no Brasil e no mundo todo. Ao nível mundial, segundo Kassebaum e colaboradores (2017), para o ano 2015, a doença bucal mais prevalente foi a cárie dentária em dentes permanentes, sem tratamento, afetando 2,5 bilhões de pessoas. Este estudo relatou que a saúde bucal não melhorou no período de 1990 a 2015, devido a demanda não atendida de tratamento odontológico, com 3,5 bilhões de pessoas com doenças bucais não tratadas (Kassebaum et al., 2017). No Brasil, segundo o levantamento epidemiológico de 2010 do Ministério da Saúde, a prevalência de cárie na dentição decídua aos 5 anos é de 53,4%, aumenta a 56,5% na dentição permanente aos 12 anos, e continua aumentando drasticamente com a idade durante a adolescência (76,1%) e fase adulta (99,1%) até praticamente 100% na velhice entre 65 e 74 anos (Ministério da Saúde, 2012).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, açúcar-biofilme dependente, caracterizada por um processo de desmineralização e remineralização dos tecidos mineralizados do dente (Pitts et al., 2017). Para seu desenvolvimento é necessário o desequilíbrio na interação de vários fatores, incluindo superfície dentária, saliva, micro-organismos específicos organizados em um biofilme, dieta e tempo (Fejerskov, 1997; Murdoch-Kinch e McLean, 2003; Pitts et al., 2017), assim como outros fatores comportamentais e socioeconômicos (Fejerskov, 1997). Uma alta frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis e uma higiene bucal ineficiente provocam a instalação da doença iniciando-se a formação de lesões cariosas. Quando os fatores de risco não são controlados, a progressão da doença passa por vários estágios e culmina na formação de uma cavitação, comprometimento pulpar e a perda do dente, se não tratada (Pitts et al., 2017).

Sendo esta uma doença açúcar-biofilme dependente, os esforços devem ser dirigidos ao controle de acúmulo de biofilme e da ingestão de carboidratos. No entanto, terapias que dependem da colaboração do paciente nem sempre são capazes de controlar as doenças bucais (Løe, 2000). Uma vez desenvolvidas lesões de cárie, é necessário controlar sua progressão analisando sua atividade, sua profundidade e planejando o tratamento mais adequado para reter o dente pelo maior tempo na cavidade bucal, além de observar os riscos de desenvolver novas lesões (Schwendicke et al., 2016). Em acréscimo, atualmente, com a aplicação de critérios de mínima intervenção, é preconizada a remoção seletiva de tecido cariado, retirando apenas o tecido necessário para melhorar a durabilidade e sucesso do tratamento restaurador, preservando tecido passível de ser remineralizado. Em casos de lesões muito profundas, próximas à polpa, recomenda-se deixar tecido amolecido, a fim de minimizar o risco de exposição pulpar (Innes et al., 2016). Com o selamento adequado das

margens da restauração, cessa-se a exposição de nutrientes às bactérias restantes, aumentando assim a longevidade do dente ao propiciar meios para que o paciente consiga realizar escovação e utilizar o fio dental, preservando o máximo de estrutura dentária possível e diminuindo os custos de tratamento ao evitar danos pulpares (Innes et al., 2016). No entanto, as bactérias remanescentes podem servir como meios de ativação de metaloproteínases da matriz da dentina (MMPs) e catepsinas, as quais têm potencial para degradar matriz orgânica de dentina, podendo levar a progressão da lesão e, conseqüentemente, a danos pulpares, assim como podendo afetar também a adesão e longevidade das restaurações (Mazzoni et al., 2015; Takahashi e Nyvad, 2016). Dessa forma, existem alternativas que auxiliam tanto na desinfecção de dentina cariada remanescente após uma remoção seletiva, quanto na prevenção, atuando no biofilme.

Como um auxílio químico à remoção mecânica do biofilme e como uma alternativa a antimicrobianos, existem, atualmente, algumas terapias antimicrobianas aplicáveis, como a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa). Ela pode ser uma alternativa eficiente para a prevenção, reduzindo a formação de biofilme cariogênico (de Oliveira et al., 2019), combatendo infecções causadas por acúmulo de biofilme (Williams et al., 2004; Cieplik et al., 2014) e também como uma nova abordagem antimicrobiana, no caso do estabelecimento e progressão de lesões cáries (Wilson, 2004; Steiner-Oliveira et al., 2015). Estudos indicam que a terapia reduz significativamente, em biofilmes dentários, a contagem de bactérias associadas ao desenvolvimento de lesões cáries (Cieplik et al., 2014; De Freitas et al., 2017). Após a lesão ter progredido para o tecido dentinário, a terapia pode auxiliar na desinfecção da cavidade, diminuindo a quantidade de bactérias remanescentes após a remoção seletiva do tecido cariado (Melo et al., 2015; Steiner-Oliveira et al., 2015; Méndez et al., 2017). Isto pode ser importante em lesões profundas, em que o tecido cariado está muito próximo a polpa, e uma remoção excessiva pode lesionar o tecido pulpar (Innes et al., 2016). Além disto, possui baixa probabilidade de desenvolver resistência bacteriana devido a forma que age nos microrganismos, atingindo irreversivelmente o metabolismo celular e danificando estruturas essenciais ao funcionamento das bactérias. Ademais, os benefícios ainda abrangem uma atividade relativamente rápida, improbabilidade de danos aos tecidos vizinhos e não perturbação da microbiota habitual (Wilson et al., 1992; Williams et al., 2004; Cieplik et al., 2014; Vecchio et al., 2015; De Freitas et al., 2017).

A TFDa consiste na aplicação de um fotossensibilizador que, na presença de um feixe de luz com um determinado comprimento de onda, age provocando a formação de radicais livres de oxigênio, tóxicos para as células bacterianas no biofilme (Vecchio et al., 2015; De Freitas et al., 2017). Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados no estudo de

biofilmes cariogênicos estão o azul de metileno e o azul de toluidina (De Freitas et al., 2017), os quais atuam produzindo espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, que é um dos principais mecanismos de toxicidade bacteriana na terapia fotodinâmica (Wilson, 2004; Teixeira et al., 2012; Vecchio et al., 2015; Vieira et al., 2018). Entretanto, estudos *in vitro* demonstram redução nas contagens bacterianas viáveis em biofilme de *S. mutans* em relação ao controle negativo, quando da aplicação TFDa com azul de metileno, mas que não atingem os mesmos valores quando comparado com outras terapias como a clorexidina (De Freitas et al., 2017; Nemezio et al., 2017). No caso de estudos *in vivo* (Guglielmi et al., 2011; Steiner-Oliveira et al., 2015; Ornellas et al., 2018; Alves et al., 2019) também foi observada a diminuição bacteriana quando aplicada a TFDa, porém apresentando valores menores a 3 log de redução microbiana, considerado parâmetro de sucesso nesse tipo de terapia (Cieplik et al., 2014; Melo et al., 2015). Por último, devido à ampla variedade de fotossensibilizadores e fontes de luz testados, ainda não há um protocolo definido quanto aos melhores tempos de pré-irradiação e irradiação para este tipo de terapia (Fumes et al., 2018).

Dessa maneira, novas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito tanto de melhorar o efeito da TFDa quanto de estabelecer um protocolo definido, por meio da adição de adjuvantes. Entre alguns dos que têm sido testados se encontram as nanopartículas de ciclodextrina (Sales et al., 2019; Vasconcelos et al., 2019), peróxido de hidrogênio (Sales et al., 2019), novos fotossensibilizadores como a associação de Papacarie com Urucum (Silva Jr et al., 2020) e *Diacetylcurcumin* (Sanches et al., 2019), e sais inorgânicos que potencializam o efeito dos fotossensibilizadores (Hamblin, 2017). Dentre eles, o iodeto de potássio (KI) adicionado ao azul de metileno (Vecchio et al., 2015) ou outros fotossensibilizadores catiônicos (Vieira et al., 2018).

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi analisar, através de revisão da literatura, o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre microrganismos associados à cárie dentária, estudados em biofilmes e dentina cariada.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Cárie dentária

A cárie dentária é definida atualmente como uma doença multifatorial, não transmissível, mediada por biofilme e modulada pela dieta do indivíduo, sendo o consumo de sacarose um fator determinante para o desenvolvimento da doença (Pitts et al., 2017; MacHiulskiene et al., 2020). Além disso, a doença é dinâmica, favorecendo a formação da lesão cariosa, como resultado de diversas fases de desmineralização (perda líquida de minerais de tecidos duros dentais) e remineralização (precipitação de minerais dos meios supersaturados) devido às variações de pH do biofilme (Leme et al., 2006). Entre os fatores que a determinam, podem ser citados fatores biológicos, ambientais, comportamentais e psicossociais, resultando na associação e desequilíbrio deles, no desenvolvimento de lesões cariosas (Fejerskov, 1997; Murdoch-Kinch e McLean, 2003; Pitts et al., 2017). A estrutura dental exposta ao acúmulo de biofilme, a capacidade tampão da saliva, assim como aos hábitos de dieta e higiene do indivíduo durante um período de tempo determinam o desenvolvimento e progressão da lesão cariosa, seja no esmalte, na dentina coronária e radicular hígidos ou ao redor de restaurações (Pitts et al., 2017).

O esmalte dental é o tecido mais mineralizado do corpo humano, composto aproximadamente por 80 a 90% de minerais, os quais são constituídos por cristais de hidroxiapatita (Angmar et al., 1963; Robinson et al., 1971; Elliott, 1997) e os 10 a 20% restantes de matéria orgânica e água (Robinson et al., 2000). Já a dentina, possui aproximadamente 70% de porção inorgânica (cristais de hidroxiapatita), 20% orgânica (principalmente colágeno) e 10% de água (Goldberg et al., 2011). Devido a essas características, a dentina se torna mais suscetível à desmineralização pelos ácidos produzidos pelas bactérias que compõem o biofilme (Hoppenbrouwers et al., 1987; Moreno e Aoba, 1991).

##### **3.1.1 Biofilmes e microrganismos associados à cárie dentária**

Biofilmes, de forma geral, são constituídos por diversos microrganismos em um ambiente líquido que se aderem em superfícies duras não descamativas e crescem envolvidos por uma matriz extracelular (Costerton et al., 1994; Costerton, 1995; Marsh e Bradshaw, 1995). A definição mais atual e que melhor define biofilme dental é uma associação de microrganismos, embebidos em uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, que se aderem na superfície do dente (MacHiulskiene et al., 2020).

A microbiota que compõe os biofilmes orais é formada de acordo com as características do meio. Aqueles que se formam supragengivalmente possuem microrganismos com características aeróbicas obrigatórias ou facultativas. Já os formados subgengivalmente, como há carência de oxigênio, possuem mais bactérias anaeróbicas obrigatórias ou facultativas, com fraca capacidade de adesão e frequentemente móveis (Robinson et al., 2000). Ainda há a escolha do local dependendo da quantidade e do tipo de nutrição que chegará; nas superfícies interproximais há menor acesso aos nutrientes do que nas superfícies vestibular e oclusal, porém a autolimpeza pela saliva é dificultada nessas áreas possibilitando uma maior chance de sobrevivência (Robinson et al., 2000). A formação de biofilme mais espesso ocorre principalmente em tecidos que não possuem renovação celular e, portanto, não descamam, como os dentes, as próteses (fixas e removíveis) e materiais restauradores (Gibbons e Houte, 1973), podendo provocar doenças orais quando não removidos.

O biofilme, composto por microrganismos capazes de metabolizar carboidratos fermentáveis e produzir ácidos que desmineralizam a estrutura dental pode ser modificado pela frequência e tipo de carboidrato consumido, alterando a sua composição e estrutura, aumentando o seu potencial cariogênico, determinando o tipo de bactéria e características do biofilme com potencial para desenvolver lesões cáries (Loesche, 1986). Estas características são determinadas por um alto e frequente consumo de carboidratos, principalmente de sacarose (Leme et al., 2006; Van Loveren, 2019) junto com deficientes hábitos de higiene bucal quer seja de forma mecânica, por meio da escovação dental ou de forma química, por meio de substâncias que interferem no metabolismo das bactérias cariogênicas (Pitts et al., 2017; Van Loveren, 2019).

Os primeiros microrganismos que se aderem à superfície dental possuem receptores em seu exterior que interagem com uma camada de glicoproteínas salivares que estão aderidas na superfície do dente exposta à saliva, chamada de película adquirida, tornando possível a adesão inicial (Robinson et al., 2000). A partir desses microrganismos específicos (como o *Streptococcus Mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*) outros se aderem a eles; há produção de uma matriz extracelular (composta por polissacarídeos produzidos pelas bactérias, outras macromoléculas e elementos derivados da saliva e fluido gengival) e multiplicação dos que melhor se adaptaram àquela condição a que estão expostos. Isto torna esses microrganismos, que vivem em comunidade, mais protegidos da ação do organismo hospedeiro comparados àqueles que estão isolados, tornando possível o espessamento desse biofilme (multiplicação bacteriana) e a maior resistência a agentes antibacterianos (Robinson et al., 2000). Esta resistência ocorre devido

à dificuldade de difusão do agente antimicrobiano ao longo de todo o biofilme; a diversidade de microrganismos resistentes e sua taxa de crescimento lenta; e a capacidade que algumas bactérias possuem de inativar ou neutralizar o agente microbiano através de enzimas (Cieplik et al., 2014; De Freitas et al., 2017).

### **3.1.2 Formação e progressão da lesão cariosa**

O acúmulo de biofilme por tempo prolongado, assim como a exposição deste biofilme aos açúcares fermentáveis da dieta, provoca a desmineralização da estrutura dental (Pitts et al., 2017). As lesões de cárie dentária são iniciadas, geralmente, em superfícies supragengivais, especialmente nas superfícies com sulcos, fóssulas e fissuras, pois a colonização destes locais ocorre por microrganismos mais específicos e dificulta a remoção deles (Carvalho et al., 1989). A colonização ocorre primeiramente por microrganismos aeróbicos, capazes de aderir à película adquirida. À medida que essa comunidade inicial vai aumentando, há cada vez menos oxigênio nesse biofilme e os microrganismos são substituídos por espécies que precisam de menos oxigênio para sobreviver, os anaeróbios facultativos. Um dos microrganismos mais importantes e prevalentes no desenvolvimento das lesões cariosas é o *Streptococcus mutans*, uma bactéria anaeróbica facultativa com capacidade de manter-se em íntimo contato com as superfícies do dente, inclusive as lisas livres, e de produzir ácidos em maior velocidade que outros patógenos da doença, sendo o maior responsável por iniciar a desmineralização dentária (Hamada e Slade, 1980; Loesche, 1986; Caufield et al., 1990). Essa espécie é considerada acidogênica (produtora de ácido) e acidúrica (capaz de tolerar ambientes ácidos), além da capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares que alteram a composição e estrutura do biofilme (Leme et al., 2006). A colonização por este grupo de microrganismo ocorre muito cedo, apesar disto, a proporção na cavidade bucal é relativa à dieta do indivíduo durante a erupção dos dentes. Quando o dente está exposto desde sua irrupção à dieta rica em sacarose, os sulcos, fóssulas e fissuras terão uma proporção muito maior destes microrganismos, aumentando a chance de desenvolvimento de lesões cariosas (Frostell et al., 1967; Hamada e Slade, 1980).

Deste modo, quando o biofilme dentário é exposto a carboidratos fermentáveis, os microrganismos produzem ácidos e por consequência o pH do fluido diminui, o que perturba o equilíbrio entre o mineral do dente (hidroxiapatita) e os fluidos bucais (fluido do biofilme e saliva) (Pitts et al., 2017). Quando cessa a exposição aos carboidratos e o pH começa a aumentar, há uma resposta para manter o equilíbrio por meio de trocas iônicas, acarretando a precipitação de minerais. Isto acontece por meio da ação da saliva, que permite a reposição parcial de minerais perdidos da estrutura dental e a diluição e neutralização dos

açúcares e dos ácidos, graças a seu pH e sua supersaturação de íons cálcio e fosfato em relação aos minerais do dente (Pitts et al., 2017). Porém, o dinâmico processo de desenvolvimento das lesões cariosas consiste em mudanças constantes de períodos de remineralização e desmineralização, que quando desequilibrados, provocam a perda frequente dos minerais do dente ocorrendo a formação das lesões cariosas (Pitts et al., 2017).

