UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DANIELA ALEJANDRA CUSICANQUI MÉNDEZ

**Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre grupos
específicos de microrganismos provenientes de microcosmos de
lesões de cárie em dentina**

BAURU
2017

DANIELA ALEJANDRA CUSICANQUI MÉNDEZ

**Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre grupos
específicos de microrganismos provenientes de microcosmos de
lesões de cárie em dentina**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva

BAURU

2017

M523e

Méndez, Daniela Alejandra Cusicanqui
Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
sobre Grupos Específicos de Microrganismos
Provenientes de Microcosmos de Lesões de Cárie em
Dentina / Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez - Bauru,
2017

85 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 34559314.6.0000.5417
Data: 06/08/2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A meu amado **Filipe**.

A mis queridos papás **José y Teresa**.

A mis Hermanos **José y Claudia**.

A mis sobrinos, **Luciana, Franco, Fabián y Leandro**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

Pai, Tu conhece todas as coisas. Muito obrigada, porque O senhor trouxe muitas bênçãos na minha vida, me deu saúde e colocou as pessoas certas ao meu redor para me ajudar. Porque não quero que se consolidem meus planos e sim os planos que Tu tens para mim.

Ao meu marido **Filipe**,

Obrigada meu amor, por sempre ser meu apoio, meu sustento, quem me ensina, quem me aconselha, quem me cuida. Obrigada amor por cada oração, por ser um homem de Deus, humilde e correto. Eu te admiro muito, um marido exemplar. Deus te guardou para mim. Amor este trabalho é nosso, pois nada teria conseguido se você não estivesse aí para me ajudar, ficando madrugadas lendo e aprendendo comigo, trouxe calma nas horas de desespero, me deu segurança, fortalecendo-me. Eu te amo!

A mis papitos **José y Teresa**,

Papis amados, muchas gracias por todo, por ser ejemplos de superación, mostrarme que luchar por nuestros sueños es el verdadero sentido de nuestras vidas y pensar en que siempre podemos más, nunca rendirse. Ustedes son perfectos para mí, Dios escogió sabiamente en que familia me pondría, ustedes son mi bendición. Los amo incondicionalmente para siempre y hasta la eternidad.

A mis hermanitos **Pepe e Clau**,

Mis segundos papis, todas las experiencias y consejos que ustedes me dieron son de inmenso valor para mí, los amo mucho! Clau, mujer sabia, vencedora, guerrera te amo mucho en esta vida tendremos muchas preguntas sin responder, pero todo tiene una lección, tú me enseñaste que cada momento en familia es único e irremplazable.

Aos meus sogros **Meire e Paulo**,

Obrigada por todo o carinho e apoio, sei que posso contar sempre com vocês. Amo vocês.

A meus amigos queridos **Paulo e Marcinha**,

Obrigada por todos os conselhos que foram essenciais para meu crescimento espiritual e acadêmico. Vocês são mais que amigos, fazem parte da minha família. Amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Thiago Cruvinel**,

Obrigada pelo acolhimento, guardo no coração cada minuto dispensado para orientar e ensinar. Você é uma pessoa de muito bom coração, inteligente, humilde e excelente profissional. Admiro muito você, obrigada por tudo.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Prof.^a Dr.^a Daniela Rios, Prof.^a Dr.^a Thaís Marchini de Oliveira**.

À disciplina de Odontopediatria e seus funcionários.

Ao centro integrado de pesquisa da **FOB-USP**, na pessoa do **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**.

Aos técnicos **Marcelo, Rafaela e Márcia**.

Aos colegas que colaboraram na pesquisa,

Evandro, Eliézer, Veridiana, obrigada pela disponibilidade e companheirismo.

As minhas colegas de Pós-graduação,

Por todo apoio e carinho, formamos uma turma muito boa com amizades sinceras. Adoro vocês, **Estef, Elô, Tata, Natti, Mariel, Juliana e Mayara**.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB/USP**, na pessoa da sua Diretora, **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP-Botucatu**. Na pessoa da técnica em microscopia, **Shelly Favorito de Carvalho**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Pela concessão da bolsa de Mestrado (processo n° 2015/08595-9) e auxílio regular à pesquisa (processo n° 2014/10897), essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho.

“Mas se nos entregarmos completamente a Deus, e seguirmos Sua direção em nosso trabalho, Ele mesmo Se responsabilizará pelo cumprimento. Não quer que nos entreguemos a conjeturas sobre o êxito de nossos esforços honestos. Nem uma vez devemos pensar em fracasso. Devemos cooperar com Aquele que não conhece fracasso.”

(Parábolas de Jesus)

Ellen G. White

Resumo

RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido proposta como tratamento coadjuvante da lesão de cárie dentária. Entretanto, ainda não existem protocolos adequados para o seu uso na prática clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aPDT sobre a viabilidade de grupos específicos de microrganismos provenientes de lesão de cárie em dentina e a produção de ácido láctico. Amostras de dentina infectada foram coletadas de 3 crianças e utilizadas como inóculos para o crescimento de biofilmes microcosmos sobre blocos de dentina bovina, em anaerobiose a 37°C por 5 dias. Em seguida, os biofilmes foram tratados pela associação de azul de metileno e um LED vermelho (630 nm) ou pela combinação de curcumina e um LED azul (455 nm). A viabilidade de grupos de microrganismos específicos foi determinada pelas contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de microrganismos totais viáveis (Agar Soja Triptona Sangue), estreptococos totais (Agar Mitis Salivarius), estreptococos do grupo mutans (Agar Mitis Salivarius com sacarose a 20% e bacitracina a 0,2%) e lactobacilos totais (Agar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13%). O método de espectrofotometria enzimática foi utilizado para avaliar a concentração de L-lactato em meio de cultura. A análise estatística foi conduzida pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ($P < 0,05$). Ambas as condições de aPDT, azul de metileno + LED vermelho e curcumina + LED azul, reduziram significativamente as contagens de UFC de todos os grupos de microrganismos. O efeito de dose-dependência foi observado apenas pelo uso do azul de metileno + LED vermelho. A produção de ácido láctico foi dependente do corante e LED utilizados. Considerando a combinação azul de metileno e LED vermelho, a concentração de ácido láctico foi estatisticamente menor para todos os grupos em relação ao controle, exceto para o grupo tratado apenas com o corante. Quando a associação de curcumina e LED azul foi utilizada, não foram observadas reduções significativas da concentração de ácido láctico. Portanto, a aPDT mediada pelo azul de metileno foi capaz de reduzir a viabilidade e acidogenicidade de microcosmos de cárie em dentina, enquanto a aPDT mediada pela curcumina reduziu apenas a viabilidade de microrganismos.

Palavras-chave: Cárie dentária. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, Biofilme.