### **3.1.3 Abordagem conservadora de lesões cariosas e desinfecção de cavidades**

O controle da doença cárie requer ações preventivas e interventivas que permitam a paralisação de lesões iniciais não cavitadas ou cavitadas, quando necessário (Innes et al., 2016). O grupo ICCC (*International Caries Consensus Collaboration*) redefiniu os termos relacionados à forma de tratar os pacientes com a doença cárie, acordando que o manejo da doença cárie é referente ao tratamento do indivíduo como um todo e não focando apenas no elemento dental, através de meios não invasivos (como orientação de higiene bucal, dieta, aplicação de flúor); já o manejo da lesão cariada está vinculado ao tratamento do dente (Innes et al., 2016). Desse modo, em lesões iniciais não cavitadas, é necessário o manejo da doença cárie e também da lesão cariada, por meio do controle do biofilme assim como interferindo nos processos de desmineralização e remineralização (Tellez et al., 2013; Innes et al., 2016). Após a formação da cavidade, a melhor abordagem deve ser realizada, avaliando o dente envolvido, a profundidade da lesão, os procedimentos e materiais a serem utilizados, assim como a possibilidade de remoção total ou parcial do tecido cariado envolvido (Innes et al., 2016; Schwendicke et al., 2016; Schwendicke, 2017; Ricketts et al., 2018).

Convencionalmente, o tratamento das lesões cariosas visava à remoção máxima de tecido cariado da cavidade, a fim de deixá-la o mais livre de bactérias possível, para que ocorresse a remissão completa da doença naquele órgão dentário (Keyes, 1960). A remoção não seletiva de dentina é considerada um tratamento excessivo e não mais estimulado, pois aumenta consideravelmente a chance de lesionar ou comprometer o tecido pulpar (Thompson et al., 2008; Ricketts et al., 2013; Schwendicke et al., 2013;), remove tecido duro passível de remineralização (Ngo et al., 2006) e, de acordo com o ICCC, pode aumentar a ansiedade do paciente, particularmente em crianças (Innes et al., 2016).

Diante disto, o ICCC propôs alguns princípios e termos para nortear a remoção seletiva do tecido cariado (não mais nomeada remoção parcial ou incompleta) visando preservar a maior quantidade de estrutura dentária possível, a fim de manter a saúde e vitalidade pulpar, aumentar a longevidade do dente na cavidade bucal, propiciar ambiente adequado para vedar as margens da cavidade, e evitar ansiedade do paciente, uma vez que o tratamento se torna menos invasivo e conseqüentemente mais rápido (Innes et al., 2016;

Ricketts et al., 2018). Outra das vantagens é a de evitar ou ao menos adiar o ciclo restaurador (Brantley et al., 1995).

Dependendo da extensão e profundidade da cavidade, o tecido cariado pode apresentar diversas características. De acordo com Innes e colaboradores (2016), a nível histológico, estas divisões do tecido cariado dentinário são nomeados a partir da superfície mais oclusal, como: zona necrótica, zona contaminada, zona desmineralizada, zona translúcida, dentina secundária e dentina terciária (Figura 1), as quais clinicamente apresentam-se como dentina amolecida (necrótica e contaminada), dentina descrita com textura de couro (ao mesmo tempo desmineralizada), dentina firme (translúcida) e dentina dura (secundária e terciária) (Figura 1). O grupo ICCC acordou que o termo “dentina infectada” está desatualizado, pois remete a ideia de doença transmissível. Além disso, orienta sobre a necessidade de utilizar instrumentos manuais para identificar a consistência da dentina no momento da remoção (Innes et al., 2016).

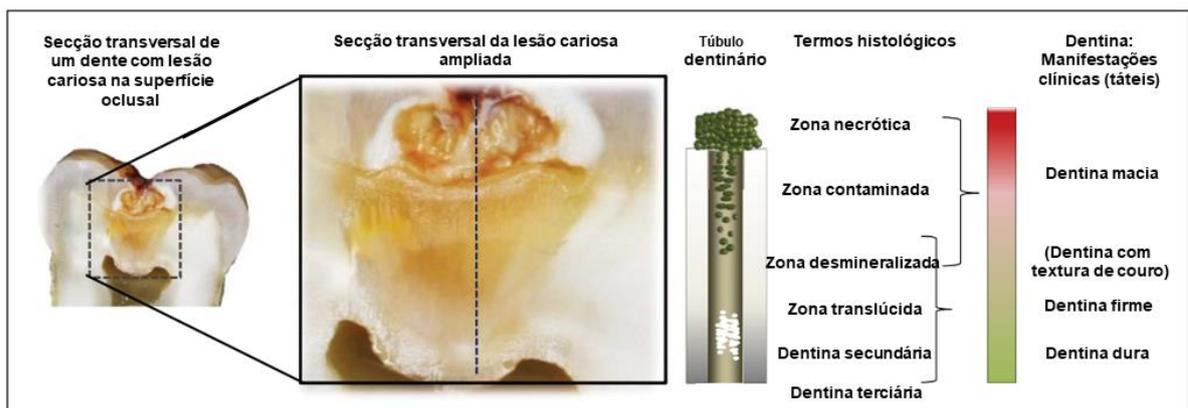


Figura 1 - Representação das zonas da lesão de cárie

Fonte: traduzido de Innes et al. (2016)

Sendo assim, para lesões moderadas a orientação é fazer remoção seletiva da dentina cariada, removendo-se apenas a dentina necrosada (Figura 1). A dentina remanescente precisa ser de consistência firme, com consistência de couro (transição entre a mole e a firme, que gera certa resistência ao remover com instrumento manual) ou firme (alguma pressão é necessária para retirá-la). Além disso, as paredes circundantes devem contar com tecido duro preservando o esmalte com sustentação nas margens da lesão, para permitir um adequado vedamento da restauração. Isto é realizado, pois, atualmente, entende-se que somente a dentina contaminada deve ser removida e aquela que é passível de remineralização, é preservada como é o caso da dentina com textura de couro e a dentina firme (Innes et al., 2016; Schwendicke et al., 2016; Schwendicke, 2017; Ricketts et al., 2018). Já em lesões mais profundas, com proximidade à polpa, recomenda-se realizar a remoção

seletiva para dentina mole (pouca força é necessária para retirá-la), evitando lesionar ou irritar indiretamente o tecido pulpar, lembrando que esta abordagem é recomendada apenas para dentes vitais assintomáticos (Innes et al., 2016).

Sabe-se que não é possível a remoção completa das bactérias, mesmo se for viável retirar todo o tecido cariado visível (Lager et al., 2003; Lennon et al., 2007, 2008). Com a remoção de dentina cariada, há diminuição na contagem total do número de bactérias, em diferentes meios de escavação, mas ainda assim existem microrganismos remanescentes (Lennon et al., 2007, 2008), mesmo na dentina dura, aquela que teoricamente estaria “livre de cárie”, quando algumas bactérias persistem (Lager et al., 2003). No entanto, outras pesquisas mostram que é inviável a multiplicação bacteriana em um ambiente desprovido de nutrientes, com uma restauração com um adequado selamento (Going et al., 1978; Oong et al., 2008) que limita o acesso das bactérias cariogênicas aos nutrientes que são utilizados como meios para a progressão da lesão (Kidd, 2004).

Além disso, sabe-se que a presença de bactérias no tecido cariado é um dos mecanismos para a degradação da dentina, favorecendo a ativação de metaloproteínases de matriz (MMPs) (Takahashi, 2015). Estudos mostram que lesões cariosas em dentina além de bactérias sacarolíticas possuem bactérias proteolíticas, como a *Prevotella* (Aas et al., 2008), a qual pode utilizar a matriz orgânica da dentina como substrato para produção de ácidos (Takahashi e Yamada, 2000; Takahashi e Sato, 2001, 2002; Takahashi, 2015). O meio ácido ativa as proteínases que naturalmente se encontram de forma inativa na dentina (cisteíno-catepsinas e MMPs), e que também são encontradas em lesões de cárie dentinária (Tjäderhane et al., 1998, 2015; Sulkala et al., 2002; Nascimento et al., 2011; Takahashi, 2015). Estas proteases ativas podem aumentar a degradação da dentina previamente desmineralizada, principalmente por meio da degradação de colágeno, resultando em uma possível progressão da lesão, podendo causar injúrias ao tecido pulpar (Tjäderhane et al., 1998; Takahashi e Nyvad, 2016;) e degradação da camada híbrida em restaurações (Mazzoni et al., 2015).

Entretanto, ainda não está claro se, em longo prazo, a dentina amolecida, deixada próxima a polpa, refletirá em danos, pois não é possível avaliar as condições histológicas e subclínicas destes dentes (Kidd, 2004; Ricketts et al., 2018). Por isto, diminuir a quantidade de bactérias tanto da dentina amolecida, deixada próxima à polpa para não lesioná-la, quanto da coriácea ou da firme, as quais são passíveis de remineralização (Innes et al., 2016; Ricketts et al., 2018), pode aumentar a chance de obter sucesso com o tratamento de mínima intervenção (Steiner-Oliveira et al., 2015) e interferir nos processos de degradação da matriz orgânica de dentina em lesões cariosas profundas iniciados pelos ácidos bacterianos.

Com isso, visando o sucesso dos tratamentos minimamente invasivos e dos tratamentos restauradores realizados com uma remoção parcial de dentina cariada têm-se discutido a importância de desinfetar essa dentina remanescente para diminuir os riscos de agressões pulpares, progressão de lesões cariosas e degradação de camada híbrida, visto que independentemente da quantidade de tecido cariado removido bactérias remanescentes ainda continuam no tecido ( Tjäderhane et al., 1998; Lennon et al., 2007, 2008; Mazzoni et al., 2015; Takahashi e Nyvad, 2016). Uma das formas de alcançar esse objetivo é a utilização de lasers por meio da terapia fotodinâmica antibacteriana.

### **3.2 Lasers em odontologia**

A utilização de luz amplificada pela emissão estimulada de radiação (LASER) na odontologia é uma alternativa coadjuvante para os tratamentos convencionais (Najeeb et al., 2016). A luz interage com os tecidos podendo ocasionar diferentes resultados dependendo do tipo de luz e da potência utilizada. Os lasers de alta potência são utilizados em procedimentos como cirurgias de tecido mole (Uraz et al., 2018), procedimentos endodônticos (de Moura et al., 2010) e procedimentos em tecido duro como diminuição da hipersensibilidade (Lopes e Aranha, 2013) remoção de lesões de cárie e desinfecção em esmalte e dentina, assim como materiais restauradores (Bello-Silva et al., 2013; Sozzi et al., 2013). Os de baixa potência são muito utilizados como coadjuvantes por possuírem efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e bioestimulante (reparação de tecidos), em procedimentos como: diminuição da hipersensibilidade dentinária (Pourshahidi et al., 2019), agente dessensibilizante em dentes com Hipomolarização Molar-Incisivo (Machado et al., 2019), prevenção de cárie em esmalte (Zezell et al., 2009), diagnóstico de cárie (Braga et al., 2010), tratamento ortodôntico (Ferreira et al., 2016), tratamento de trismo após radioterapia (Bernal Rodriguez et al., 2019), tratamento de desordens temporomandibulares (Madani et al., 2020) e para tratar herpes labial recorrente (Al-Maweri et al., 2018). Além disso, podem ser utilizados associados a fotossensibilizadores para tratamentos antimicrobianos envolvendo áreas como periodontia (Gandhi et al., 2019), endodontia (Queiroga et al., 2010; Schwendicke, 2017; de Miranda e Colombo, 2018) e em lesões cariosas ( Steiner-Oliveira et al., 2015; Bargrizan et al., 2018; Alves et al., 2019), recebendo o nome de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

### **3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa)**

A terapia fotodinâmica foi descoberta há cerca de 100 anos e, devido a sua eficácia no tratamento contra células cancerígenas, as pesquisas para usá-la como

antimicrobiano cessaram e retornaram há pouco tempo. Esta pausa ocorreu também devido a descoberta dos antimicrobianos sistêmicos (Moan e Peng, 2003). Entretanto, nos dias atuais cada vez mais microrganismos estão adquirindo resistência aos antimicrobianos existentes e, por isto, as pesquisas nessa área estão crescendo cada vez mais (Cieplik et al., 2014).

A TFDa é um tratamento que utiliza um agente fotossensibilizante, uma luz visível de comprimento de onda adequado que na presença de oxigênio molecular e age provocando a morte celular bacteriana por meio da paralização das atividades do metabolismo celular ou de danos a estruturas essenciais (Cieplik et al., 2014).

### **3.3.1 Aplicações da TFDa**

A TFDa é utilizada em diversas áreas da Medicina e da Odontologia para tratar infecções localizadas. Um dos exemplos é a área da dermatologia, a qual utiliza este tipo de tratamento em lesões oriundas de vírus como herpes simples (Moore C et al., 1972; Rossi et al., 2009) e HPV (Ichimura et al., 2003) e em lesões causadas por bactérias, como a acne (Kwada et al., 2002). Na cavidade bucal, age no tratamento de doenças causadas por fungos como candidíase, por vírus como herpes, e por bactérias como as doenças periodontais e a cárie dentária, sendo que todas são susceptíveis ao tratamento fotodinâmico (Donnelly et al., 2007; Kharkwal et al., 2011; Costa et al., 2012). Nas doenças periodontais, antimicrobianos são usados contra patógenos resistentes à terapia convencional que dificultam a paralisação da progressão da doença (De Melo et al., 2013). Grzech-Leśniak et al. (2019) mostraram que associar a TFDa com a raspagem e alisamento radicular pode melhorar os resultados clínicos e microbiológicos (Grzech-Leśniak et al., 2019). Nos tratamentos endodônticos a TFDa pode ser utilizada para auxiliar na eliminação dos microrganismos persistentes no interior do canal - os quais podem levar a falha do tratamento ocasionando em lesões periapicais - devido suas características antimicrobianas (de Miranda e Colombo, 2018).

Em relação a carie dentária a TFDa pode ser utilizada tanto para a prevenção do aparecimento de lesões cariosas, ao erradicar bactérias cariogênicas do biofilme dental (Cieplik et al., 2014), quanto para tratar os sintomas da doença, as lesões de cárie (de Oliveira et al., 2019). Atualmente, para controlar o desenvolvimento das lesões de cárie, o meio mais efetivo depende da colaboração do paciente através de bons e efetivos hábitos de higiene bucal, na presença de fluoreto, e uma dieta controlada em carboidratos fermentáveis (Löe, 2000; Costa et al., 2004), o que nem sempre é alcançado, dificultando a abordagem terapêutica. Assim, como um auxílio químico à remoção mecânica do biofilme, existem, atualmente, algumas terapias antimicrobianas aplicáveis, como o uso de clorexidina, iodo e outros antimicrobianos para ajudar a diminuir a quantidade de microrganismos patogênicos

da cavidade oral (Nemezio et al., 2017; Fumes et al., 2018). Entretanto, a ação destes antimicrobianos em biofilmes dentais é limitada, devido à capacidade de autoproteção dos microrganismos que vivem nesta comunidade, os quais são capazes de criar resistência a alguns destes antimicrobianos (Cieplik et al., 2014). Além disso, estes antimicrobianos possuem restrições e efeitos adversos se utilizados em longo prazo, sendo um exemplo, a clorexidina, a qual pode causar perda da sensibilidade gustativa temporária, queimação e manchamento dos dentes, em longos períodos de uso (Nemezio et al., 2017).

Assim, a terapia fotodinâmica antibacteriana apresenta alguns atributos desejáveis no controle de microrganismos da doença cárie, tais como não causar resistência bacteriana, atingir diversos tipos de microrganismos patogênicos, ser seletiva para não causar danos aos tecidos hospedeiros, ação relativamente rápida, não perturbação da microbiota normal, além de possuir um bom custo benefício para ampliar seu uso nos mais diversos ambientes de tratamento (Wilson et al., 1992; Wilson, 2004; Cieplik et al., 2014; Vecchio et al., 2015; De Freitas et al., 2017). Para realizar a aplicação dessa terapia é necessário um fotossensibilizador e uma luz em determinado comprimento de onda que consiga ativá-lo e assim matar as bactérias daquele local (De Freitas et al., 2017).