Abstract

ABSTRACT

Effect of the Antimicrobial Photodynamic Therapy on specific microorganism groups from dentin caries microcosms

The antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been proposed as an adjuvant therapy for dental caries, although there are not suitable protocols for its clinical application. The aim of this study was to evaluate the effect of the aPDT on the viability of specific microorganism groups and the production of lactic acid from dentin caries microcosms. Dentin samples were collected from three children and used as inoculum to produce biofilm microcosms. The biofilms were grown on bovine dentine discs in anaerobic conditions at 37°C for five days. Then, biofilms were treated by the association of methylene blue with a red LED (630 nm) or curcumin with a blue LED (455 nm). The viability of specific microorganisms was determined by the counts of colony-forming units (CFU) of total microorganisms (Trypticase Soy Agar Blood), total streptococci (Mitis Salivarius Agar), mutans streptococci (Mitis Salivarius Bacitracin Sucrose Agar) and total lactobacilli (Rogosa Agar). The spectrophotometry enzymatic method was used to determine the concentration of L-lactate in culture media. The statistical analysis was performed by Kruskal Wallis and post-hoc Dunn's test ($P < 0.05$). Both conditions of aPDT, methylene blue + red LED and curcumin + blue LED, reduced significantly the CFU counts of all microorganism groups. The dose-dependent effect was observed only in the combination of methylene blue + red LED. The production of lactic acid depended on the combination of the dye and the LED used. The concentration of lactic acid was significantly reduced after the treatments with the combination of methylene blue with red LED when compared to control group. In contrast, the treatment with the dye alone did not interfere on the acidogenicity of microcosms. When the association of curcumin and blue LED was applied, no significant reductions were observed in the lactic acid concentrations. Therefore, the methylene blue-mediated aPDT was able to reduce the viability and the acidogenicity of dentin caries microcosms, whereas the curcumin-mediated aPDT reduced only the viability of microorganisms.

Key words: Dental Caries, Photochemotherapy, Biofilm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	ARTIGOS	19
2.1	Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pelo azul de metileno sobre biofilmes microcosmos de lesão de cárie em dentina	20
2.2	Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Mediada Pela Curcumina e LED Azul Sobre Microcosmos de Cárie em Dentina.....	44
3	DISCUSSÃO.....	67
4	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS.....	83

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A lesão de cárie em dentina é o resultado do avançado estágio de desenvolvimento do processo de cárie dentária. Este processo ocorre pela interação dos tecidos dentários do hospedeiro, dos microrganismos bucais, dos carboidratos provenientes da dieta, e dos fatores genéticos e ambientais (CUMMINS, 2013). A progressão da lesão ocorre pelo processo lento e contínuo de flutuação de pH do meio bucal, com predominância de eventos relacionados à desmineralização dentária (FEJERSKOV, 2004). A queda do pH ocorre pela mediação de microrganismos acidogênicos e acidúricos, capazes de fermentar carboidratos provenientes da dieta (BEIGHTON, 2005; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). O meio ácido promove a seleção de microrganismos acidúricos, que se tornam cada vez mais numerosos na composição do biofilme (PAES LEME et al., 2006; LIMA et al., 2011). Desta forma, a acidogenicidade do biofilme aumenta, fazendo com que o pH permaneça cada vez mais tempo abaixo dos valores críticos para a desmineralização (KIDD; FEJERSKOV, 2004; SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007; CUMMINS, 2013).

O biofilme dentário pode ser entendido como um consórcio complexo e dinâmico, composto por microrganismos e seus produtos, com o objetivo do estabelecimento de um ambiente adequado à adaptação e sobrevivência da microflora (KIDD; FEJERSKOV, 2004; LI et al., 2004). Em cavidades de lesão de cárie, microrganismos como estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans possuem uma grande capacidade de produção de glucanos insolúveis (AAS et al., 2008; DIGE; GRONKJAER; NYVAD, 2014), favorecendo a acumulação de uma microbiota diversa, composta predominantemente por microrganismos não cultiváveis, estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus gordonii* (AAS et al., 2008).

Atualmente, o tratamento recomendado para as lesões profundas de cárie em dentina é baseado nos conceitos de remoção parcial do tecido cariado, visando à limitação dos danos causados, à preservação dos tecidos passíveis de remineralização e ao maior sucesso clínico dos procedimentos (LULA et al., 2011; SINGHAL; ACHARYA; THAKUR, 2016). Entretanto, apesar deste conhecimento ser

difundido há quase uma década (RICKETTS, 2008), apenas 49% dos dentistas que conhecem a técnica de remoção parcial a praticam, pois não acreditam em seus resultados ou não sentem segurança em executá-la (KATZ et al., 2013).

Uma alternativa seria a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como um tratamento coadjuvante da remoção parcial ou da não remoção do tecido cariado de lesões em dentina, para a redução imediata e localizada da viabilidade dos microrganismos localizados no interior da lesão (GURSOY et al., 2013). A aPDT pode ser entendida sequencialmente pela aplicação prévia de um agente fotossensibilizante (Ps), que é absorvido pelas células microbianas. Em seguida, uma fonte de luz complementar é empregada para a fotoirradiação do local sensibilizado, aumentando a energia molecular do Ps, que passa a um estado tripleto excitado (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A molécula em estado tripleto apresenta carga, com um elétron mais periférico e instável. Esta molécula pode formar radicais livres (reação fotoquímica tipo I) ou reagir com moléculas de oxigênio endógeno, produzindo espécies reativas, tais como o oxigênio singleto (reação fotoquímica tipo II) (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Ambas as reações podem ou não acontecer simultaneamente, provocando a morte e/ou danos às células, afetando a membrana celular, mitocôndrias, lisossomos ou o DNA celular (MAISCH, 2007; TARASZKIEWICZ et al., 2013; VATANSEVER et al., 2013).

Existem muitos agentes fotossensibilizantes que tem sido empregados na aPDT, tais como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, riboflavina, corantes sintéticos, corantes fenotiazínicos, compostos naturais, entre outros (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). O azul de metileno [cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenotiazina-5-io] é uma das opções mais utilizadas e estudadas. Trata-se de um corante fenotiazínico catiônico de baixo peso molecular, com pico de absorção de luz em 660 nm, possuindo efeito sobre os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Ele é hidrofílico, o que facilita a sua penetração pela membrana bacteriana, e apresenta grande afinidade pela mitocôndria celular, de carga negativa (NIKAIDO, 2003; SRIDHARAN; SHANKAR, 2012). A curcumina é um corante extraído da raiz da *Curcuma longa*, comumente utilizada como um tempero de cor amarela viva (CRIVELLO; BULUT, 2005). Possui peso molecular de 368,38 g.mol⁻¹, sendo insolúvel em água. Com esta finalidade, o corante já foi dissolvido em soluções contendo n-metil-glucamina (ARAUJO et al., 2012, 2014), etanol (MANOIL

et al., 2014) e dimetilsulfóxido (DMSO) (DOVIGO et al., 2011). O corante tem sido usado como agente antitumoral, antioxidante e antiinflamatório (DUVOIX et al., 2005). Estudos prévios demonstraram que a curcumina poderia ser utilizada como um agente fotossensibilizante na aPDT para reduzir a viabilidade de microrganismos cariogênicos (ARAUJO et al., 2012; PASCHOAL et al., 2013; ARAUJO et al., 2014; MANOIL et al., 2014; SORIA-LOZANO et al., 2015; TONON et al., 2015).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da aPDT mediada por dois corantes, o azul de metileno e a curcumina, sobre biofilmes microcosmos de lesão de cárie em dentina. Para tanto, os efeitos sobre a viabilidade de microrganismos e a produção de ácido lático foram analisados.

2 Artigos

2. ARTIGOS

Os artigos que compõem esta dissertação foram regidos conforme as normas de publicação do periódico *Journal of Biomedical Optics*.