### **3.3.2 Mecanismo de ação da TFDa**

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma técnica aplicada por meio de dois elementos. O primeiro passo inclui a aplicação tópica de um fotossensibilizador (FS), na região de interesse por um tempo específico (tempo de pré-irradiação); o segundo é fotoativá-lo, iluminando-o com uma luz de comprimento de onda específico que provoca a excitação das moléculas deste FS. Assim, na presença de oxigênio molecular, esse processo resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são tóxicas para diversos tipos de microrganismos tais como as bactérias, fungos, vírus e parasitas, mas não é letal para o hospedeiro (Hamblin e Hasan, 2004). Isto ocorre porque na TFDa utiliza-se o FS topicamente com uma concentração segura, direcionando o local da ação, que receberá o fotossensibilizador que agirá rapidamente nas células microbianas, enquanto esta ação nas células de mamíferos é mais lenta (Demidova e Hamblin, 2004).

O FS aplicado topicamente sobre o biofilme irá fotossensibilizar as células, ligando-se geralmente à membrana citoplasmática (Hu et al., 2018), por um determinado período de tempo, chamado de tempo de pré-irradiação. Posteriormente, ao absorver a luz, as moléculas do FS são excitadas, fazendo com que o oxigênio presente em seu estado fundamental sofra transição até ser convertido para o estado tripleto excitado. Nesse estado e na presença do oxigênio molecular, pode sofrer dois tipos de reações: no primeiro

mecanismo, o FS pode transferir elétrons para moléculas da célula bacteriana, acarretando na formação de radicais e íons radicais os quais interagem com o oxigênio molecular para gerar espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ); já no segundo mecanismo, a energia é transferida para o oxigênio molecular, em seu estado fundamental, formando o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Figura 2), o qual é altamente reativo (Foot, 1991; Allison e Moghissi, 2013; Cieplik et al., 2014; De Freitas et al., 2017; Hu et al., 2018; Reis et al., 2019). Assim que essas espécies reativas de oxigênio são geradas (onde quer que o FS tenha permanecido), elas atingem as moléculas adjacentes, como os polissacarídeos, lipídeos, proteínas e o DNA, induzindo a apoptose ou necrose das células do microrganismo (Figura 2) (Konopka e Goslinski, 2007; Hu et al., 2018).

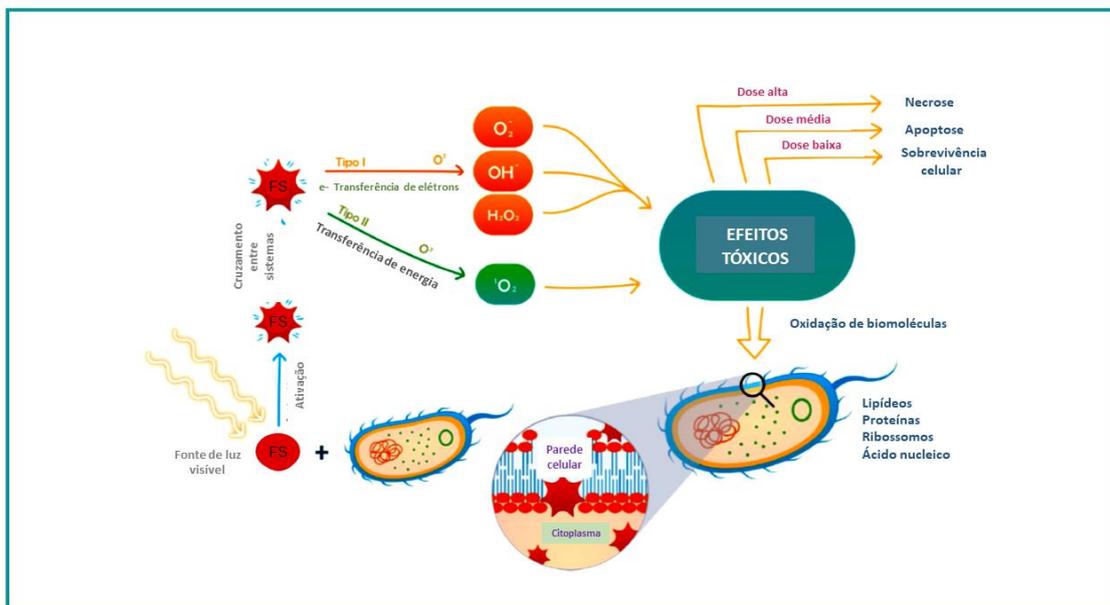


Figura 2 - Esquema do mecanismo de ação da TFDa

Fonte: traduzido de Reis et al. (2019)

Os FS são moléculas orgânicas insaturadas que possuem um grande coeficiente de absorção no espectro de luz visível específico, e sua penetração e fixação influencia diretamente a eficácia da terapia, sendo esta característica determinada pela estrutura química do corante e pela estrutura da célula alvo (George et al., 2009). Eles precisam ter um efeito antimicrobiano alto por meio da afinidade com diversos microrganismos, características específicas que permitam a penetração e adesão às células microbianas tornando-a um alvo fotossensível (Alves et al., 2009); ser o menos tóxico para o tecido hospedeiro (Soukos e Goodson, 2011) e ter alta capacidade de gerar oxigênio singlete, (Maisch et al., 2007) o qual pode matar as bactérias (Hamblin, 2016).

Existem diversos tipos de FS testados nos estudos realizados com a TFDA, em diferentes aplicações na Odontologia. Alguns dos que apresentam melhor eficácia contra microrganismos da cavidade oral são os FS catiônicos azul de toluidina, azul de metileno e fotoditazina e os aniônicos rosa de bengala e eritrosina (Cieplik et al., 2014; Steiner-Oliveira et al., 2015; De Freitas et al., 2017; Nemezio et al., 2017; Hu et al., 2018). Os FS de carga positiva possuem melhor eficácia contra as bactérias Gram negativas ( $G^-$ ), devido a membrana externa dessas células conterem alta quantidade de lipopolissacarídeos (LPS), os quais têm carga negativa, que limitam a difusão dos outros corantes (Malik et al., 1992; Nitzan et al., 1995; Minnock et al., 2000). Os FS neutros e os carregados negativamente conseguem permear a parede celular e se difundir na maioria das bactérias encontradas nas lesões cariosas, porém têm facilidade de ação principalmente em bactérias Gram positivas ( $G^+$ ), como os *Streptococcus* (Hu et al., 2018), pois possuem uma parede celular mais porosa, permitindo, portanto, maior difusão dos FS (Malik et al., 1992).

O azul de metileno foi um dos primeiros FS estudados derivados da Fenotiazina (Cieplik et al., 2014) e segundo de Oliveira et al. (2019) é o mais estudado contra os microrganismos responsáveis pela doença cárie (de Oliveira et al., 2019). Ele é um FS catiônico que atua produzindo alta quantidade de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto, que é um dos principais mecanismos de toxicidade bacteriana na terapia fotodinâmica (Wilson, 2004; Tardivo et al., 2005; Vecchio et al., 2015; Vieira et al., 2018). Tem facilidade de ação em bactérias  $G^+$  devido à difusão facilitada, mas também consegue agir nas  $G^-$  (Mirouze et al., 2018). Outros FS bastante estudados contra microrganismos da cárie são: azul de toluidina (AT), curcumina (CUR), rosa de bengala (RB) e indocianina verde (ICG – do inglês *Indocyanine Green*) (de Oliveira et al., 2019).

A luz utilizada na TFDA deve ter características adequadas para que o fotossensibilizador escolhido a absorva e consiga agir na célula, como um comprimento de onda adequado – de acordo com o FS utilizado, uma determinada potência, um tempo de irradiação eficaz, um diâmetro de saída da luz apropriado e um foco adequado (Vecchio et al., 2015; De Freitas et al., 2017; Hu et al., 2018). Diferentes fontes de luz são utilizadas, como a luz branca, laser de hélio e neônio (He/Ne), luz LED (do inglês *light emitting diodes*, diodos emissores de luz) e laser de diodo (Fumes et al., 2018). A luz LED, com comprimento de onda entre 450 a 660 nanômetros, cuja luz visível varia de azul a vermelho é uma das mais utilizadas, pois é de fácil manuseio, baixo custo, com boa eficiência elétrica e óptica (Walsh, 1997; De Freitas et al., 2017), permitindo amplas emissões de luz abrangendo toda a área a ser sensibilizada devido à falta de uma perfeita colimação e coerência (De Freitas et al., 2017), contrário ao ocorrido com o laser. De Oliveira et al. (2019) encontraram que a luz mais utilizada

foi a LED vermelha com comprimento de onda variando entre 625 a 670 nm (de Oliveira et al., 2019). Utilizar o comprimento de onda adequado para determinado FS é importante, pois a absorção de luz leva os componentes celulares das células bacterianas sensibilizadas a um estado de excitação, a fim de que o FS interaja com o oxigênio molecular, iniciando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), entre eles, oxigênio singleto (Cieplik et al., 2014; De Freitas et al., 2017), diminuindo ou eliminando os microrganismos (Hamblin, 2016), incluindo aqueles relacionados à doença cárie.

### 3.4 Efeito da TFDA em biofilmes cariogênicos

O controle mecânico do biofilme muitas vezes é dificultado por fatores como distúrbios motores (Nemezio et al., 2017), doenças neuropsicológicas ou outras necessidades especiais (Tahmassebi et al., 2015). Assim, atualmente, em casos em que há necessidade de reforçar o controle da atividade microbiana, é indicado o uso de antimicrobianos como a clorexidina, a qual possui diversos efeitos colaterais. Além disso, os microrganismos podem criar resistência a ela e outras substâncias (Cieplik et al., 2014). Nesse sentido, a TFDA pode ser uma alternativa eficaz para a prevenção de lesões cáries, reduzindo a formação de biofilme cariogênico, tendo em vista que atua diretamente em um dos fatores causais da doença cárie, as bactérias, incluindo as mais cariogênicas como *S. mutans* e *Lactobacillus* (Steiner-Oliveira et al., 2015; Méndez et al., 2017; Fumes et al., 2018). Ademais, por agir localmente e diretamente sobre os microrganismos, não causa distúrbios nos tecidos bucais (Wilson, 2004).

Para analisar qual o melhor protocolo para aplicar a TFDA em biofilmes cariogênicos as pesquisas devem analisar diversos fatores incluindo os modelos de biofilmes utilizados nos estudos, pois este é um fator importante para demonstrar a eficácia da terapia, devido à complexidade destes e seu comportamento na cavidade bucal (Méndez et al., 2017). Os biofilmes monoespécies, por serem menos complexos, possibilitam uma facilidade maior de ação dos antimicrobianos (De Freitas et al., 2017), porém podem gerar resultados conflitantes considerando a realidade clínica da cavidade bucal. Os biofilmes multiespécies são mais resistentes devido a sua espessura e complexidade, podendo acarretar na diminuição da penetração dos FS (De Freitas et al., 2017). Por fim, os estudos em modelos de biofilme de microcosmo oral, os quais são uma associação de microrganismos da microbiota oral natural que mantêm as características dos biofilmes clínicos, podem melhorar a qualidade e previsão dos efeitos antimicrobianos na cavidade bucal (Méndez et al., 2017).

Dessa forma, para analisar o efeito da TFDA em microrganismos, diferentes estudos podem ser realizados, como os *in vitro*, *in situ*, *in vivo* e estudos clínicos randomizados

(ECR) ou não. Os modelos de estudo *in vitro* são importantes para analisar se tratamentos podem ter resultados diante de alguns parâmetros usados na tentativa de imitar a cavidade bucal, porém devido à complexidade desse ambiente e aos diversos tipos de microrganismos encontrados, os resultados podem ser diferentes, sendo necessário também estudos *in vivo* para confirmar se o tratamento realmente é eficaz e se pode ser aplicado clinicamente (Araújo et al., 2015; de Oliveira et al., 2019). Os modelos *in situ* são mais complexos do que os *in vitro*, pois permitem avaliar condições mais próximas àquelas encontradas na cavidade bucal, criando condições de crescimento de biofilme similares. Entretanto os resultados *in vivo* ainda assim podem ser diferentes, com isso, esses modelos servem como parâmetro para que os ECR possam ser realizados (Teixeira et al., 2012). Este tipo de estudo, segundo o guia CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) (2010), é considerado o padrão ouro nas avaliações de intervenções em saúde e devem seguir uma metodologia rigorosa para não gerarem resultados tendenciosos (Alves et al., 2019).

Com isso, diversos estudos *in vitro*, têm sido realizados para demonstrar o efeito da TFDa em microrganismos específicos do biofilme cariogênico, sobretudo os monoespécies (De Freitas et al., 2017). Wood et al. (2006) analisaram biofilmes compostos por *S. mutans*, utilizando AM, eritrosina e fotofrin como FS, em uma concentração de 22 µM por 15 min, e pelo mesmo tempo utilizaram uma lâmpada de filamento de tungstênio de 400 W (luz branca) como fonte de luz, irradiando o biofilme a uma distância de 30 cm (intensidade média da luz foi de 22,7 mW/cm<sup>2</sup> na faixa de comprimento de onda 500-550 nm (região de absorção máxima pela eritrosina) e 22,5 mW/cm<sup>2</sup> na faixa de comprimento de onda 600-650 nm (região de absorção máxima por AM e fotofrin). Observaram que com a eritrosina houve redução de cerca de 2.2 log<sub>10</sub> UFC em biofilmes formados há 48 h, já em biofilmes mais antigos (288 h) houve diminuição em cerca de 3 log<sub>10</sub> UFC. O AM conseguiu diminuir em aproximadamente 1,5 log<sub>10</sub> UFC (biofilme 48h) e 2,6 log<sub>10</sub> UFC (288 h). O fotofrin foi menos eficaz com uma maior redução no biofilme mais antigo, em 1,1 log<sub>10</sub> UFC. Este estudo mostrou que a eritrosina, seguida pelo AM, apresentaram bons resultados na diminuição da contagem de bactérias do biofilme (Wood et al., 2006). Tokubo et al. (2018) também estudaram a eficácia *in vitro* da eritrosina e AM, porém em concentrações maiores 100 e 250 µM, e com período de pré-irradiação e exposição à luz menores, de 5 min e 2 min, respectivamente. Para irradiação, também foi utilizada luz halógena de filamento de tungstênio com 232 W, comprimento de onda na faixa de 400–700 nm e potência de 600 mW/cm<sup>2</sup> (0,6 J/cm<sup>2</sup>). A ativação de luz foi fracionada em 4 períodos de 30 s, os quais foram intercalados com períodos de escuridão de 30 s, com distância de 3 cm entre a luz e o biofilme. Optaram por misturar os dois fotossensibilizadores, obtendo maiores resultados do que quando foram usados separadamente, com uma redução de 3,2 log<sub>10</sub> e 5,3 log<sub>10</sub> nas UFC, utilizando as

concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os fotossensibilizadores usados separadamente, na concentração de 250  $\mu\text{M}$ , também conseguiram reduzir significativamente a contagem bacteriana, sendo que a eritrosina diminuiu em 4,5  $\log_{10}$  e o AM em 4,3  $\log_{10}$  as UFC (Tokubo et al., 2018).

Um estudo conduzido por Nemezio et al. (2017) com modelo de biofilme de *S. mutans*, cultivado por 18 horas, e frequentemente exposto a sacarose, mostrou resultados significativos utilizando o AM (0,01%). Utilizaram um tempo de pré-irradiação de 5 minutos e laser diodo com comprimento de onda de 660 nm por 90s a uma distância de 2 mm do campo de trabalho (o diâmetro de saída de luz foi de 0,028  $\text{cm}^2$ , com potência de 100 mW, densidade de energia de 320  $\text{J}/\text{cm}^2$  (9J) e irradiância de 1415  $\text{W}/\text{cm}^2$ ). Isto diminuiu a contagem de bactérias viáveis em aproximadamente 1,5  $\log_{10}$  UFC, comparado ao controle, e reduziu a concentração de polissacarídeos intra e extracelulares importantes para a cariogenicidade do biofilme. De acordo com os autores, a terapia fotodinâmica pode ser considerada um método eficiente para controle de biofilme, uma vez que utilizar esta terapia, com estes parâmetros, duas vezes por dia, mostrou diminuir a viabilidade bacteriana do biofilme de *S. mutans* (Nemezio et al., 2017). Ainda, a utilização de AM (100  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos (pré-irradiação), usando LED (comprimento de onda de 660 nm; área do feixe de 0,028  $\text{cm}^2$ ; potência de 473 mW; irradiância de 166,8  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) em diferentes tempos de irradiação foi analisada por Leal et al. (2017). Foi observada morte de todas as bactérias após irradiação de 6 min (60  $\text{J}/\text{cm}^2$ ), quando não houve exposição a açúcar e para erradicar o grupo exposto a glicose necessitou de 8 minutos (80  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Concluíram que o efeito da terapia é proporcional à exposição da luz e que a presença de glicose pode atrasar a inativação microbiana (Leal et al., 2017).

Azizi et al. (2016) analisaram os FS azul de toluidina e indocianina verde em biofilmes de *S. mutans*. Encontraram que houve erradicação total do número de bactérias, utilizando AM (2%) por 1 min e ICG (0.2%) por 2 min e irradiação por 60 s. A luz utilizada foi laser de diodo no comprimento de onda de 660 nm, com potência de 40 mW e densidade de energia de 2,4  $\text{J}/\text{cm}^2$  para o AM; já para a ICG o comprimento de onda utilizado foi de 810 nm, potência de 100 mW e densidade de energia de 6  $\text{J}/\text{cm}^2$  (Azizi et al., 2016). Por outro lado, ao analisar essa terapia contra *Lactobacillus acidophilus*, com AM (1%) e ICG (0,01%), por 2 min, e laser de diodo (comprimento de onda de 808 nm e densidade de energia de 9,48  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 37 e 74 s e 660 nm e densidade de energia de 1,88  $\text{J}/\text{cm}^2$  por 37 s e 74 s, para ICG e AM, respectivamente), obteve-se que a ICG não reduziu significativamente os microrganismos. No entanto, o AM em todos os grupos promoveu significativa redução no número de colônias, chegando a mais de 99%, e inibição de crescimento de *L. acidophilus* (Azizi et al., 2018). Em outro estudo, Beytollahi et al. (2017), também analisaram esses fotossensibilizadores com luz LED, em um comprimento de onda de 635 nm com potência de saída de 220 mW para o AT

e 810 nm com potência de saída de 250 mW para ICG. O tempo de pré-irradiação foi de 5 min e o de irradiação foi de 30 s, com 17,18 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia para AT e 15,62 J/cm<sup>2</sup> para ICG. Houve diferenças significativas na redução da formação de biofilme em ambos os FS, sendo que o AT (100 µg / mL) reduziu em 63,87% e o ICG necessitou de uma concentração maior, 1000 µg/mL, para reduzir em 67,3%. Os pesquisadores concluíram que a capacidade de formação de biofilme de *S. mutans* diminuiu gradualmente com o aumento das doses, portanto, para reduzir significativamente a formação de biofilmes e a contagem de células bacterianas, são necessárias concentrações maiores destes corantes (Beytollahi et al., 2017).

Outros microrganismos também têm sido estudados. Soria-Lozano et al. (2015) analisou biofilmes formados por *S. mutans*, *S. sanguis* e *C. albicans*, utilizando os FS AM, RB e CUR, nas concentrações de 0,1–12800 µg/ml. Utilizaram lâmpada de iodetos metálicos emitindo comprimentos de onda entre 420-700 nm, com irradiância específica para o comprimento de onda de cada FS - 665 nm (AM), 557 nm (RB) e 430 nm (CUR), com diâmetro do feixe de luz de 21 cm e fluência de 37 J/cm<sup>2</sup>. Analisaram três tempos de pré-irradiação (1 min, 1 h e 3 h), seguidos de 6 min e 51 s de ativação por luz à distância de 10 cm e diâmetro do feixe de 21 cm. Todos os FS utilizados obtiveram redução de 6 log<sub>10</sub> UFC, porém em concentrações diferentes. Para atingir este resultado em cepas de *S. mutans*, no menor tempo, a concentração mínima de cada FS foi de 0,31-0,62 µg/ml (RB), 1,25–2,5 µg/ml (AM) e a CUR de 80–160 µg/ml. Para o *S. sanguis* a concentração de AM permaneceu a mesma, o RB precisou de 0,62–1,25 µg/ml e a CUR de 160–320 µg/m. Conforme o tempo de pré-irradiação aumentou, menores concentrações foram necessárias. Analisando as cepas de *C. albicans*, o AM conseguiu melhores resultados, no menor tempo de pré-irradiação, conseguindo diminuir em 5 log<sub>10</sub> UFC com 80–160 µg/ml, já a RB e a CUR necessitaram de concentrações entre 320–640 µg/ml e mais que 1280 µg/ml, respectivamente (Soria-Lozano et al., 2015). Outro estudo, conduzido por Lee et al. (2017), também obteve significativos resultados quanto ao uso da curcumina como FS. Eles compararam o efeito da curcumina, do extrato de cúrcuma "*xanthorrhiza*" (CXE) e da combinação destas contra células planctônicas de *S. mutans*. Utilizaram a concentração de 10, 100, 1.000 e 10.000 ng/ml. A luz utilizada foi LED com comprimento de onda de 405 nm (potência de 84,5 mW para 300 s com densidade de energia de 25,3 J/cm<sup>2</sup>). Obtiveram como resultado que na maior concentração a curcumina e a combinação dos FS tem seu efeito antibacteriano diminuído, sendo potentes em todas as demais concentrações, chegando a redução total da contagem bacteriana. Já o CXE possui um efeito antibacteriano maior quanto maior a concentração, sendo que 1.000 ng/ml associada a fonte de luz diminuiu de 6,29 para 0,33 log<sub>10</sub> UFC/ml (redução de cerca de 5,96 log<sub>10</sub>) e quando a concentração de 10.000 ng/ml foi utilizada chegou a redução total.

Portanto, esses fotossensibilizadores podem ser efetivos na TFDA (Lee et al., 2017). Nima et al. (2020) também estudaram o efeito da terapia fotodinâmica em *S.mutans* (células planctônicas) associada a curcumina nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , por 3 minutos. Como fonte de luz utilizaram um diodo emissor de luz “polywave” (10 mm de diâmetro externo, com emissão de 1275 mW/cm<sup>2</sup> em alta potência, com comprimento de onda entre 385-515 e dois picos em 409 nm e 454 nm, uma área de 0,95 cm<sup>2</sup> a 1 mm de distância, obtendo irradiância de 839 mW/cm<sup>2</sup>) por 40 s fracionados (20 s, espera de 5 s, 20 s), obtendo uma irradiância final de 33,5 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados obtidos mostraram que ambas concentrações do FS foram igualmente eficazes, erradicando completamente as bactérias, sendo que com 50  $\mu\text{M}$  houve alteração na morfologia dos microrganismos, com formação de vacúolos, irregularidades na membrana celular e precipitação de partículas; já com 500  $\mu\text{M}$  houve menos alterações na membrana e mais precipitações, mas também produziu vacúolos demonstrando que a curcumina pode ser eficaz na TFDA (Nima et al., 2020).

Müller et al. (2007) utilizou o AM (concentração não informada) para analisar o efeito da TFDA em biofilmes multiespécies (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella díspar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinus*, *S. oralis* e *Candida albicans*), por 60 s (pre-irradiação) e laser com comprimento de onda de 665 nm (75 mW) por mais 60 s. Não foram obtidos resultados significativos na redução de microrganismos (Müller et al., 2007)

Araújo et al. (2014) analisaram a eficácia da curcumina e curcuminóides (dissolvidos em N-Dimetil-D-Glucamina) em concentrações de 0,75, 1,5, 3,0, 4,0 e 5,0 g/L contra biofilmes multiespécies de *S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus* e em biofilmes cultivados sobre lesões de dentina cariada, por um tempo de 5 min, antes de iluminar com uma luz LED com comprimento de onda de 450 nm (intensidade real de 19 mW/cm<sup>2</sup> e uma fluência média estimada de 5,7 J/cm<sup>2</sup>) por outros 5 min. Nas três primeiras concentrações mencionadas, houve diminuição de até 99,9% nas células viáveis do biofilme e não houve diminuição significativa nos biofilmes relacionados à cárie dentinária. Já na concentração de 4,0 g/L de curcumina, houve redução de 44,4% relacionado à lesão cariada e de 69,4% com a concentração de 5 g/L de curcumina, sendo que ambas as concentrações reduziram em 100% o biofilme cultivado nos poços sem exposição à lesão cariada. Os pesquisadores concluíram que estes microrganismos são susceptíveis a TFDA com os parâmetros utilizados, porém são menos quando estão em lesões cariosas em dentina (Araújo et al., 2014).

Quishida et al. (2015) utilizaram luz LED e o corante fotoditazina (PDZ) em biofilmes multiespécies formados por *Candida albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*. O FS foi diluído em solução fisiológica nas concentrações de 100, 150, 175, 200 e 250 mg/L. Os biofilmes foram expostos a fonte de luz LED na região do vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, intensidade de luz de 71 mW/cm<sup>2</sup> e uma fluência de 37,5 J/cm<sup>2</sup>. O tempo de

pré-irradiação foi de 20 min, seguidos de fotoativação por 9 min. A maior redução na contagem bacteriana ocorreu quando a concentração de 200 mg/L de PDZ foi utilizada, diminuindo em  $1,21 \log_{10}$ ,  $1,19 \log_{10}$  e  $2,39 \log_{10}$  os microrganismos *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans*, respectivamente. Mostrou também uma diminuição significativa no metabolismo celular nos biofilmes, cerca de 36,4% (Quishida et al., 2015).

Sabe-se que pode haver diferenças nos resultados ao realizar estudos com biofilmes formados *in vitro* e *in situ*, devido à complexidade destes na cavidade bucal (De Freitas et al., 2017). Sendo assim, Teixeira et al. (2012) estudaram biofilmes de *S. mutans* em ambas as condições. O FS utilizado foi o azul de toluidina (100 µg/ml) com um tempo de pré-irradiação de 5 min seguido da irradiação com luz LED no espectro vermelho, com comprimento de onda de 638,8 nm, potência de 31,8 mW/cm<sup>2</sup>, a 2 mm de distância do biofilme, por 15 min. Os resultados *in vitro* mostraram que a TFDA foi efetiva contra os microrganismos neste modelo de biofilme (redução de cerca de  $5,48 \log_{10}$ ), porém, frente a complexidade dos biofilmes *in situ*, ela não demonstrou resultados significativos (Teixeira et al., 2012).

A TFDA também tem sido utilizada para estudos em biofilmes formados com modelo de microcosmos. Em um estudo piloto de Oliveira et al. (2018) biofilmes cultivados na superfície de primeiros molares permanentes parcialmente erupcionados foram analisados utilizando uma concentração de AT (200 mM), com tempo de pré-irradiação de 2 min e um aparelho de LED (Biotable® RGB), com comprimento de onda azul, verde e vermelha e densidade de potência de 10, 20, 30 e 40 mW/cm<sup>2</sup> com tempos de irradiação distintos (468 s, 935 s e 1870 s). A maior diminuição na contagem de células viáveis foi observada utilizando o maior tempo de exposição à luz (cerca de 31 minutos), com a densidade de energia de 75 J/cm<sup>2</sup>, com uma redução média variando de  $2,15$  a  $2,37 \log_{10}$  UFC/mL de todos os grupos microbianos. Os pesquisadores concluíram que a terapia foi efetiva em reduzir a viabilidade de microrganismos específicos do biofilme em microcosmo oral e que este efeito de atividade antimicrobiana é dose-dependente (de Oliveira et al., 2018).

Nesse contexto, um estudo foi realizado com 15 voluntários que utilizaram aparelhos removíveis contendo blocos de esmalte, para que biofilme crescesse *in situ* ao decorrer de duas semanas. O efeito da TFDA nos blocos de esmalte foi analisado *in vitro*, utilizando o FS eritrosina, assim como a dose necessária de luz para matar os microrganismos organizados em biofilme. As concentrações utilizadas do corante foram de 22 e 220 µM com tempo de pré-irradiação de 15 min e mais 15 min de exposição à luz branca (lâmpada com filamento de tungstênio (400 W) com potência de 22.7 mW/cm<sup>2</sup> no comprimento de onda de 535 nm). A redução média na contagem de bactérias foi de 86,3% e 95,3% relacionadas às concentrações de 22 e 220 µM, respectivamente. Após isso, na segunda fase do estudo, eles

testaram variados tempos de aplicação de luz (2, 5 e 15 min e irradiação fracionada com 5 min de luz, 2 min no escuro, e mais 1 min de exposição à luz) com a concentração de 220  $\mu\text{M}$  e obtiveram que a redução bacteriana é dose-dependente. Sendo que no menor tempo (2 min) houve redução média de 61%, com 5 min 81,7%, com irradiação fracionada 87% e com 15 min 94,5% na contagem total de bactérias. Assim, concluíram que os dois últimos tempos podem ser utilizados eficazmente em biofilmes (Tahmassebi et al., 2015).

O efeito da TFDa também foi estudado contra as bactérias remanescentes de lesões cariosas em dentina.

### 3.5 Efeito da TFDa em dentina cariada

As lesões de cárie em dentina são preocupantes quando muito profundas devido à proximidade com a polpa, em que a remoção não seletiva de dentina cariada pode expô-la, complicando o tratamento odontológico (Innes et al., 2016). Assim, com o aumento da prática da odontologia minimamente invasiva, diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de mostrar a ação da TFDa na desinfecção de dentina cariada.

Méndez et al. (2017) realizaram um estudo em microcosmo de cárie dentária cultivada a partir de dentina infectada de crianças. Como fotossensibilizador, utilizaram o AM (268  $\mu\text{M}$ ) por 2 min (tempo de pré-irradiação) e como fonte de luz utilizaram o aparelho de LED (Biotable® RGB), no espectro de luz visível vermelha (625  $\pm$  30 nm) por 935 ou 1870 s (correspondente a 37,5 ou 75  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) em uma distância de cerca de 25 mm (1  $\text{cm}^2$  de área coberta), com irradiância de 40  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . A terapia, utilizando 75  $\text{J}/\text{cm}^2$  (aproximadamente 31 min), reduziu a contagem de microrganismos totais e de *streptococcus* totais em 1,58  $\log_{10}$ , de *S. mutans* em 1,36  $\log_{10}$  e para *Lactobacilli* em 1,97  $\log_{10}$ . Utilizando o tempo de irradiação menor (cerca de 16 min) a redução da contagem microbiana não foi clinicamente relevante, reduzindo em menos de um logaritmo as UFC. Assim, concluíram que houve redução da viabilidade microbiana e que isso parece ser dose-dependente (Méndez et al., 2017).

Outro fotossensibilizador estudado para dentina cariada foi o Azul de toluidina. Melo et al. (2010) analisaram *in vitro* a eficácia desse FS contra biofilmes de *S. mutans*. Utilizaram a concentração de 0,1 mg/ml por 5 min e como fonte de luz foi utilizado LED (comprimento de onda entre 620 a 660 nm – com pico em 638,8nm-, com uma ponta cilíndrica de diâmetro de 9,5 mm, com 2 mm de distância e potência de 40 mW), por um tempo de 5, 10 ou 15 min (47, 94 e 144  $\text{J} / \text{cm}^2$ ). Obtiveram que somente a luz, por 15 minutos, conseguiu diminuir em 3,47log, já associado ao FS reduziu 1,80, 2,48 e 5,80log UFC de *S. mutans*, correspondentes aos tempos de irradiação de 5, 10 e 15 min, respectivamente. Portanto, a

TFDa utilizando estes parâmetros foi eficaz contra *S. mutans* (Melo et al., 2010). O efeito da TFDa em dentina cariada também foi analisado por meio de estudos *in situ*.