Artigo 1- Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pelo azul de metileno sobre microcosmos de cárie em dentina

Artigo 2- Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pela curcumina e LED azul sobre microcosmos de cárie em dentina

Artigo 1-**Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pelo azul de metileno sobre microcosmos de cárie em dentina**

Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez^a, Eliezer Gutierrez^a, Evandro José Dionisio^a, Thaís Marchini Oliveira^a, Marília Afonso Rabelo Buzalaf^b, Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado^a, Thiago Cruvinel^a

^aDepartamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

^bDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

Autor Correspondente:

Thiago Cruvinel

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru – SP, Brasil

Fone: +55 14 3235 8318 Telefax: +55 14 3223 4679

Email: thiagocruvinel@fob.usp.br

Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pelo azul de metileno sobre microcosmos de cárie em dentina

Resumo

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido estudada como um tratamento coadjuvante da lesão de cárie dentária, porém ainda não existem protocolos bem definidos para o seu uso na prática clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da aPDT sobre microcosmos de cárie em dentina, pela análise da contagem de microrganismos e produção de ácido láctico. Os biofilmes cresceram sobre discos de dentina bovina em meio McBain modificado, em anaerobiose a 37°C por 5 dias. A aPDT foi realizada pela associação do corante azul de metileno a 100 mg.L⁻¹ e um LED 630 nm a 37,5 ou 75 J.cm⁻². A viabilidade de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos foi determinada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia. A produção de ácido láctico foi analisada pelo método de espectrofotometria enzimática. A análise estatística foi conduzida pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ($P<0,05$). Apenas o azul de metileno (L-C+) não foi capaz de interferir na viabilidade de microrganismos, ao contrário do LED a 75 J.cm⁻², que diminuiu a contagem de microrganismos totais e lactobacilos. A combinação entre o corante e o LED reduziu significativamente as contagens de todos os grupos de microrganismos. A produção de ácido láctico foi estatisticamente menor em todos os grupos em relação ao controle, exceto para o grupo L-C+. Portanto, a aPDT mediada pelo azul de metileno promoveu a redução da viabilidade e acidogenicidade de microcosmos de cárie em dentina.

Palavras-Chave: Cárie Dentária, Dentina, Fotoquimioterapia, Azul de metileno.

INTRODUÇÃO

A lesão de cárie em dentina é o resultado do estágio avançado de desenvolvimento do processo de cárie dentária. Este processo ocorre pela interação dos tecidos dentários do hospedeiro, dos microrganismos bucais, dos carboidratos provenientes da dieta, e dos fatores genéticos e ambientais (1). A progressão da lesão ocorre pelo processo lento e contínuo de flutuação de pH do meio bucal, com predominância de eventos relacionados à desmineralização dentária (2). A queda do pH ocorre pela mediação de microrganismos acidogênicos e acidúricos, capazes de fermentar carboidratos provenientes da dieta (3, 4). O meio ácido promove a seleção de microrganismos acidúricos, que se tornam cada vez mais numerosos na composição do biofilme (5, 6). Desta forma, a acidogenicidade do biofilme aumenta, fazendo com que o pH permaneça por períodos cada vez mais longos abaixo dos valores críticos para a desmineralização (1, 4, 7).

O biofilme dentário pode ser entendido como um consórcio complexo e dinâmico, composto por microrganismos e seus produtos, com o objetivo do estabelecimento de um ambiente adequado à adaptação e sobrevivência da microflora (7, 8). Em cavidades de lesão de cárie, microrganismos como estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans possuem uma grande capacidade de produção de glucanos insolúveis (9, 10), favorecendo a acumulação de uma microbiota diversa, composta predominantemente por microrganismos não cultiváveis, estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus gordonii* (10-12).

O tratamento restaurador de lesões de cárie em dentina tem sido preconizado após a remoção parcial e/ou não-remoção do tecido cariado, com o intuito de preservação da estrutura dentária passível de remineralização, evitando exposições pulpare e a progressão da lesão (13, 14). Entretanto, apesar das técnicas de mínima intervenção serem conhecidas pela maioria dos cirurgiões-dentistas (82,1%), apenas 49,6% a utilizam na prática, sendo que 22,5% confessam não acreditar em seus resultados (15). Para que o profissional possa se sentir mais confortável e seguro, sendo estimulado a executar procedimentos de mínima intervenção no ambiente clínico-odontológico, a incorporação de agentes antimicrobianos na composição de cimentos de ionômero de vidro tem sido propostos (16, 17). Porém, nestas condições, as propriedades físico-químicas e mecânicas dos materiais são

parcialmente deterioradas, o que poderia levar a uma perda precoce da restauração ou a falhas microestruturais (18).

Paralelamente, o uso da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) também tem sido proposta para reduzir a viabilidade bacteriana dos microrganismos após a remoção parcial do tecido cariado (19-23). Isso poderia contribuir para um tratamento mais eficiente da cárie dentária, devido à diminuição do risco de recidivas da doença, da necessidade de retratamentos restauradores e dos custos associados ao tratamento. Além disso, o tratamento poderia ser mais confortável, pois o cirurgião-dentista seria mais conservador durante a remoção do tecido cariado, pois por insegurança ou despreparo, muitas vezes remove mais tecido que o necessário para o sucesso clínico do procedimento, comprometendo o remanescente dentário (24).

Teoricamente, a aPDT seria capaz de matar grande parte dos microrganismos remanescentes imediatamente após a sua aplicação, diminuindo a possibilidade de recorrência da lesão de cárie (19). Este conceito foi confirmado por uma revisão sistemática recém-publicada (25). A aPDT é um processo que apresenta 3 componentes: um agente fotossensibilizante (PS), uma fonte de luz de comprimento de onda complementar e o oxigênio (26). As células microbianas absorvem moléculas do Ps, sendo posteriormente irradiadas com uma fonte de luz complementar. As moléculas do Ps se tornam excitadas (estado tripleto de longa duração), podendo transferir a energia acumulada ou elétrons às estruturas vizinhas (27). A reação de aPDT pode ser de dois tipos: tipo I – produção de radicais livres pela transferência de elétrons, e tipo II – transferência de elétrons para moléculas de oxigênio, que se transformam na sua forma mais reativa (oxigênio singleto) (26). Os dois tipos de reações podem ocorrer simultaneamente (28). As células microbianas podem ser danificadas e/ou mortas pela oxidação de organelas celulares, DNA e destruição das membranas celulares (26, 29). Apesar disso, a aPDT parece ser um procedimento seguro no tratamento de cavidades profundas de lesão de cárie dentária, dando ao profissional segurança durante a execução da técnica (20).

Dentre as opções de Ps para aPDT, o azul de metileno [cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenotiazina-5-io] é uma das opções mais utilizadas e estudadas. Trata-se de um corante fenotiazínico catiônico de baixo peso molecular, com pico de absorção de luz em 660 nm, possuindo efeito sobre os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Ele é hidrofílico, o que facilita a sua penetração pela

membrana bacteriana, e apresenta grande afinidade pela mitocôndria celular, de carga negativa (30, 31). Apesar de existirem estudos *in vivo* utilizando a aPDT mediada pelo azul de metileno (19, 21, 32, 33), ainda não foi possível o estabelecimento de um protocolo efetivo para a redução da viabilidade de biofilmes complexos de lesão de cárie em dentina. Os estudos clínicos se basearam em evidências produzidas pelo tratamento *in vitro* de biofilmes mono-espécie (20, 34-36), ou células planctônicas (37); porém, o distanciamento dos modelos utilizados em relação à realidade poderia contribuir para a superestimação do efeito da aPDT na prática clínica, promovendo a utilização da terapia antes mesmo da realização de testes laboratoriais mais confiáveis.

Neste sentido, a disponibilidade de um modelo de biofilme de maior complexidade, com o intuito de realização de estudos laboratoriais relacionados ao efeito da aPDT sobre microrganismos de lesão de cárie em dentina seria bastante pertinente. O biofilme microcosmos é um consórcio de microrganismos coletados *in natura* e crescidos em condições pré-estabelecidas, possuindo relação estreita com as características encontradas em modelos *in vivo* (38), além da vantagem do controle rigoroso das condições experimentais.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da aPDT sobre biofilmes microcosmos de lesão de cárie em dentina. Para tanto, foram avaliadas a capacidade de diferentes protocolos da aPDT em reduzir a viabilidade de microrganismos e a produção de ácido láctico de microcosmos de cárie dentária em dentina. As hipóteses nulas foram que não existe diferença entre a contagem de microrganismos de biofilmes tratados e não tratados com a aPDT mediada pelo azul de metileno (H0), e que não existe diferença entre a quantidade de ácido láctico produzida por biofilmes tratados e não tratados com a aPDT mediada pelo azul de metileno (H0').

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (CAAE: 34559314.6.0000.5417) (Anexo A).

Coleta da Dentina Infectada

O termo de consentimento livre esclarecido foi assinado após a orientação e esclarecimento da pesquisa, pelos responsáveis por três crianças. Os critérios de inclusão dos voluntários foram crianças na faixa etária de 7 a 11 anos sem síndromes e/ou alterações de saúde sistêmica congênitas ou adquiridas, com presença de lesão de cárie em dentina em primeiros ou segundos molares decíduos, sem exposição pulpar, não devendo estar sob tratamento antibiótico até 90 dias antes do procedimento de coleta (33).

As coletas de dentina foram realizadas na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Previamente, a criança foi anestesiada e o dente foi isolado e lavado com jato de água. Posteriormente, com o uso de uma colher de dentina estéril, amostras de dentina infectada foram removidas do interior da cavidade e transferidas para criotubos contendo 2 mL de meio Brain Heart Infusion [BHI, 37 g de infusão cérebro-coração diluídos em água deionizada/L, pH 7,2] com glicerol a 20%, sendo acondicionadas em gelo picado. Os dentes foram restaurados com cimento de ionômero de vidro (Ketac Fil Plus®, 3M Espe, Minnesota, E.U.A.). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

Preparo das Soluções Estoque

As três amostras de biofilme dentinário foram descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, sonicadas vigorosamente a 40 mW, 1 pulso/s por 15 s (Vibra Cell™, Sonics and Materials Inc, Newtown, E.U.A.). Um pool de microrganismos foi preparado pela mistura de 1,5 mL de cada amostra. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex (Phoenix, AP 56, Araraquara, Brasil). Um volume de 400 µL da mistura foi transferido para um tubo universal contendo 10 mL de meio McBain modificado [mucina a 2,5 g.L⁻¹, peptona a 2,0 g.L⁻¹, peptona de caseína a 2,0 g.L⁻¹, extrato de levedura a 1,0 g.L⁻¹, NaCl a 0,35 g.L⁻¹, KCl a 0,2 g.L⁻¹, CaCl₂ a 0,2 g.L⁻¹, hemina a 0,001 g.L⁻¹, vitamina K1 a 0,0002 g.L⁻¹, agente tamponador PIPES a 50 mmol.L⁻¹, sacarose a 0,4% diluídos em água deionizada/L, pH 7,0] (39). As suspensões foram incubadas em anaerobiose a 37°C overnight. Para o armazenamento da solução estoque, alíquotas de 600 µL das suspensões microbianas foram transferidas para criotubos e misturadas a 600 µL de glicerol a 60%. As soluções foram congeladas em freezer a -80°C até o momento de sua utilização.

Preparo dos Espécimes Dentinários

Os espécimes dentinários foram obtidos de raízes de incisivos bovinos. Restos de tecido gengival e ligamento periodontal foram removidos das raízes com o uso de uma cureta periodontal (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários SA, Rio de Janeiro, Brasil). Posteriormente, as raízes foram seccionadas no sentido longitudinal com discos diamantados Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Petrópolis, Brasil), obtendo-se duas metades. Discos de dentina de 5 mm de diâmetro foram confeccionados com o uso de uma broca trefina nº 5 (Alpha Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil). Para a regularização superficial dos espécimes, os discos foram lixados sequencialmente com lixas de granulação 600, 800 e 1.200 (Erios Equipamentos Ltda, São Paulo, Brasil) por 10 s, e polidos na politriz metalográfica APL4 Arotec (Arotec S.A., Cotia, Brasil). Finalmente, os discos foram lavados no ultrassom T7 Thornton (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, Brasil) por 20 min, e posteriormente mantidos em água deionizada estéril até o momento de sua utilização.

Crescimento de Biofilme Microcosmos

A versão modificada do modelo Active Attachment Biofilm Model Amsterdam (ACTA, Amsterdã, Holanda) foi utilizado para esta finalidade (40). O modelo consiste em uma tampa de aço com 24 parafusos de poliestireno adaptados para a fixação horizontal dos espécimes dentários. A tampa se encaixa perfeitamente sobre placas de 24 poços, contendo os meios para crescimento e tratamento dos biofilmes. Os espécimes foram fixados com silicone de condensação leve (Zetaplus®, Zhermack, Badia Polesine, Itália). Em seguida, os modelos permaneceram em temperatura ambiente por 12 h, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e posteriormente secos em estufa.

No dia anterior ao início do crescimento dos biofilmes, 400 µL da solução estoque de microrganismos foi adicionado a 10 mL de meio McBain suplementado com sacarose a 1% e incubado em anaerobiose a 37°C overnight. Posteriormente, cada 10 mL da solução reativada foi misturada a 10 mL de meio McBain fresco suplementado com sacarose a 1%. Então, alíquotas de 1,5 mL foram uniformemente distribuídas nos poços de uma placa de 24 poços e o modelo de biofilme foi adaptado. Os biofilmes cresceram em condições anaeróbicas a 37°C por 5 dias,

com a renovação do meio McBain suplementado com sacarose a 1% ocorrendo a cada 24 h.