Lima et al. (2009) analisaram o efeito da TFDa em dentina *cariada in situ*, através de biofilmes formados sobre a dentina em aparelhos removíveis, utilizadas pelos voluntários, os quais pingavam solução de sacarose a 40%, dez vezes ao dia, por 14 dias. Ao final desse tempo as amostras de dentina foram coletadas e expostas ao azul de toluidina (100 µg) por 5 min. Posteriormente, foi utilizada luz LED de 40 mW (ponto de 9,5 mm, a 2 mm de distância) para fotoativação por 5 min (47 J/cm<sup>2</sup>) ou 10 min (94 J/cm<sup>2</sup>). Com isso, obtiveram diminuição significativa nas bactérias da cárie dentinária. Quando somente LED (94 J/cm<sup>2</sup>) foi utilizado houve redução em *Streptococcus totais* de aproximadamente 4,3log e ao associá-lo com o FS a redução foi de 3,5 (47 J/cm<sup>2</sup>) e 5,1log (94 J/cm<sup>2</sup>). Em relação ao *S. mutans* a diminuição em log<sub>10</sub> foi de 3, 3,5 e 4, correspondente ao FS+5 min irradiação, somente a luz (10 min) e FS+10 min de irradiação, respectivamente. Quanto aos *Lactobacilli*, no tempo de exposição à luz de 10 min, a redução foi similar com e sem o AT (cerca de 4,5 e 4,3log<sub>10</sub>, respectivamente) já com 5 min associado ao AT, a redução foi de aproximadamente 3,1log<sub>10</sub>. Considerando os microrganismos totais a diminuição bacteriana em log<sub>10</sub> foi de 5 (94 J/cm<sup>2</sup>), 5,2 (AT+94 J/cm<sup>2</sup>) e 4,1 (AT + 47 J/cm<sup>2</sup>). Assim, concluíram que estes parâmetros foram efetivos em reduzir uma grande variedade de microrganismos em condições semelhantes àquelas encontradas *in vivo* (Lima et al., 2009). Dessa maneira, os FS azuis têm sido bastante estudados para o tratamento de dentina cariada *in vivo*.

Melo et al. (2015), realizou um estudo clínico randomizado para analisar os efeitos da TFDa utilizando o FS AT na concentração de 100 µg/mL por 5 min. Após isso, mantendo uma distância de 2 mm, a dentina remanescente fotossensibilizador foi irradiada com luz LED por 5 min (comprimento de onda de 630 nm; potência de 150 mW; fibra ótica de 6 mm; fornecendo uma energia total de 94 J/cm<sup>2</sup>). Obtiveram que houve redução de aproximadamente 1,07 log UFC/mg de dentina para microrganismos totais e 1,08 para *S. mutans*, para *Lactobacillu* a diminuição foi maior, de 1,69 UFC/mg de dentina. Assim, concluiu-se que houve uma redução estatisticamente significativa para todos os microrganismos analisados (Melo et al., 2015).

Utilizando *ortho*-AT nesta mesma concentração (0.1 mg/mL)+LED e AM (0.01%)+laser, Steiner-Oliveira et al. (2015) estudaram o efeito *in vivo* da TFDa em dentes decíduos com lesões cariosas profundas em dentina. Após a remoção da zona necrótica de dentina o FS foi aplicado. O tempo de pré-irradiação foi de 60 s (o-AT) e mais 60 s de irradiação com LED de luz vermelha (comprimento de onda de 630 nm, com potência de 100 mW; 9,0 J de energia e densidade de energia de 30,0 J/cm<sup>2</sup>); já para o AM o tempo de pré-irradiação foi de 5 min seguido de 90 s de aplicação de luz vermelha com laser de baixa

potência (com comprimento de onda de 660 nm, 100 mW de potência; 9,0 J de energia e densidade de energia de 320,0 J/cm<sup>2</sup>). Assim, utilizando o-AT+LED e AM+Laser conseguiram uma redução (em log<sub>10</sub>) de microrganismos universais (0,43 e 1,2), *S. mutans* (0,38 e 0,45), *Streptococcus sobrinus* (-0,51 e 0), *L. casei* (0,41 e 0,78), *F. nucleatum* (0,28 e 0,45) e *Atopobium rima* (0,83 e 0,62), respectivamente. Com isso, obtiveram uma redução de todos os microrganismos testados (exceto *Streptococcus sobrinus*), independentemente do tipo de FS e fonte de luz utilizadas, porém sem diferenças estatisticamente significativas comparadas ao grupo controle (remoção seletiva para dentina amolecida e restauração com ionômero de vidro modificado por resina) (Steiner-Oliveira et al., 2015).

Por outro lado, Araújo et al. (2015) conseguiram resultados significativos na redução microbiana, *in vivo*, de dentes com lesões cariosas ativas e profundas. Após a remoção de dentina cariada, utilizaram AM (100 mg/mL) por um tempo de pré-irradiação de 5 min, com uma fonte de luz branca (utilizada sem o filtro de comprimento de onda, permitindo um comprimento de onda entre 500 e 800 nm e 260mW de potência), por um período fracionado de 1 min (30 s de irradiação – 20 s pausa – 30 s irradiação). Eles encontraram que a TFDa diminuiu em média 2,5 log os microrganismos da dentina superficial e na dentina profunda; quando houve irradiação direta, obtiveram redução de 1.9 log, já quando não houve irradiação direta foi de 2,3 log UFC. Analisando os *Streptococci* a redução foi de 2,4, 2,2 e 2,2, semelhantemente para *Lactobacilli* cuja redução foi 2,5, 2,1 e 2,0, correspondente à dentina superficial, profunda com irradiação direta e profunda sem irradiação direta. Assim, concluíram que a terapia foi efetiva (Araújo et al., 2015). Outro estudo nesse sentido foi realizado por Alves et al. (2019) em que analisaram o efeito da TFDa em dentes decíduos com lesões de cárie ativa na superfície oclusal. Realizaram uma remoção seletiva de tecido cariado, deixando dentina firme próxima à polpa. Após isso, foi aplicado o FS AM (0.005%) por 5 min (tempo de pré-irradiação) e foi utilizado laser (espectro vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, 100 mW de potência, densidade de energia de 640 J/cm<sup>2</sup>) por 180 s como fonte de luz. Obtiveram que antes da remoção seletiva havia 5,51 UFC/mg de *S. mutans* na dentina cariada (em log<sub>10</sub>), após a remoção havia 4,59 e, posteriormente a TFDa, esse número diminuiu para 2,71, ou seja, houve uma diminuição de 2,8 log<sub>10</sub> UFC (92.6%). Portanto, concluiu-se que essa terapia é efetiva na diminuição da carga bacteriana sem interferir na longevidade e sucesso do tratamento restaurador (Alves et al., 2019). Entretanto, como ainda não há um protocolo estabelecido para o tratamento de lesões cariosas com a TFDa, mais estudos são necessários a fim de este método possa ser aprimorado e utilizado clinicamente com melhores resultados (Araújo et al., 2015).

### 3.6 Novas abordagens com a TFDa

Como visto, a TFDa pode ser um coadjuvante interessante no tratamento da doença cárie, para uso tanto profilático como terapêutico, podendo auxiliar nas intervenções minimamente invasivas com remoção seletiva de tecido cariado. No entanto, a fim de que seja considerada um antimicrobiano ou antibacteriano, é esperado que a terapia reduza em pelo menos 3 log<sub>10</sub> as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (Cieplik et al., 2014; Melo et al., 2015). Além disso, existem diversos protocolos testados utilizando diferentes fotossensibilizadores e concentrações, assim como diferentes parâmetros de luz, mostrando resultados conflitantes na literatura (Balhaddad et al., 2020). Assim, estudos testando novas abordagens estão sendo realizados na tentativa de determinar um protocolo de uso clínico da TFDa para o tratamento de biofilmes cariogênicos e lesões cariosas em dentina.

Karygianni et al. (2014), a fim de melhorar os resultados da diminuição microbiana com a TFDa em biofilmes, realizaram um estudo com AT e “*Chlorin e6*” (um fotossensibilizador catiônico com estado tripleto de longa duração, bastante utilizado em terapia contra células cancerígenas), na concentração de 100 µg/mL, com tempo de pré-irradiação de 2 min. Segundo os autores, a inovação do estudo é relacionada à fonte de luz utilizada, pois atualmente as mais utilizadas são provenientes de laser ou LED. Utilizaram uma banda larga com comprimentos de ondas no espectro visível (VIS) e infravermelhos A (wIRA) filtrados por água, chamado de radiação de banda larga VIS + wIRA (irradiância de 200 mW/cm<sup>2</sup>), a qual pode ser utilizada com diferentes tipos de fotossensibilizadores. Essa fonte de luz foi utilizada por 5 min (48 mW/cm<sup>2</sup> VIS e 152 mW/cm<sup>2</sup> wIRA) em biofilmes obtidos *in situ*. Em biofilmes iniciais, o AT reduziu até 3,8 log<sub>10</sub> UFC e a “*chlorin e6*” em 3,7 log<sub>10</sub> CFU; analisando biofilmes maduros também houve diminuição significativa com ambos FS em bactérias aeróbicas e anaeróbicas, sendo que o AT reduziu em 4,37 log<sub>10</sub> e 3,53 log<sub>10</sub> e a “*chlorin e6*” diminuiu em 5,7 log<sub>10</sub> e 4,33 log<sub>10</sub> UFC, respectivamente. Os autores concluíram que utilizando essa fonte de luz ambos os FS obtiveram resultados significativos na atividade antimicrobiana contra biofilmes iniciais e maduros formados *in situ* (Karygianni et al., 2014).

Estudos envolvendo a adição de sais inorgânicos aos fotossensibilizadores têm sido realizados e diversas pesquisas têm demonstrado a eficácia da adição desses sais na TFDa para melhorar a eficiência contra as bactérias Gram negativas. Um dos mais estudados é o iodeto de potássio, o qual é um sal não tóxico utilizado como medicamento para terapia antifúngica (Hamblin, 2017). Porém, ainda não foram realizados estudos em biofilmes cariogênicos, somente em bactérias orais como *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (Vecchio et al., 2015; Vieira et al., 2018).

Ainda a fim de melhorar a eficácia dos fotossensibilizadores e minimizar a limitação da dificuldade de difusão em biofilmes, observou-se que a adição de nanopartículas aos fotossensibilizadores pode potencializar o efeito da TFDa (Perni et al., 2011; Tian et al.,

2013; Misba et al., 2016), devido a contribuição para gerar ERO localizada em determinada área, aumentando o efeito letal nas bactérias, quando comparado com o FS utilizados sozinhos (Perni et al., 2011). Com isso, Vasconcelos et al. (2019) utilizaram nanopartículas de  $\beta$ -ciclodextrina (32  $\mu$ M) encapsuladas com AM (50  $\mu$ M) em biofilmes de *S. mutans* e biofilme microcosmo oral, com laser de baixa potência (de comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 320 J/cm<sup>2</sup>, potência de 100mW, energia de 9J, abrangendo uma área de 0,028cm<sup>2</sup>), em um estudo *in vitro*. O tempo de pré-irradiação foi de 5 min, seguidos de 90 s de irradiação. Obtiveram que para *S. mutans* houve redução *significativa* na contagem das bactérias para biofilme monoespécie, em todos os grupos expostos a luz (AM+laser, AM+ $\beta$ +laser, e somente laser), com uma variação de 0,55 a 0,74 log<sub>10</sub> UFC/mL, sendo que os dois últimos não diferiram entre si. Para o biofilme microcosmo, o grupo AM+ $\beta$ +laser reduziu significativamente os *S. mutans* com uma variação de 2,15 a 2,48 log<sub>10</sub> UFC/mL, para o grupo AM também houve redução, mas com maior variabilidade entre 1 e 2,3 log<sub>10</sub> UFC/mL, sendo os autores relataram que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para este e o grupo controle. Analisando a contagem total de *streptococci* também não observaram diferença estatisticamente significativa. Observou-se que o grupo AM+ $\beta$ +laser não diferiu do controle, porém este grupo sem aplicação de luz reduziu igualmente a contagem bacteriana que o laser sozinho e o AM+laser. Concluíram que a terapia associando MB,  $\beta$ -ciclodextrina e luz laser reduziu a contagem de *S. mutans* em biofilme microcosmo, porém necessita-se de mais estudos para obter parâmetros melhores para a adição dessa nanopartícula (Vasconcelos et al., 2019). Além disso, associar peróxido de hidrogênio parece ser capaz de aumentar a morte bacteriana (Garcez et al., 2011; Sales et al., 2019). Sales et al. (2019) estudaram o efeito da adição de peróxido de hidrogênio (40  $\mu$ M) na combinação de AM encapsulado com nanopartículas de  $\beta$ -ciclodextrina (na concentração de 4,65  $\mu$ M) para redução de biofilme de *S. mutans*. Utilizaram luz laser (comprimento de onda de 660 nm, feixe de irradiação de 0,028cm<sup>2</sup>, potência de 0,1 W, energia de 9J, densidade de energia de 323 J/cm<sup>2</sup>, por 113 s) ou LED (660 nm, 109cm<sup>2</sup> de área irradiada, densidade de potência 0,09 W/cm<sup>2</sup>, energia de 8,1 J e densidade de energia de 8,1 J/cm<sup>2</sup> por 90 s). Eles obtiveram que a associação do FS e da nanopartícula, gerou redução significativa nos biofilmes de *S. mutans* com ambas as fontes de luz, sendo que ao utilizar a luz laser houve a maior redução bacteriana, de 2,19 log (com LED foi de 1,33 log). A adição de peróxido de hidrogênio não contribuiu, estatisticamente, para aumentar o efeito antibacteriano. O tratamento realizado com AM+peróxido+laser reduziu em 1,94 log, similarmente ocorreu com a combinação AM+ $\beta$ +laser (1,87 log) e AM+ $\beta$ +peróxido+laser (2,19 log). Os autores concluíram que a adição de peróxido de hidrogênio com esses parâmetros não resultou em um efeito potencializador, mas que ele se comportou como um fotossensibilizador quando irradiado com luz laser, já que também foi capaz de produzir morte microbiana (Sales et al., 2019).

Ainda, a fim de melhorar as limitações de alguns fotossensibilizadores, Sanches et al. (2019) estudaram uma forma sintética derivada da curcumina, a diacetilcurcumina (DAC), a qual possui maior facilidade de atravessar a membrana das células bacterianas (Beaumont et al., 2003; Sardi et al., 2017). Observaram que ela reduziu a contagem de *S. mutans*, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo que no último caso conseguiu diminuir 1,7 log<sub>10</sub> UFC, na concentração de 50 µg/mL, comparando com 0,9 log<sub>10</sub> quando utilizado a curcumina na mesma concentração. Assim, concluíram que a DAC possui potencial para ser utilizada como FS, sendo necessárias mais investigações (Sanches et al., 2019). Ainda testando formas de melhorar a ação da curcumina, Nima et al. (2020) adicionaram EDTA (0,4%) para avaliar a redução de *S. mutans* em suspensão planctônica, com luz LED azul por 40 s, e obtiveram que em todos os grupos houve erradicação dos microrganismos. Concluíram que esta pode ser uma técnica promissora para a TFDa (Nima et al., 2020).

Outro estudo, *in vitro*, analisou o já utilizado Papacarie Duo™ combinando-o com Urucum (40 µM) – nomeado de PapaUrucum™-, a fim de avaliar qual seu espectro de absorção de luz para uso com a TFDa, para melhorar sua ação antimicrobiana. Eles observaram que o pico de absorção corresponde à luz ultravioleta foi em torno de 460 nm, o gel combinado com Urucum não foi tóxico para as células hospedeiras e manteve a integridade das fibras colágenas, no entanto não houve diferenças significativas entre o PapaUrucum™ e Urucum puro na viabilidade celular. Portanto, segundo os autores, PapaUrucum™ tem possibilidade de ser utilizado na TFDa, assim mais estudos com diferentes concentrações são necessários (Silva Jr et al., 2020).

## 4 DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado que a TFDa pode ser efetiva em reduzir microrganismos de biofilmes e lesões cariosas, dependendo de vários fatores, tais como o tempo de crescimento dos biofilmes; a complexidade do biofilme analisado; o tipo de fotossensibilizador utilizado e com quais parâmetros de luz; e o tempo de pré-irradiação e irradiação adotados (De Freitas et al., 2017; Méndez et al., 2017), fazendo com que não seja possível uma comparação exata entre eles.

Como observado, a TFDa está se mostrando uma excelente alternativa aos antibióticos, os quais induzem resistência bacteriana ao longo do tempo. No entanto, esta terapia age com maior eficácia em bactérias Gram positivas do que nas Gram negativas, limitando a difusão de alguns FS, devido à proteção extra de ácidos lipoteicóicos que possuem na membrana extracelular (Hamblin, 2017; Minnock et al., 2000). O azul de metileno (AM) possui carga positiva e baixa massa molecular possibilitando sua ação nos dois tipos de bactérias, porém inativa com mais facilidade as bactérias Gram<sup>+</sup>. O fotossensibilizador azul de toluidina O (ou ortho-Azul de Toluidina), segundo Bevilacqua et al. (2007), possui um coeficiente de permeabilidade transmembrana mais alto do que outros FS, conseguindo assim penetrar com maior facilidade a membrana das bactérias, resultando em maior morte microbiana (Bevilacqua et al., 2007). No entanto, a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas depende da absorção de luz (Hamblin e Hasan, 2004). O pico de absorção máxima de luz do AM é em aproximadamente 664 nm (Junqueira et al., 2002; Tardivo et al., 2005; Usacheva et al., 2003) e para o AT em 631 nm (Usacheva et al., 2003), sendo que isto também depende da concentração utilizada (Junqueira et al., 2002; Usacheva et al., 2003).

Um dos FS mais utilizados é o azul de toluidina O (AT) devido a sua toxicidade seletiva (Teixeira et al., 2012; de Oliveira et al., 2018), sua alta capacidade de penetrar em diversas células bacterianas (Zanin et al., 2006; Teixeira et al., 2012; de Oliveira et al., 2018) e sua efetividade em baixas concentrações (Teixeira et al., 2012). Além disso, seu custo acessível e absorção no espectro vermelho (> 600 nm) são pontos favoráveis de acordo com Lima et al. (2019). Entretanto, Karygianni et al. (2014) pontuou que uma das desvantagens, dentre todos os benefícios, é uma menor penetração em biofilmes mais espessos, não conseguindo atingir bactérias mais profundas, quando comparado com a “chlorin e6”. A fonte de luz LED está sendo cada vez mais estudada devido a sua maior acessibilidade, seu baixo custo e ter uma faixa ampla de emissão de luz (Zanin et al., 2006). Assim, estudos com AT e

luz LED demonstraram redução microbiana em biofilmes monoespécies (Beytollahi et al., 2017) e em microcosmo (de Oliveira et al., 2018). No entanto, esse último necessitou de um tempo de tratamento que seria inviável clinicamente (31 min), para conseguir uma redução microbiana significativa. O AT também foi analisado com tempos de irradiação prolongados (15 min), porém bons resultados só foram obtidos *in vitro* (5,48 log<sub>10</sub>UFC). Em modelos de biofilmes *in situ*, com os mesmos parâmetros utilizados no estudo *in vitro*, Teixeira et al. (2012) não observaram resultados significativos. Isso pode estar relacionado com a maior complexidade de biofilmes cultivados em microcosmo e *in situ*. Embora esses modelos permitam condições parecidas àquelas encontradas na cavidade bucal, a terapia *in vivo* pode obter resultados diferentes frente à ação da saliva e outros microrganismos presentes (Teixeira et al., 2012; De Freitas et al., 2017; Méndez et al., 2017).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o AT com o intuito de avaliar a eficácia da TFDa também em lesões de cárie com a mesma concentração, tempo de pré-irradiação e fonte de luz (LED), obtendo resultados promissores. Estudos *in vitro* (Melo et al., 2010) e *in situ* (Lima et al., 2009), com exposição à sacarose, utilizando os mesmos tempos de pré-irradiação (2 min), conseguiram maiores reduções microbianas à medida que aumentavam o tempo de irradiação, porém períodos longos torna o uso clínico inviável. Assim, com 5 min de exposição à luz, Lima et al. (2009) obtiveram redução de mais de 3 log<sub>10</sub> UFC (*S. mutans* e *Lactobacilli*); já Melo et al. (2010) relataram reduções ainda significativas, porém menores (1,8 log<sub>10</sub> UFC para *S. mutans*). Além disso, em ambos os estudos, o tratamento somente com LED (10 min ou mais) possibilitou reduções microbianas ( $\geq 3.47$  log<sub>10</sub> UFC) e os autores atribuem isso a não proteção dos microrganismos pela matriz de polissacarídeos presente no biofilme (Melo et al., 2010). No entanto, devido à complexidade dos microrganismos na cavidade bucal, em estudos *in vivo*, a diminuição na contagem de células viáveis foi menor, com redução de pouco mais de 1 log<sub>10</sub> UFC (Melo et al., 2015), com o mesmo tempo de pré-irradiação e irradiação, reduzindo-se o efeito conforme o tempo de exposição à luz (Steiner-Oliveira et al., 2015). Ademais, Steiner-Oliveira et al. (2015) utilizaram 60 s de pré-irradiação, enquanto todos os demais utilizaram 5 min, sendo que o estudo foi realizado em crianças, as quais necessitam de tempos de tratamentos mais rápidos. Além disso, Lima et al. (2009) sugeriram irradiações na dentina por períodos mais curtos devido a possibilidade de ressecar a dentina e também por conveniência clínica. Assim, as menores reduções bacterianas em estudos clínicos podem estar relacionadas às bactérias ocultas na profundidade dos túbulos dentinários de lesões cariosas profundas, sendo que há dificuldade de penetração do FS nos tecidos desmineralizados, assim como da chegada de luz na profundidade da lesão cariosa, atingindo menores quantidades de microrganismos (Nagata et al., 2012; Melo et al., 2015), já que é sabido que a quantidade de EROs geradas por um

fotossensibilizador fotoativado é correlacionado com a energia absorvida (Balhaddad et al., 2020).

Outro fotossensibilizador muito utilizado é o Azul de metileno por agir tanto em bactérias Gram<sup>+</sup> quanto em Gram<sup>-</sup>, ser acessível e de baixo custo. Entretanto, embora muito estudado na TFDa, sua eficácia ainda é controversa, principalmente em substratos complexos (Méndez et al., 2017). Os estudos com a TFDa mediada por AM e lasers de diodo têm demonstrado bons resultados em biofilmes monoespécies (Azizi et al., 2016; Nemezio et al., 2017), chegando, em um tempo relativamente curto de tratamento, à erradicação total dos microrganismos em biofilme cultivado sem açúcar ou redução de 1,5 log<sub>10</sub> UFC em biofilme exposto frequentemente à sacarose, respectivamente. Utilizando o mesmo FS e luz LED também houve erradicação total das bactérias, porém precisando de quase o dobro de tempo de tratamento para ter um efeito significativo (Leal et al., 2017). O maior período de inativação necessário na presença de sacarose foi explicado pelo aumento do funcionamento da bomba de efluxo, presente no biofilme, em que compostos tóxicos para as bactérias como os fotossensibilizadores são expelidos, necessitando de um tempo maior para que a terapia consiga fazer efeito (Tegos et al., 2008). Esses estudos demonstram que, ao tratar biofilme exposto a glicose ou a sacarose, existe maior atraso na inativação dos microrganismos o que representa um desafio no tratamento usando TFDa sobre biofilmes cariogênicos ou lesões cariosas, sendo que essa é uma doença açúcar-biofilme dependente (Pitts et al., 2017). Utilizando outras fontes de luz combinadas com AM, Tokubo et al. (2018) e Soria-Lozano et al. (2015) conseguiram obter bons resultados com lâmpadas de filamentos de tungstênio e lâmpadas de iodeto metálico, respectivamente, ambos com diminuição microbiana de mais de 4 log<sub>10</sub> UFC na contagem de *S. mutans*. Ademais, parece que períodos curtos e fracionados de irradiação resultam em maiores reduções microbianas (Tokubo et al., 2018). Isso pode estar relacionado devido a reposição de oxigênio durante os períodos sem iluminação, pois os FS necessitam de oxigênio para formar as ERO, aumentando assim a eficácia da terapia (Metcalf et al., 2006; Tokubo et al., 2018). No entanto, ao utilizar outro fotossensibilizador, a eritrosina, analisando biofilme cultivado *in situ* e realizando o tratamento *in vitro*, Tahmassebi et al. (2015) fracionaram a irradiação em dois períodos maiores e somente com um período de escuridão e não encontraram uma diferença grande ao irradiar continuamente por 5 min ou fracionando em 6 min de luz, obtendo redução microbiana de 81,7% e 87%, respectivamente. Tokubo et al. (2018) utilizando eritrosina e curtos períodos de irradiação fracionada obteve diminuição de 4,5 log<sub>10</sub> UFC de *S. mutans*; em estudo anterior, houve diferença de 1,7 log<sub>10</sub> na contagem de *S. mutans* entre irradiação fracionada e contínua (Metcalf et al., 2006; Tokubo et al., 2018). Assim, são necessários mais estudos com fracionamentos de luz para entender se existe correlação com melhores resultados na TFDa.

Ao utilizar LED no espectro vermelho, combinado com AM, Méndez et al. (2017) necessitaram de mais de 30 min para reduzir 1,58  $\log_{10}$  UFC de estreptococos totais em biofilmes de microcosmo oral, o que não são resultados aplicáveis num cenário clínico. Essa diferença de tempo de tratamento e menor redução bacteriana pode ter ocorrido devido a maior complexidade do biofilme microcosmo, pois simulam melhor o que ocorreria *in vivo*. Além disso, os microrganismos desse estudo eram predominantemente acidogênicos e acidúricos, devido à presença de sacarose e da coleta de microrganismos de lesões ativas de cárie dentinária e os microrganismos das camadas mais profundas são mais resistentes ao tratamento devido à baixa quantidade de oxigênio e espessura do biofilme que limita a difusão do FS (Méndez et al., 2017). Quando utilizado *in vivo*, AM e laser, em dentes decíduos com lesões cariosas profundas, obteve-se reduções de microrganismos totais similares com um menor tempo de tratamento, sendo que o tempo de pré-irradiação foi de 5min e o de irradiação de 90s, totalizando 6 min e 30s de tratamento. Já ao analisar os microrganismos relacionados à lesão cariosa em dentina, houve redução significativa para *S. mutans*, *L. casei*, *F. nucleatum* e *A. rima*, apenas com exceção do *S. sobrinus* (Steiner-Oliveira et al., 2015). No entanto, uma redução bacteriana significativa de *S. mutans* ( $> 2,8 \log_{10}$  UFC) foi observada por Alves et al. (2019), com tratamento similar ao citado anteriormente, com a diferença de que o tempo de irradiação foi o dobro (180s). Isto se explica porque diferentes fontes de luz mostram uma relação de dose dependência na redução bacteriana (Tahmassebi et al., 2015). Assim como em biofilmes, a luz branca utilizada em períodos fracionados propiciou uma redução bacteriana relevante no tratamento de lesões cariosas com AM (*in vivo*), reduzindo em média 2,45  $\log_{10}$  UFC, em um período curto de irradiação (Araújo et al., 2015). Portanto, embora esses resultados sejam promissores, ainda é necessário encontrar parâmetros adequados para utilizar a TFDa no cotidiano clínico (Steiner-Oliveira et al., 2015).

Para tentar melhorar a eficácia da TFDa diversos estudos estão testando novas formas de abordagem. As nanopartículas de  $\beta$ -ciclodextrina encapsuladas com AM e irradiadas com laser parecem ser promissoras. Elas foram testadas em biofilme microcosmo reduzindo significativamente a contagem de *S. mutans* (Vasconcelos et al., 2019), porém a adição de peróxido de hidrogênio não possibilitou melhores resultados (Sales et al., 2019). A combinação de fotossensibilizadores como eritrosina e AM também revelou bons resultados em biofilme de *S. mutans*, associado à luz halógena branca com amplo espectro de emissão e curtos períodos de irradiação fracionada, comparado aos FS utilizados separadamente (Tokubo et al., 2018). Tokubo et al. (2018) explicam que FS aniônico (eritrosina) e outro catiônico (AM) possuem forte interação eletrostática, acarretando na proteção da carga negativa da eritrosina, permitindo que assim ela consiga interagir melhor com as membranas microbianas (pois sozinha a permeabilidade à membrana é diminuída devido as bactérias

possuírem cargas negativas nas membranas), assim como o AM, melhorando os resultados na morte das bactérias (Tokubo et al., 2018).

Outro fotossensibilizador promissor é a curcumina associada ao LED, mostrando em células planctônicas (*S. mutans*) a erradicação dos microrganismos (Lee et al., 2017; Nima et al., 2020), com um tempo de tratamento reduzido ao utilizar períodos curtos e fracionados de irradiação (Nima et al., 2020). Além disso, observou-se o aumento da formação de vacúolos na membrana de *S. mutans* com a exposição à luz (Nima et al., 2020). Ainda procurando melhorar a eficácia deste fotossensibilizador, foi adicionado EDTA (0,4%) e também obtiveram completa inativação de *S. mutans* e os autores relacionaram os resultados com facilidade da curcumina em penetrar na membrana bacteriana quando em contato com EDTA, pois observaram maior deformação e ruptura da membrana e maior quantidade do FS no citoplasma das células microbianas (Nima et al., 2020). Em biofilmes multiespécies também houve morte de todas as bactérias ao associar curcumina com luz LED em um tempo de tratamento de 10 min (Araújo et al., 2014). Outro aspecto importante de ser mencionado é que menores concentrações desse fotossensibilizador possibilitam resultados eficazes (Araújo et al., 2014; Nima et al., 2020) visto que em altas concentrações foram encontradas precipitações do FS (Nima et al., 2020), não reagindo adequadamente nestas circunstâncias, ao diminuir a difusão da luz (Araújo et al., 2014; Nima et al., 2020). Por outro lado, Soria-Lozano et al. (2015) utilizaram curcumina com irradiação de lâmpadas de iodeto metálicos em biofilmes de três espécies diferentes (*S. mutans*; *S. sanguis*; *C. albicans*) sendo necessárias diferentes concentrações do FS dependendo da espécie analisada, reduzindo as bactérias em até 6 log<sub>10</sub> UFC e o fungo em 5 log<sub>10</sub> UFC. Isso foi atribuído ao tipo de luz, em concordância com Araujo et al. (2014) e Nima et al. (2020). Entretanto, quando utilizada a curcumina em lesões cariosas em dentina, Araujo et al. (2014) observaram que as maiores concentrações possibilitaram melhor efeito antimicrobiano, ao contrário do ocorrido com os microrganismos em biofilmes. Assim, necessita-se de outros estudos para comparar esses parâmetros em biofilmes e lesões cariosas.

Outros fotossensibilizadores menos utilizados também estão sendo testados em biofilmes cariogênicos, porém com tempos de tratamentos longos, o que inviabiliza sua utilização clínica, tais como a fotoditazina com luz LED, analisado contra biofilme multiespécies (Quishida et al., 2015) e Fotofrin com luz branca (Wood et al., 2006), ambos com cerca de 30 min de tratamento. Outro FS utilizado com sucesso na redução bacteriana, porém com um tempo considerável de irradiação (quase 7 min) é o rosa de bengala (RB) utilizando com lâmpadas de iodeto metálico, mostrando uma diminuição de 6 log<sub>10</sub> UFC (Soria-Lozano et al., 2015). A indocianina verde parece ser promissora contra *S. mutans*, já que ao

ser utilizada com laser, conseguiu erradicar os microrganismos (Azizi et al., 2016), e associada ao LED diminuiu significativamente (67,3%) (Beytollahi et al., 2017). É importante destacar que esses resultados foram obtidos com biofilmes monoespécies e com tempos de tratamento reduzidos, de cerca de 3 e 6 min, respectivamente. Assim, outros estudos com esses fotossensibilizadores devem ser analisados para poder comparar os resultados obtidos.