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

O corante azul de metileno (Sigma-Aldrich, Saint Louis, E.U.A.) foi utilizado como agente fotossensibilizante. A solução de azul de metileno foi preparada imediatamente antes de sua aplicação, pela diluição em água deionizada estéril até a concentração final de 100 mg.L⁻¹ (268 µM). Alíquotas de 1,5 mL da solução de azul de metileno ou água deionizada foram transferidas para os poços de uma placa de 24 poços, sendo mantidas sob a proteção da luz até a sua utilização (21). O protótipo Biotable® RGB (Laboratório de Apoio Tecnológico, São Carlos, Brasil) foi utilizado como uma fonte de luz LED (light emitting diode) na etapa de fotoirradiação dos biofilmes. Para os experimentos, até 24 amostras de biofilme poderiam ser irradiadas ao mesmo tempo, utilizando a mesma faixa de comprimento de onda (660±30 nm), mesma distância (≈25 mm) e irradiância (40 mW.cm⁻²). Duas densidades de energia de luz foram utilizadas para os experimentos (37,5 e 75 J.cm⁻²), correspondendo às energias totais de 3,75 J e 7,5 J e aos tempos de 15 min e 35 s e 31 min e 10 s de exposição à luz, respectivamente. A irradiância da Biotable® RGB foi mensurada antes de cada sessão de aPDT, utilizando-se o equipamento Laser Power/ Energy Meter Field Max II (Coherent, Portland, E.U.A.). Quando necessário, o tempo de irradiação foi corrigido pela seguinte fórmula:

$$t(s) = \text{Energia total (J)} \times [\text{Potência (W)}]^{-1}$$

Os biofilmes foram tratados pela associação do corante azul de metileno e LED vermelho, considerando-se seus respectivos controles negativos, como se segue: controle (L-C-), apenas corante (L-C+), apenas aplicação do LED (L37,5C- e L75C-), e aPDT (L37,5C+ e L75C+).

No momento do tratamento, cada biofilme foi previamente lavado em meio Água Cisteína-Peptona (CPW) [5 g de extrato de levedura, 1 g de peptona, 8,5 g de NaCl e 0,5 g de L-cisteína HCl/L, pH 7,3] por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Os biofilmes foram então incubados por 2 min na solução fotossensibilizante ou em água deionizada, e logo protegidos contra a luz. Em seguida, os biofilmes foram ou não irradiados pela luz LED, de acordo com os seus respectivos grupos. Por fim, os biofilmes foram removidos do modelo de crescimento

com uma pinça tipo Müller (Golgran, Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda, São Caetano do Sul, Brasil) cautelosamente, para não remover o biofilme. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições.

Análise da Produção de Ácido Lático

Após os tratamentos, cada disco de dentina contendo biofilme foi transferido para um tubo Falcon com 3 mL do meio água-peptona tamponado (BPW) [20 g de água-peptona tamponada diluída em água deionizada/L, pH 7,2], suplementado com sacarose a 0,2%. Os tubos foram incubados anaerobicamente a 37 °C por 3 horas. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de microcentrifuga e mantidos em banho-maria a 85°C por 5 min, para a paralisação da produção de ácido lático. Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer - 20°C até o momento de análise. As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método de espectrofotometria enzimática (41). O princípio do método é baseado na conversão enzimática de L-lactato em piruvato, com concomitante conversão de NAD em NADH, com aumento do valor de absorbância de acordo com a formação de NADH. As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro BioTek (BioTek Instruments Inc, Winooski, E.U.A.), no comprimento de onda 340 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentrações de ácido láctico de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva-padrão, com valores entre 0 e 3 mmol.L⁻¹.

Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Os biofilmes aderidos aos discos de dentina foram dispersos por sonicação em gelo a 40 mW, 1 pulso/s por 1min (Vibra Cell™, Sonics and Materials Inc, Newtown, E.U.A.). Após a homogeneização em vórtex, as soluções foram diluídas serialmente em meio CPW (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000). Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram inoculadas horizontalmente em placas de Petri contendo Agar Soja Triptona Sangue, Agar Mitis Salivarius, Agar Mitis Salivarius contendo bacitracina a 0,2% e sacarose a 20% e Agar Rogosa com ácido acético glacial a 0,13%, para o crescimento de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, respectivamente. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48-72 h, com exceção das placas de Agar

Rogosa, incubadas em condições anaeróbicas a 37°C por 48-72 h. As UFC foram devidamente contadas e determinadas.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS Statistics 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova Iorque, E.U.A.). As contagens das UFC foram transformadas na base log10 antes da aplicação dos testes estatísticos. A hipótese de distribuição normal dos dados obtidos foi rejeitada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes não-paramétricos para amostras independentes de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn foram utilizados para determinar as diferenças significativas entre os grupos específicos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Contagem de UFC

Os resultados da contagem de UFC são apresentados na Figura 1. Quando as contagens de microrganismos do grupo controle foram comparadas aos grupos tratados apenas com LED ou apenas com azul de metileno, não foram observadas diferenças significantes para estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans, enquanto o tratamento apenas com LED a 75 J.cm⁻² reduziu significativamente a contagem de microrganismos totais e lactobacilos totais.

Após a aplicação da aPDT, pode-se notar uma redução da viabilidade de todos os tipos de microrganismos estudados. A contagem de microrganismos totais foi reduzida em 0,92 e 1,58 log10 para os grupos L37,5C+ e L75C+, respectivamente. Os mesmos padrões de redução foram observados para as contagens de estreptococos totais (0,66 e 1,58 log10), estreptococos do grupo mutans (0,72 e 1,36 log10) e lactobacilos totais (0,77 e 1,97 log10). As diferenças entre os grupos L-C- e L75C+ foram estatisticamente significativas para todos os grupos específicos de microrganismos. O mesmo padrão de diferenças significativas não foi observado entre os grupos L-C- e L37,5C+, exceto para a contagem de lactobacilos totais.

Apesar da diferença entre os grupos L37,5C+ e L75C+ ser significativa apenas para o grupo de microrganismos totais, observa-se uma tendência de redução dose-dependente da viabilidade dos tipos de microrganismos estudados.

Figura 1. Viabilidade de microrganismos totais (a), estreptococos totais (b), estreptococos do grupo mutans (c) e lactobacilos totais (d) em diferentes grupos. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Concentração de Ácido Láctico

Os resultados da concentração de ácido láctico em meio BPW após o tratamento com aPDT são apresentados na Tabela 1. Todos os grupos tratados com a luz LED, com ou sem associação com o azul de metileno, apresentaram concentrações de ácido láctico similares entre si, porém significativamente menores em relação ao grupo controle (L-C-). Apesar disso, observa-se uma tendência de queda na concentração de ácido láctico com o aumento da intensidade da luz LED. Ao mesmo tempo, a concentração de ácido láctico observada nos grupos não irradiados pela luz LED (L-C- e L-C+) foram estatisticamente semelhantes.

Tabela 1 – Concentração de ácido láctico (mmol.L⁻¹) nos diferentes grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Grupos	Média (±DP)	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo	IC (95%)	
					Limite	Limite
L-C^{-a}	1,34±0,35	1,38	0,80	1,74	0,97	1,70
L37,5 C^{-b,c}	0,83±0,18	0,77	0,64	1,07	0,64	1,01
L75 C^{-b}	0,68±0,11	0,64	0,58	0,89	0,57	0,80
L-C^{+a,c}	0,95±0,28	0,96	0,62	1,28	0,66	1,29
L37,5 C^{+b,c}	0,87±0,15	0,89	0,65	1,06	0,72	1,03
L75 C^{+b,c}	0,84±0,16	0,77	0,68	1,11	0,67	1,01

DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* avaliou a capacidade de diferentes protocolos de aPDT em reduzir a viabilidade de grupos de microrganismos específicos de microcosmos de cárie em dentina. Quando comparados aos grupos controle, os resultados demonstraram uma redução significativa da contagem de UFC de todos os microrganismos estudados, após a associação da fotossensibilização com azul de metileno a 100 mg.L⁻¹ e a irradiação com LED a 75 J.cm⁻², na proporção de 23,5% de microrganismos totais, 24,3% de estreptococos totais, 23,9% de estreptococos do grupo mutans e 29,8% de lactobacilos totais. Nossos resultados estão de acordo com os estudos realizados em modelos *in vivo* mediados por corantes fenotiazínicos, que apresentaram redução de 21,7-33,9% em microrganismos totais, 11,7-46,3% em estreptococos do grupo mutans e 13,4-30,8% em lactobacilos (21, 32, 42). A efetividade da aPDT no controle da viabilidade de microrganismos de biofilmes complexos foi menor que aquelas observadas em estudos *in vitro* com células planctônicas (37) e biofilmes mono- e duo-espécies (20, 34-36). Esta hipótese pode ser justificada pela maior complexidade dos biofilmes microcosmos, caracterizados por um consórcio de múltiplos grupos microbianos coletados de tecidos vivos específicos (5, 9, 43), que se utilizam dos mecanismos de *quorum sensing*, nos quais ocorre a comunicação célula-célula pela produção, detecção e resposta a pequenas moléculas sinais difusíveis, que influenciam diretamente no aumento da patogenicidade (44), virulência (45) e resistência das células-residentes de comunidades microbianas (46, 47).

É interessante observar uma tendência de efeito dose-dependente em todos os grupos de microrganismos estudados, confirmada no grupo de microrganismos totais. Este resultado apoia o conceito de maior benefício fotodinâmico pelo aumento

da dose total de luz. Para a elucidação dos resultados alcançados, a ação da aPDT sobre outros grupos de microrganismos específicos ou mesmo sobre espécies determinadas deve ser o foco de análises futuras, com a utilização de metodologias biomoleculares. Com exceção da redução dose-dependente observada para os microrganismos totais, nossos resultados foram similares aos descritos por Lima et al. (2009), o único estudo que também avaliou o efeito de dose-dependência da aPDT sobre biofilmes complexos de cárie dentária. Os autores utilizaram o azul de orto-toluidina para reduzir a viabilidade dos mesmos grupos de microrganismos estudados neste trabalho, pelo crescimento de biofilmes *in situ* sobre blocos de dentina humana por 14 dias, com 10 desafios de sacarose por dia (48).

As concentrações de ácido láctico revelam a capacidade metabólica acidogênica dos biofilmes (49), estando diretamente relacionada à quantidade de açúcar que os microrganismos podem fermentar. Por este motivo, logo após os tratamentos, os biofilmes foram re-incubados em um meio pobre em nutrientes (BPW) com a suplementação de sacarose a 0,2% (3, 49). Os resultados de nossos ensaios demonstraram uma diminuição significativa da produção de ácido láctico em todos os grupos com aplicação da luz LED, porém sem demonstração do efeito de dose-dependência. Neste sentido, o tratamento de biofilmes de *S. mutans* e microcosmos salivares com fluoreto de amina também causou a diminuição da produção de ácido láctico com tendência de dose-dependência, porém sem observar diferenças estatísticas entre os tipos de biofilme, demonstrando que nem todos os microrganismos de microcosmos possuem capacidade acidogênica (49).

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho utilizando microcosmos de lesão de cárie em dentina para o estudo da efetividade da aPDT. Microrganismos de lesões de cárie possuem um potencial acidogênico e acidúrico bem definido (3), com composição diversa daquela encontrada na saliva e em biofilmes aderidos sobre superfícies dentárias híginas (50). Entretanto, após a tomada de decisão, uma dificuldade se tornou latente: a quantidade de microrganismos provenientes de um mesmo inóculo talvez não seria suficiente para um crescimento adequado de biofilmes microcosmos em condições *in vitro*, hipótese confirmada após a realização de estudos-pilotos (dados não mostrados). Para solucionar o problema, um pool de microrganismos do interior de pelo menos três lesões de cárie em dentina foi previamente crescido em caldo de meio McBain suplementado com sacarose a 0,4% para o preparo das soluções estoque iniciais.

Apesar do crescimento de biofilmes sob a pressão de sacarose proporcionar a seleção da microbiota cariogênica em detrimento da microbiota não-cariogênica (51, 52), neste caso particular, acreditamos que os biofilmes já apresentavam uma composição predominantemente cariogênica, pois se originavam do interior de lesões de cárie. Portanto, a pressão de sacarose ocorrida durante o preparo das soluções estoque não seria determinante para a modificação da estrutura microbiana inicial, o que não afetaria a similaridade dos microcosmos com os biofilmes coletados clinicamente. Porém, novos estudos precisam ser desenvolvidos para a confirmação da hipótese.

Apesar do presente modelo de biofilme não apresentar bombas de fluxo para a simulação de condições salivares, como ocorre no caso dos reatores de biofilme, o Active Attachment Biofilm Model propiciou ótimas condições para a proposta do estudo, possibilitando o teste inicial de diferentes condições de aPDT de forma rápida, barata e eficiente. Inicialmente, o modelo permite apenas a adesão ativa do biofilme sobre o substrato (40, 49, 53), eliminando a possibilidade de adesão passiva de microrganismos, o que em teoria, aumentaria a capacidade metabólica dos microcosmos. Os biofilmes cresceram sobre discos de dentina de dentes bovinos, de acordo com outros trabalhos na literatura (40, 54). A dentina bovina é muito similar a dentina humana (55), podendo ser obtida de forma mais fácil e rápida. Os discos de dentina foram fixados aos parafusos de poliestireno com o uso de silicona de condensação leve, o que facilitou a remoção dos discos do modelo de biofilme e diminuiu os riscos de perda de espécimes durante os ensaios laboratoriais. Como vantagem, nos permitiu o crescimento de biofilme apenas sobre a face dos discos de dentina que estava voltada perpendicularmente para a fonte de luz LED. Além disso, proporcionou que todas as amostras fossem irradiadas simultaneamente com uma distância padronizada, diminuindo o tempo da pesquisa e os riscos de ressecamento e contaminação dos biofilmes.

Sabe-se que o tempo de crescimento (49) e a suplementação de sacarose (56) poderiam afetar os resultados obtidos no presente estudo. Tais parâmetros foram estabelecidos pela realização de estudos-pilotos. A contagem média de microrganismos totais observada após 5 dias de crescimento de biofilme (6,72 log10) foi semelhante às contagens iniciais de microrganismos de estudos *in vivo* (7,10 log10) (21). Além disso, trabalhos anteriores também utilizaram o mesmo tempo de crescimento (57-59). Evidências demonstraram que períodos mais longos

de tempo de crescimento aumentam a resistência de biofilmes polimicrobianos aos agentes antimicrobianos (49), o que possivelmente também seria observado após a aPDT. Já uma maior concentração de sacarose induz ao maior número de células microbianas viáveis no biofilme (56). A concentração de sacarose utilizada em nosso estudo foi de 1%, similar aos estudos de Baptista et al. (2012) e Teixeira et al. (2012) (59, 60).

A espessura do biofilme também é um fator importante a ser considerado nos estudos de aPDT, pois pode interferir na penetração do agente fotossensibilizante e da fonte de luz, servindo como uma barreira mecânica (61). Além disso, microrganismos localizados em maiores profundidades de biofilme são mais resistentes aos agentes antimicrobianos devido a escassez de espaço intercelular, quantidade de matriz extracelular (9) e baixas concentrações de oxigênio e nutrientes (26, 62), o que acarreta a diminuição do perfil metabólico das células viáveis.