Sempre na tentativa de melhores desfechos e protocolos na aplicação da TFDa, novos fotossensibilizadores estão sendo analisados. A associação de “*chlorin e6*” com uma fonte de luz de amplo espectro, emitindo comprimentos de onda de luz visível e também infravermelha, mostrou reduções microbianas significativas em biofilmes cultivados *in situ*, com redução microbiana de cerca de 1,4 e 0,9  $\log_{10}$  UFC a mais se comparado ao AT, em bactérias aeróbicas e anaeróbicas (Karygianni et al., 2014), o que parece estar associado a uma inibição da difusão do AT na membrana bacteriana de bactérias anaeróbicas  $G^-$  presentes nas camadas mais profundas do biofilme. Já a “*chlorin e6*” com a diminuição do pH do meio, como ocorre nos casos da formação de biofilmes e lesões cáries, possui maior afinidade com os alvos lipoprotéicos da membrana celular, tendo uma melhor permeabilidade, resultando em uma penetração mais profunda no biofilme mais espesso e em maior morte bacteriana, especialmente na presença de radiação infravermelha (Karygianni et al., 2014). Além disso, a fonte de luz utilizada possui diversas vantagens, uma delas é que aumenta o suprimento de oxigênio, aumentando a formação de EROs e de oxigênio singlete, e também possui uma penetração profunda no tecido, conseguindo inibir o crescimento bacteriano até nesses locais (Karygianni et al., 2014). Nesse sentido de melhorias na eficácia da TFDa, uma forma sintética derivada da curcumina, a diacetilcurcumina (DAC) conseguiu superar os resultados da curcumina, reduzindo quase o dobro de microrganismos, em estudo *in vivo* (Sanches et al., 2019). Os autores acreditam que a DAC tem seu efeito antimicrobiano devido a maior produção de peróxido de hidrogênio obtendo um efeito prolongado, e pela maior capacidade de penetração nas membranas bacterianas devido ter grupos lipofílicos (Sardi et al., 2017; Sanches et al., 2019). Outro estudo buscou melhorar as propriedades antimicrobianas do Papacárie Duo™ adicionando Urucum e analisar sua eficácia para usar na TFDa. Não obtiveram resultados significativos entre a redução bacteriana dessa combinação e do Urucum puro. Observaram que o pico de absorção corresponde a luz ultravioleta em torno de 460 nm e que tem potencial para ser utilizado na TFDa.

Por fim, ainda na tentativa de melhorar a eficácia da TFDa diversos estudos *in vitro* e *in vivo* estão testando a adição de iodeto de potássio ao fotossensibilizador, obtendo redução na contagem bacteriana em até 4  $\log_{10}$  UFC a mais que utilizando somente o FS (Vecchio et al., 2015; Vieira et al., 2018), porém ainda não foram realizados estudos em

biofilmes cariogênicos, o que poderia ser interessante frente aos resultados promissores destes estudos contra *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus* (Vecchio et al., 2015; Vieira et al., 2018).

Diante disso, observa-se que a TFDa é eficaz na redução de microrganismos presentes em biofilmes cariogênicos e em lesões cariosas em dentina, porém para conseguir ser considerado um antimicrobiano efetivo, espera-se uma redução de pelo menos 3 log<sub>10</sub> UFC (Cieplik et al., 2014; Melo et al., 2015). Além disso, é necessária a padronização de protocolos de aplicação a respeito das concentrações de FS, aos tempos de pré-irradiação e irradiação, assim como a condução de estudos clínicos randomizados de qualidade aprimorados dos parâmetros novos ou existentes, que confirmem a eficácia e o potencial dessa terapia.

## 5 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana mostra excelentes resultados para bactérias associadas à carie dentária quando analisada em modelos *in vitro*. Entretanto, ao aumentar a complexidade do modelo cariogênico, os microrganismos e o substrato de estudo, a eficácia diminui. Assim, faz-se necessário mais estudos para determinar os melhores parâmetros a serem utilizados para obter um adequado protocolo de tratamento para uso clínico em biofilmes cariogênicos e dentina cariada.

## REFERÊNCIAS\*

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1407–17. doi: 10.1128/JCM.01410-07.

Allison RR, Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. *Clin Endosc.* 2013;46:24–9. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.24.

Al-Maweri SA, Kalakonda B, AlAizari NA, Al-Soneidar WA, Ashraf S, Abdulrab S, et al. Efficacy of low-level laser therapy in management of recurrent herpes labialis: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2018;33:1423–30. doi: 10.1007/s10103-018-2542-5.

Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves MG, et al. Charge effect on the photoinactivation of gram-negative and gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* 2009;9:1–13. doi: 10.1186/1471-2180-9-70.

Alves LVGL, Curylofo-Zotti FA, Borsatto MC, Salvador SL de S, Valério RA, Souza-Gabriel AE, et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy in carious lesion. Randomized split-mouth clinical trial in primary molars. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:124–30. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.02.018.

Angmar B, Carlström D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastructure Res.* 1963;8:12–23. doi: 10.1016/S0022-5320(63)80017-9.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014;29:629–35. doi: 10.1007/s10103-013-1369-3.

Araújo PV, Correia-Silva J de F, Gomez RS, Massara M de L de A, Cortes ME, Poletto LT de A. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12:401–7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.06.003.

Azizi A, Shademan S, Rezai M, Rahimi A, Lawaf S. Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Streptococcus* mutants: In vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;16:66–71. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.08.002.

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Azizi A, Mousavian S, Taheri S, Lawaf S, Gonoudi E, Rahimi A. Comparison of the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy with two mediators against *Lactobacillus acidophilus* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:357–62. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.014.

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;21:1–14. doi: 10.3390/ijms21207612.

Bargrizan M, Fekrazad R, Goudarzi Niloofar, Goudarzi Nastaran. Effects of antibacterial photodynamic therapy on salivary mutans streptococci in 5- to 6-year-olds with severe early childhood caries. *Lasers Med Sci.* 2018;34:433–40. doi: 10.1007/s10103-018-2650-2.

Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K. Design of Ester Prodrugs to Enhance Oral Absorption of Poorly Permeable Compounds: Challenges to the Discovery Scientist. *Curr Drug Metab.* 2003;4:461–85. doi: 10.2174/1389200033489253.

Bello-Silva MS, Wehner M, De Paula Eduardo C, Lampert F, Poprawe R, Hermans M, et al. Precise ablation of dental hard tissues with ultra-short pulsed lasers. Preliminary exploratory investigation on adequate laser parameters. *Lasers Med Sci.* 2013;28:171–84. doi: 10.1007/s10103-012-1107-2.

Bernal Rodriguez CG, Eduardo CDP, Aranha ACC, De Freitas PM. Photobiomodulation with Low-Level Laser in the Treatment of Trismus after Radiotherapy: A Case Report. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg.* 2019;37:240–3. doi: 10.1089/photob.2018.4524.

Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera A, Teodoro GR, Zângaro RA, et al. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:513–8. doi: 10.1089/pho.2007.2109.

Beytollahi L, Pourhajibagher M, Chiniforush N, Ghorbanzadeh R, Raoofian R, Pourakbari B, et al. The efficacy of photodynamic and photothermal therapy on biofilm formation of *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;17:56–60. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.10.006.

Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North Am.* 2010;54:479–93. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.006.

Brantley CF, Bader JD, Shugars DA, Nesbit SP. Does the cycle of reresoration lead to larger restorations? *J Am Dent Assoc.* 1995;126:1407–13. doi: 10.14219/jada.archive.1995.0052.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados Principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. doi: 10.3310/hta21210.

Carvalho JC, Ekstrand KR, Thylstrup A. Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption. *J Dent Res.* 1989;68(5):773-779. doi: 10.1111/j.1600-0722.1993.tb01638.x.

Caufield PW, Shah GR, Hollingshead SK. Use of transposon Tn916 to inactivate and isolate a mutacin-associated gene from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1990;58:4126–35. doi: 10.1128/iai.58.12.4126-4135.1990.

Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014;5:1–17. doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.

Costa ACBP, Campos Rasteiro VM, Da Silva Hashimoto ESH, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, et al. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114:67–74. doi: 10.1016/j.oooo.2012.02.002.

Costa H, Solla J, Suassuna A, Pucca Júnior GA. Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal. 2004 [acesso em 2020 Jul 20. Disponível em: [http://antigo.prefcedro.sc.gov.br/arquivosdb/basico1/0.507031001179517670\\_01\\_manual\\_brasil\\_sorridente.pdf](http://antigo.prefcedro.sc.gov.br/arquivosdb/basico1/0.507031001179517670_01_manual_brasil_sorridente.pdf).

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994;176:2137–42. doi: 10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.

Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995;15:137–40. doi: 10.1007/BF01569816.

De Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on Mono- and Multi-Species Cariogenic Biofilms: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* 2017;35:239–45. doi: 10.1089/pho.2016.4108.

- De Melo WCMA, Avci P, De Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: Taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11:669–93. doi: 10.1586/14787210.2013.811861.
- de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2018;22:1751–61. doi: 10.1007/s00784-017-2270-4.
- de Moura AAM, Moura-Netto C, Barletta FB, Vieira-Júnior ND, de Paula Eduardo C. Morphological assessment of dentine and cementum following apicectomy with Zekrya burs and Er:YAG laser associated with direct and indirect Nd:YAG laser irradiation. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109:e77–82. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.12.032.
- de Oliveira FS, Cruvinel T, Cusicanqui Méndez DA, Dionísio EJ, Rios D, Machado MAAM. The in vitro effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on dental microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: A pilot study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:163–7. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.12.005.
- de Oliveira AB, Ferrisse TM, Marques RS, de Annunzio SR, Brighenti FL, Fontana CR. Effect of photodynamic therapy on microorganisms responsible for dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2019;20. doi: 10.3390/ijms20143585.
- Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004;17:245–54. doi: 10.1177/039463200401700304.
- 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. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2007;86:59–69. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2006.07.011.
- Elliott JC. Structure, crystal chemistry and density of enamel apatites. *CIBA Found Symp*. 1997:54–72. doi: 10.1002/9780470515303.ch5.
- Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25:5–12. doi: 10.1111/j.1600-0528.1997.tb00894.x.
- Ferreira FNH, Gondim JO, Neto JJSM, dos Santos PCF, de Freitas Pontes KM, Kurita LM, et al. Effects of low-level laser therapy on bone regeneration of the midpalatal suture after rapid maxillary expansion. *Lasers Med Sci*. 2016;31:907–13. doi: 10.1007/s10103-016-1933-8.

Foot CS. Definition of Type I and Type I1. *Photochem Photobiol.* 1991;54:659.

Frostell G, Keyes PH, Larson RH. Effect of various sugars and sugar substitutes on dental caries in hamsters and rats. *J Nutr.* 1967;93:65–76. doi: 10.1093/jn/93.1.65.

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: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.013.

Gandhi K, Pavaskar R, Cappetta E, Drew H. Effectiveness of Adjunctive Use of Low-Level Laser Therapy and Photodynamic Therapy After Scaling and Root Planing in Patients with Chronic Periodontitis. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2019;39:837–43. doi: 10.11607/prd.4252.

Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR, et al. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10:483–90. doi: 10.1039/c0pp00082e.Antimicrobial.

George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2009;8:788–95. doi: 10.1039/b809624d.

Gibbons RJ, Houte J Van. On the Formation of Dental Plaques. *J Periodontol.* 1973;44:347–60. doi: 10.1902/jop.1973.44.6.347.

Going RE, Loesche WJ, Grainger DA, Syed SA. The viability of microorganisms in carious lesions five years after covering with a fissure sealant. *J Am Dent Assoc.* 1978;97:455–62. doi: 10.14219/jada.archive.1978.0327.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011 Jan;3:711-35. doi: 10.2741/e281.

Grzech-Leśniak K, Gaspirc B, Sculean A. Clinical and microbiological effects of multiple applications of antibacterial photodynamic therapy in periodontal maintenance patients. A randomized controlled clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:44–50. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.05.028.

Guglielmi C de AB, Simionato MRL, Ramalho KM, Imperato JCP, Pinheiro SL, Luz MAAC. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt.* 2011;16:088003. doi: 10.1117/1.3611009.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980;44:331–84. doi: 10.1128/mmbr.44.2.331-384.1980.

Hamblin MR, Hasan T. Enacting strategies for graduate employability: A look at multiple issues and disciplines. *Photochem Photobiol*. 2004;3:436–50. doi: 10.1039/b311900a.Photodynamic.

Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:67–73. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.

Hamblin MR. Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation by inorganic salts. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15:1059–69. doi: 10.1080/14787210.2017.1397512.Potentiation.

Hoppenbrouwers PMM, Driessens FCM, Borggreven JMPM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol*. 1987;32:319–22. doi: 10.1016/0003-9969(87)90085-9.

Hu X, Huang YY, Wang Y, Wang X, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to control clinically relevant biofilm infections. *Front Microbiol*. 2018;9:1–24. doi: 10.3389/fmicb.2018.01299.

Ichimura H, Yamaguchi S, Kojima A, Tanaka T, Niiya K, Takemori M, et al. Eradication and reinfection of human papillomavirus after photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Oncol*. 2003;8:322–5. doi: 10.1007/s10147-003-0354-4.

Innes NPT, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv Dent Res*. 2016;28:49–57. doi: 10.1177/0022034516639276.

Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti MS, Baptista MS. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys*. 2002;4:2320–8. doi: 10.1039/b109753a.

Karygianni L, Ruf S, Follo M, Hellwig E, Bucher M, Anderson AC, et al. Novel broad-spectrum antimicrobial photoinactivation of in situ oral biofilms by visible light plus water-filtered infrared A. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:7324–36. doi: 10.1128/AEM.02490-14.

Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res*. 2017;96:380–7. doi: 10.1177/0022034517693566.

Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol*. 1960 Mar;1:304-20. doi: 10.1016/0003-9969(60)90091-1.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011;43:755–67. doi: 10.1002/lsm.21080.

Kidd EAM. How “clean” must a cavity be before restoration? *Caries Res*. 2004;38:305–13. doi: 10.1159/000077770.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):694-707. doi: 10.1177/154405910708600803.

Kwada A, Kameyama H, Sangen Y, Tezuka T. Acne phototherapy with a high intensity, enhanced, narrow-band, blue light source: An open study and in vitro investigation. *J Dermatol Sci*. 2002 Nov;30(2):129-35. doi: 10.1016/s0923-1811(02)00068-3.

Lager A, Thornqvist E, Ericson D. Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or carisolv. *Caries Res*. 2003;37:206–11. doi: 10.1159/000070446.

Leal CRL, Alvarenga LH, Oliveira-Silva T, Kato IT, Godoy-Miranda B, Bussadori SK, et al. Antimicrobial photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* is altered by glucose in the presence of methylene blue and red LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;19:1–4. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.04.004.

Lee HJ, Kang SM, Jeong SH, Chung KH, Kim B II. Antibacterial photodynamic therapy with curcumin and *Curcuma xanthorrhiza* extract against *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;20:116–9. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.09.003.

Leme AFP, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):878-87. doi: 10.1177/154405910608501002.

Lennon ÁM, Attin T, Buchalla W. Quantity of remaining bacteria and cavity size after excavation with FACE, caries detector dye and conventional excavation in Vitro. *Oper Dent*. 2007;32:236–41. doi: 10.2341/06-64.

Lennon ÁM, Attin T, Martens S, Buchalla W. Fluorescence-aided Caries Excavation (FACE), Carie Detector and Conventional Caries Excavation in Primary Teeth. *Pediatr Dent*. 2008;31:316–9.

Lima JPM, Sampaio De Melo MA, Borges FMC, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre Dos Santos M, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci*. 2009;117:568–74. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00662.x.

Löe H. Ural hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J*. 2000;50:129–39. doi: 10.1111/j.1875-595X.2000.tb00553.x.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50:353–80. doi: 10.1128/membr.50.4.353-380.1986.

Lopes AO, Aranha ACC. Comparative evaluation of the effects of Nd:YAG laser and a desensitizer agent on the treatment of dentin hypersensitivity: A clinical study. *Photomed Laser Surg*. 2013;31:132–8. doi: 10.1089/pho.2012.3386.

Machado AC, Maximiano V, Eduardo CDP, Azevedo LH, De Freitas PM, Aranha AC. Associative Protocol for Dentin Hypersensitivity Using Nd:YAG Laser and Desensitizing Agent in Teeth with Molar-Incisor Hypomineralization. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg*. 2019;37:262–6. doi: 10.1089/photob.2018.4575.

MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54:7–14. doi: 10.1159/000503309.

Madani A, Ahrari F, Fallahrastegar A, Daghestani N. A randomized clinical trial comparing the efficacy of low-level laser therapy (LLLT) and laser acupuncture therapy (LAT) in patients with temporomandibular disorders. *Lasers Med Sci*. 2020;35:181–92. doi: 10.1007/s10103-019-02837-x.

Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R-M, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 24;104(17):7223-8.

- Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1992;14:262–6. doi: 10.1016/1011-1344(92)85104-3.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995;15:169–75. doi: 10.1007/BF01569822.
- Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res.* 2015;94:241–51. doi: 10.1177/0022034514562833.
- Melo MAS, de-Paula DM, Lima JPM, Borges FMC, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, et al. In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria. *Laser Phys.* 2010;20:1504–13. doi: 10.1134/s1054660x10110174.
- Melo MAS, Rolim JPML, Passos VF, Lima RA, Zanin ICJ, Codes BM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12:581–6. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.09.005.
- Méndez DAC, Gutierrez E, Dionísio EJ, Oliveira TM, Buzalaf MAR, Rios D, et al. Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers Med Sci.* 2017;33:479–87. doi: 10.1007/s10103-017-2379-3.
- Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood SR. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:190–2. doi: 10.1093/jac/dkl205.
- Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:522–7. doi: 10.1128/AAC.44.3.522-527.2000.
- Mirouze N, Ferret C, Cornilleau C, Carballido-López R. Antibiotic sensitivity reveals that wall teichoic acids mediate DNA binding during competence in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun.* 2018;9. doi: 10.1038/s41467-018-07553-8.
- Misba L, Kulshrestha S, Khan AU. Antibiofilm action of a toluidine blue O-silver nanoparticle conjugate on *Streptococcus mutans*: a mechanism of type I photodynamic therapy. *Biofouling.* 2016;32:313–28. doi: 10.1080/08927014.2016.1141899.

Moan J, Peng Q. An Outline of the Hundred-Year History of PDT. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3591-600.

Moore C, Wallis C, JL M, MD K. Photodynamic treatment of herpes keratitis. *Infect Immun.* 1972;5:169–71.

Moreno EC, Aoba T. Comparative solubility study of human dental enamel, dentin, and hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int.* 1991;49:6–13. doi: 10.1007/BF02555895.

Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:77–80. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00418.x.

Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2003;134:87–95. doi: 10.14219/jada.archive.2003.0021.

Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Ajlal S. Applications of Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lasers) for Restorative Dentistry. *Med Princ Pract.* 2016;25:201–11. doi: 10.1159/000443144.

Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res.* 2011;90:506–11. doi: 10.1177/0022034510391906.

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: 10.1016/j.pdpdt.2017.10.025.

Ngo HC, Mount G, Mc Intyre J, Tuisuva J, Von Doussa RJ. Chemical exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: An in vivo study. *J Dent.* 2006;34:608–13. doi: 10.1016/j.jdent.2005.12.012.

Nima G, Soto-Montero J, Alves LA, De Mattos-Graner RO, Giannini M. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* by curcumin in combination with EDTA. *Dent Mater.* 2020;1–14. doi: 10.1016/j.dental.2020.09.015.

Nitzan Y, Dror R, Ladan H, Malik Z, Kimel S, Gottfried V. Structure-Activity Relationship of Porphines for Photoinactivation of Bacteria. *Photochem Photobiol.* 1995;62:342–7. doi: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb05279.x.

Oong EM, Griffin SO, Kohn WG, Gooch BF, Caufield PW. The effect of dental sealants on bacteria levels in caries lesions: A review of the evidence. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:271–8. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0156.

Ornellas PO, Antunes LS, Motta PC, Mendonça C, Póvoa H, Fontes K, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct for Clinical Partial Removal of Deciduous Carious Tissue: A Minimally Invasive Approach. *Photochem Photobiol.* 2018;94:1240–8. doi: 10.1111/php.12966.

Perni S, Prokopovich P, Pratten J, Parkin IP, Wilson M. Nanoparticles: Their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10:712–20. doi: 10.1039/c0pp00360c.

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 May 25;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.

Pourshahidi S, Ebrahimi H, Mansourian A, Mousavi Y, Kharazifard M. Comparison of Er,Cr:YSGG and diode laser effects on dentin hypersensitivity: a split-mouth randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2019;23:4051–8. doi: 10.1007/s00784-019-02841-z.

Queiroga AS, Veloso HHP, Resende ÂB de, Limeira Júnior F de A. Utilização dos lasers de Er:YAG e Nd:YAG na desinfecção do sistema de canais radiculares: revisão de literatura TT - Use of Er:YAG and Nd:YAG lasers in the disinfection of root canals system: a literature review. *Arq odontol.* 2010;46:105–9.

Quishida CCC, Carmello JC, Mima EG de O, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci.* 2015;30:685–94. doi: 10.1007/s10103-013-1397-z.

Reis ACM, Regis WFM, Rodrigues LKA. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy : An alternative approach for reducing cariogenic bacteria. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:179–89. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.03.012.

Ricketts D, Lamont T, Innes NPT, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013:CD003808. doi: 10.1002/14651858.CD003808.pub3.

Ricketts D, Innes N, Schwendicke F. Selective Removal of Carious Tissue. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:82–91. doi: 10.1159/000487838.

Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variatooon in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res.* 1971;5:44–57. doi: 10.1159/000259731.

Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:481–95. doi: 10.1177/10454411000110040601.

Rossi R, Bruscinio N, Ricceri F, Grazzini M, Dindelli M, Lotti T. Photodynamic treatment for viral infections of the skin. *G Ital Dermatol Venereol.* 2009 Feb;144(1):79-83.

Sales LS, Guimarães GN, Wijesinghe GK, Moreira KMS, Joia F, Stipp RN, et al. Addition of hydrogen peroxide to methylene blue conjugated to  $\beta$ -cyclodextrin in photodynamic antimicrobial chemotherapy in *S. mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;28:226–33. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.09.004.

Sanches CVG, Sardi J de CO, Terada RSS, Lazarini JG, Freires IA, Polaquini CR, et al. Diacetylcurcumin: a new photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy in *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling.* 2019;35:340–9. doi: 10.1080/08927014.2019.1606907.

Sardi J de CO, Polaquini CR, Freires IA, Galvão LC de C, Lazarini JG, Torrezan GS, et al. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. *J Med Microbiol.* 2017;66:816–24. doi: 10.1099/jmm.0.000494.

Schwendicke F, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Paris S. Failure of incompletely excavated teeth - A systematic review. *J Dent.* 2013;41:569–80. doi: 10.1016/j.jdent.2013.05.004.

Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res.* 2016;28:58–67. doi: 10.1177/0022034516639271.

Schwendicke F. Contemporary concepts in carious tissue removal: A review. *J Esthet Restor Dent.* 2017;29:403–8. doi: 10.1111/jerd.12338.

Silva Jr ZS, França CM, Araújo Prates R, Botta SB, Ferrari RAM, Ana PA, et al. The effects of photodynamic therapy with blue light and papain-based gel associated with Urucum, on collagen and fibroblasts: a spectroscopic and cytotoxicity analysis. *Lasers Med Sci.* 2020;35:767–75. doi: 10.1007/s10103-019-02857-7.

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 Microbiol.* 2015;15:1–8. doi: 10.1186/s12866-015-0524-3.

Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011;55:143–66. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x.

Sozzi M, Fornaini C, Cucinotta A, Merigo E, Vescovi P, Selleri SS. Dental ablation with 1064 nm, 500 ps, diode pumped solid state laser: A preliminary study. *Laser Ther.* 2013;22:195–9. doi: 10.5978/islsm.13-OR-16.

Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha ACC, Ramalho KM, Mayer MPA, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015;20:108003. doi: 10.1117/1.jbo.20.10.108003.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002;81:603–7. doi: 10.1177/154405910208100905.

Tahmassebi JF, Drogkari E, Wood SR. A study of the control of oral plaque biofilms via antibacterial photodynamic therapy. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015;16:433–40. doi: 10.1007/s40368-014-0165-5.

Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res.* 2016;50:422–31. doi: 10.1159/000447309.

Takahashi N, Sato T. Preferential utilization of dipeptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 2001;80:1425–9. doi: 10.1177/00220345010800050801.

Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:50–4. doi: 10.1046/j.0902-0055.2001.00089.x.

Takahashi N, Yamada T. Pathways for amino acid metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:96–102. doi: 10.1034/j.1399-302X.2000.150205.x.

Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism : From “ Who Are They ?” to “ What Are They Doing ?” *J Dent Res.* 2015;94:1628–37. doi: 10.1177/0022034515606045.

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 Photodyn Ther.* 2005;2:175–91. doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.

Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:3202–9. doi: 10.1128/AAC.00006-08.

Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LKA, Saxena D, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res.* 2012;46:549–54. doi: 10.1159/000341190.

Tellez M, Gomez J, Kaur S, Pretty IA, Ellwood R, Ismail AI. Non-surgical management methods of noncavitated carious lesions. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41:79–96. doi: 10.1111/cdoe.12028.

Thompson V, Craig RG, Curro FA, Green WS, Ship JA. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: A critical review. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(6):705–712 doi: 10.14219/jada.archive.2008.02.

Tian G, Ren W, Yan L, Jian S, Gu Z, Zhou L, et al. Red-emitting upconverting nanoparticles for photodynamic therapy in cancer cells under near-infrared excitation. *Small.* 2013;9:1929–38. doi: 10.1002/smll.201201437.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77:1622–9. doi: 10.1177/00220345980770081001.

Tjäderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: The era of “dentin degradomics”. *Caries Res.* 2015;49:193–208. doi: 10.1159/000363582.

Tokubo LM, Rosalen PL, de Cássia Orlandi Sardi J, Freires IA, Fujimaki M, Umeda JE, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;23:94–8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.05.004.

Uraz A, Çetiner FD, Cula S, Guler B, Oztoprak S. Patient perceptions and clinical efficacy of labial frenectomies using diode laser versus conventional techniques. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2018;119:182–6. doi: 10.1016/j.jormas.2018.01.004.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2003;71:87–98. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002.

Van Loveren C. Sugar Restriction for Caries Prevention: Amount and Frequency. Which Is More Important? *Caries Res.* 2019;53:168–75. doi: 10.1159/000489571.

Vasconcelos MEOC, Cardoso AA, Da Silva JN, Alexandrino FJR, Stipp RN, Nobre-Dos-Santos M, et al. Combined Effectiveness of  $\beta$ -Cyclodextrin Nanoparticles in Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on In Vitro Oral Biofilms. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019 Sep;37(9):567-573. doi: 10.1089/photob.2019.4669.

Vecchio D, Gupta A, Huang L, Landi G, Avci P, Rodas A, et al. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:5203–12. doi: 10.1128/AAC.00019-15.

Vieira C, Gomes ATPC, Mesquita MQ, Moura NMM, Neves GPMS, Faustino AF, et al. An insight into the potentiation effect of potassium iodide on APDT efficacy. *Front Microbiol.* 2018;9:1–16. doi: 10.3389/fmicb.2018.02665.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J.* 1997 Aug;42(4):247-54. doi: 10.1111/j.1834-7819.1997.tb00129.x.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. *Caries Res.* 2004;38:530–6. doi: 10.1159/000080582.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992;25:77–81. doi: 10.1007/BF01570963.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412–8. doi: 10.1039/b211266c.

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:680–4. doi: 10.1093/jac/dkl021.

Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:64–9. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00263.x.

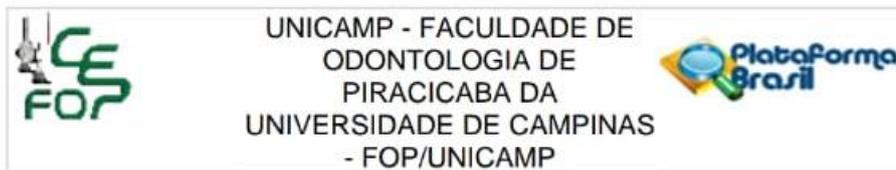
Zezell DM, Boari HGD, Ana PA, Eduardo CDP, Powell GL. Nd:YAG laser in caries prevention: A clinical trial. *Lasers Surg Med.* 2009;41:31–5. doi: 10.1002/lsm.20738.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

TCC Andreza 2			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
<b>7</b> %	<b>6</b> %	<b>4</b> %	%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet		<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>idoc.pub</b> Fonte da Internet		<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>repositorio.unesp.br</b> Fonte da Internet		<b>&lt;1</b> %
<b>4</b>	<b>www.cruzeirosul.edu.br</b> Fonte da Internet		<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>Ana Caroline Fumes. "Influência do tempo de pré-irradiação empregado na terapia fotodinâmica antimicrobiana", Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP, 2019</b> Publicação		<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>www.bv.fapesp.br</b> Fonte da Internet		<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>repositorio.ufpb.br</b> Fonte da Internet		<b>&lt;1</b> %

## Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito da adição de iodeto de potássio na terapia fotodinâmica antimicrobiana em dentina afetada e resistência de união a materiais restauradores

**Pesquisador:** Alejandra Brenes Alvarado

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26674319.1.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.761.749

#### Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil

A LISTA DE PESQUISADORES citada na capa do projeto de pesquisa inclui ALEJANDRA BRENES ALVARADO (Cirurgiã Dentista, Doutoranda no PPG em Odontologia, área de Odontopediatria, da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsável), ANDREZA RIBEIRO FERRAZ (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora participante), CAROLINA STEINER OLIVEIRA ALARCON (Cirurgiã Dentista, Docente da área de Odontopediatria da FOP- UNICAMP, Pesquisadora participante, Orientadora), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo laboratorial, longitudinal, com intervenção, em três etapas, numa das quais serão envolvidos três alunos do PPG em Odontologia da FOP- UNICAMP, sem distinção de sexo, com idade estimada de 22-40 anos para obtenção de amostras de saliva que serão utilizadas como insumo no ambiente de cultura de microrganismos.

O projeto será desenvolvido in vitro e dividido em três etapas: a primeira etapa será um estudo exploratório para determinar a concentração, o tempo de pré-irradiação do fotossensibilizador e o parâmetro de irradiação da TFDA associado ao KI. Na segunda etapa será desenvolvido um estudo exploratório para determinar um modelo de microcosmo para a formação de lesão de cárie em

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 11 de Dezembro de 2019

Assinado por:  
Fernanda Miori Pascon  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Limeira 901 Caixa Postal 52  
**Bairro:** Areião  
**UF:** SP  
**Município:** PIRACICABA  
**CEP:** 13.414-903  
**Telefone:** (19)2106-5349  
**Fax:** (19)2106-5349  
**E-mail:** cep@fop.unicamp.br

### Anexo 3 – Iniciação Científica

**Processo** 2019/22450-4  
**Linha de Fomento** Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo  
**Situação** Em Execução  
**Vigência** 01/02/2020 a 31/12/2020  
**Beneficiário** Andreza Ribeiro Ferraz     
**Responsável** Carolina Steiner Oliveira Alarcon       
**Vínculo Institucional do Processo** Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

#### Relatório Científico

**Número do Relatório Científico** 1  
**Data do Compromisso** 30/09/2020  
**Período Relacionado** 01/02/2020 a 10/07/2020  
**Situação** Aprovado  
**Data da Submissão** 25/09/2020