O uso do azul de metileno como um agente fotossensibilizante é bastante estudado em pesquisas odontológicas (20, 54, 60), sendo comumente utilizado na concentração de 100 mg.L⁻¹ (19, 21, 32, 33). Trata-se de um reagente barato e de fácil disponibilidade para o clínico. O corante tem a capacidade de formar oxigênio singleto, que danifica a membrana celular e o DNA bacteriano, provocando a morte por apoptose e necrose (34). O tempo de pré-irradiação adotado no presente estudo é similar aos descritos anteriormente, variando entre 2 e 5 min (19-21, 32-34, 37, 59).

Apesar de não colimada, a fonte de luz LED também é capaz de promover a morte de microrganismos em associação com agentes fotossensibilizantes, com a produção de uma insignificante quantidade de calor, o que contribui para a maior biocompatibilidade de sua aplicação e durabilidade do equipamento (63). Um estudo prévio demonstrou uma redução similar da viabilidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* mediadas pela utilização do laser ou do LED ($\lambda = 640 \pm 30$ nm), associados ao azul de metileno (54). Além disso, a maior abrangência do espectro de luz do LED poderia favorecer a complementariedade da absorção de fótons pelas moléculas dos agentes fotossensibilizantes. O custo-benefício de sua aplicação é ainda maior quando se considera a sua portabilidade e o seu baixo custo (59). Neste sentido, o emprego da Biotable® RGB permitiu a irradiação de diferentes amostras de biofilme simultaneamente, contribuindo para a melhor padronização e

factibilidade dos experimentos (40). Por outro lado, o equipamento apresentava uma baixa potência nominal (40 mW), com potência útil média de 27 mW (dados obtidos pela mensuração com o Laser Power/ Energy Meter Field Max II), o que determinou a necessidade de exposição dos biofilmes por longos períodos de tempo de luz (23 e 46 min). Obviamente, a irradiação tão prolongada seria inviável no ambiente clínico. Entretanto, vale ressaltar que os parâmetros adotados nestes ensaios poderiam ser reproduzidos de forma muito mais rápida pela elevação da potência do LED. Por exemplo, uma fonte de luz com potência útil de 400 mW, muito comum em consultórios odontológicos, poderia alcançar os mesmos parâmetros de fotirradiação dos grupos L37,5C- e L37,5C+ em aproximadamente 1 min e 30 s. Outro aspecto muito relevante relacionado à fonte de luz em pesquisas fotônicas se refere ao rigor de determinação da potência útil, permitindo o controle da qualidade dos tratamentos executados. Pelos resultados aqui apresentados, é notória a diferença entre os parâmetros descritos pelo fabricante e os observados em situações práticas reais (-32,5%).

A aplicação da aPDT para o tratamento coadjuvante da cárie dentária apresenta algumas limitações. Primeiro, a utilização de corantes como o azul de metileno pode induzir a pigmentação da estrutura dentária (64), causando a descoloração do dente. Quanto mais profunda a cavidade em dentina, maior será a chance de pigmentação devido ao aumento da penetrabilidade dos corantes pelos túbulos dentinários mais calibrosos (65). Entretanto, o uso de materiais restauradores ou bases forradoras opacos, como o cimento de ionômero de vidro, poderia minimizar a ocorrência das descolorações dentárias acidentais. Segundo, a inclusão da aPDT na prática clínica diária determinaria a necessidade de investimento em tecnologias adicionais, como corantes e fontes de luz. Além disso, o tempo de atendimento do paciente poderia ser maior, podendo acarretar problemas, tais como o aumento dos custos dos procedimentos clínicos e a perda do condicionamento do comportamento de crianças. Entretanto, os dois problemas poderiam ser contornados, respectivamente, pelo menor custo do LED e pela execução de procedimentos simplificados de remoção parcial ou não-remoção de tecido cariado (14, 19, 20, 42).

Uma limitação metodológica aos trabalhos de aPDT está sendo amplamente discutida nos dias atuais: a falta de uma adequada substância de referência para o tratamento de biofilmes como controle-positivo (25). Isto ocorre principalmente

porque a ação de agentes antimicrobianos convencionais, como a clorexidina, não podem ser adequadamente removidos após a sua utilização, apresentando efeito de substantividade e redução de microrganismos por um período de tempo mais longo (16). Ao contrário, o efeito fotodinâmico ocorre apenas até poucos segundos após a irradiação, possuindo apenas o efeito antimicrobiano imediato (60). Consideramos, portanto, que a utilização de outros agentes antimicrobianos para comparação com os resultados da aPDT também devem ser vistos com cautela. O uso de agentes bloqueadores de substantividade poderia ser uma alternativa a ser estudada em trabalhos futuros.

Em conclusão, a terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada pelo azul de metileno promoveu a redução da contagem de microrganismos e produção de ácido láctico de biofilmes microcosmos de lesão de cárie em dentina. Um efeito dose-dependente foi observado sobre a contagem de microrganismos totais, com a observação de uma tendência do efeito sobre os demais grupos microbianos. Portanto, ambas as hipóteses nulas H_0 e H_0' devem ser rejeitadas.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Profs. Rodrigo Cardoso Oliveira e Vanderlei Bagnato por suas colaborações em infraestrutura, e a Veridiana Lopes Rizzato por seu apoio durante os ensaios laboratoriais. Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão de auxílio regular à pesquisa (processo nº. 2014/10897-0) e bolsas de estudos de Mestrado (processo nº. 2015/08595-9) e iniciação científica (processo nº. 2014/22238-1).

REFERÊNCIAS

1. D. Cummins, "Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century. The exploration of a breakthrough technology for caries prevention," *J. Clin. Dent.* **24**(Spec Iss A), A1-A14 (2013).

-
2. O. Fejerskov, "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care," *Caries. Res.* **38**(3), 182-191 (2004).
 3. D. Beighton, "The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process," *Community. Dent. Oral. Epidemiol.* **33**(4), 248-255 (2005).
 4. R. H. Selwitz, A. I. Ismail, and N. B. Pitts, "Dental caries," *Lancet.* **369**(9555), 51-59 (2007).
 5. K. C. Lima et al., "Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis," *Caries Res.* **45**(1), 21-30 (2011).
 6. A. F. Paes Leme et al., "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight," *J. Dental. Res.* **85**(10), 878-887 (2006).
 7. E. A. Kidd, and O. Fejerskov, "What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms," *J. Dent. Res.* **83**, C35-38 (2004).
 8. J. Li et al., "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm," *J. Appl. Microbiol.* **97**(6), 1311-1318 (2004).
 9. I. Dige, L. Gronkjaer, and B. Nyvad, "Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries," *Caries Res.* **48**(5), 451-460 (2014).
 10. J. A. Aas et al., "Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults," *J. Clin. Microbiol.* **46**(4), 1407-1417 (2008).
 11. B. G. Neves et al., "Molecular detection of bacteria associated to caries activity in dentinal lesions," *Clin. Oral Investig.* (2016).
 12. N. Takahashi, and B. Nyvad, "Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process," *Caries Res.* **42**(6), 409-418 (2008).

13. E. C. Lula et al., "Partial caries removal in primary teeth: association of clinical parameters with microbiological status," *Caries Res.* **45**(3), 275-280 (2011).
14. D. K. Singhal, S. Acharya, and A. S. Thakur, "Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin using two different techniques in primary teeth: A randomized clinical trial," *Dent. Res. J.* **13**(1), 30-37 (2016).
15. C. R. Katz et al., "The concepts of minimally invasive dentistry and its impact on clinical practice: a survey with a group of Brazilian professionals," *Int. Dental J.* **63**(2), 85-90 (2013).
16. J. E. Frencken et al., "Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study," *Caries Res.* **41**(2), 102-107 (2007).
17. A. Mishra, R. K. Pandey, and N. Manickam, "Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements," *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* **35**(1), 28-33 (2017).
18. S. Mittal et al., "Comparative evaluation of the antibacterial and physical properties of conventional glass ionomer cement containing chlorhexidine and antibiotics," *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **5**(4), 268-275 (2015).
19. P. V. Araujo et al., "Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**(3), 401-407 (2015).
20. I. M. Diniz et al., "Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**(3), 511-518 (2015).
21. A. Guglielmi Cde et al., "Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions," *J. Biomed. Optics.* **16**(8), 088003 (2011).

-
22. M. A. Melo, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy as a strategy for dental caries: building a more conservative therapy in restorative dentistry," *Photomed. Laser. Surg.* **32**(11), 589-591 (2014).
 23. M. A. Melo et al., "A Comparative Study of the Photosensitizer Penetration into Artificial Caries Lesions in Dentin Measured by the Confocal Raman Microscopy," *Photochem. Photobiol.* **90**(1), 183-188 (2014).
 24. F. Schwendicke et al., "Attitudes and behaviour regarding deep dentin caries removal: a survey among German dentists," *Caries Res.* **47**(6), 566-573 (2013).
 25. F. Cieplik et al., "Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions-a systematic review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2017).
 26. A. Taraszkiewicz et al., "Innovative strategies to overcome biofilm resistance," *Biomed Res. Int.* **2013**(150653 (2013).
 27. T. Maisch, "Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?," *Lasers Med. Sci.* **22**(2), 83-91 (2007).
 28. F. Vatansever et al., "Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond," *FEMS Microbiol Rev.* **37**(6), 955-989 (2013).
 29. K. Konopka, and T. Goslinski, "Photodynamic therapy in dentistry," *J. Dent. Res.* **86**(8), 694-707 (2007).
 30. G. Sridharan, and A. A. Shankar, "Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility," *J. Oral Maxillofac. Pathol.* **16**(2), 251-255 (2012).

-
31. H. Nikaido, "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**(4), 593-656 (2003).
 32. C. Steiner-Oliveira et al., "Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin," *J. Biomed. Optics.* **20**(10), 108003 (2015).
 33. P. A. Neves et al., "Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal," *Braz. Oral Res.* **30**(1), (2016).
 34. J. P. Rolim et al., "The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers," *J. Photochem. Photobiol. B.* **106**(40-46 (2012).
 35. M. Schneider et al., "The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model," *Lasers Med. Sci.* **27**(3), 615-620 (2012).
 36. K. M. de Freitas-Pontes et al., "Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin," *J. Prosthet Dent.* **112**(3), 632-637 (2014).
 37. P. Soria-Lozano et al., "In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms," *BMC Microbiol.* **15**(187 (2015).
 38. C. H. Sissons, "Artificial dental plaque biofilm model systems," *Adv. Dent Res.* **11**(1), 110-126 (1997).
 39. A. J. McBain et al., "Development and characterization of a simple perfused oral microcosm," *J. Appl. Microbiol.* **98**(3), 624-634 (2005).
 40. T. C. Silva et al., "Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model," *J. Dent.* **40**(1), 41-47 (2012).

-
41. D. M. Deng et al., "Novel metabolic activity indicator in *Streptococcus mutans* biofilms," *J. Microbiol. Methods* **77**(1), 67-71 (2009).
 42. M. A. Melo et al., "Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**(4), 581-586 (2015).
 43. C. P. Sim, S. G. Dashper, and E. C. Reynolds, "Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents," *J. Dent.* **50**, 1-11 (2016).
 44. T. R. de Kievit, and B. H. Iglewski, "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships," *Infec. Immun.* **68**(9), 4839-4849 (2000).
 45. L. C. Antunes et al., "Quorum sensing in bacterial virulence," *Microbiology*. **156**(Pt 8), 2271-2282 (2010).
 46. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*. **284**(5418), 1318-1322 (1999).
 47. W. Costerton et al., "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections," *J. Clin. Invest.* **112**(10), 1466-1477 (2003).
 48. J. P. Lima et al., "Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an in situ model of dentine caries," *Eur. J. Oral Sci.* **117**(5), 568-574 (2009).
 49. R. A. Exterkate, W. Crielaard, and J. M. Ten Cate, "Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model," *Caries Res.* **44**(4), 372-379 (2010).
 50. N. Takahashi, and B. Nyvad, "The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives," *J. Dent. Res.* **90**(3), 294-303 (2011).

51. M. S. Azevedo et al., "Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges," *Caries Res.* **45**(6), 510-517 (2011).
52. C. Signori et al., "Influence of the Inoculum Source on the Cariogenicity of in vitro Microcosm Biofilms," *Caries Res.* **50**(2), 97-103 (2016).
53. D. M. Deng et al., "Influence of Streptococcus mutans on Enterococcus faecalis biofilm formation," *J. Endod.* **35**(9), 1249-1252 (2009).
54. L. G. Ricatto et al., "Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study," *Eur. J. Dent.* **8**(4), 509-514 (2014).
55. B. M. Costa et al., "Comparative Analysis of Root Dentin Morphology and Structure of Human Versus Bovine Primary Teeth," *Microsc. Microanal.* **21**(3), 689-694 (2015).
56. R. A. Arthur et al., "A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development," *Caries Res.* **47**(4), 318-324 (2013).
57. M. Melo et al., "In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria," *Laser Phys.* **20**(6), 1504-1513 (2010).
58. I. C. Zanin et al., "Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode," *Eur. J. Oral Sci.* **114**(1), 64-69 (2006).
59. A. H. Teixeira et al., "Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms," *Caries Res.* **46**(6), 549-554 (2012).
60. A. Baptista et al., "Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model," *Photochem. Photobiol.* **88**(3), 584-589 (2012).

-
61. E. Zaura-Arite, J. van Marle, and J. M. ten Cate, "Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm," *J. Dent. Res.* **80**(5), 1436-1440 (2001).
 62. G. G. Anderson, and G. A. O'Toole, "Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**(85-105 (2008).
 63. H. T. Whelan et al., "Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing," *J. Clin. Laser. Med. Surg.* **19**(6), 305-314 (2001).
 64. J. S. Giusti et al., "Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source," *Photomed. Laser. Surg.* **26**(4), 281-287 (2008).
 65. C. Montoya et al., "Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin," *Arch. Oral. Biol.* **60**(12), 1811-1820 (2015).

Artigo 2-**Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pela curcumina e LED azul sobre microcosmos de cárie em dentina**

Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez^a, Eliezer Gutierrez^a, Evandro José Dionisio^a, Daniela Rios^a, Rodrigo Cardoso Oliveira^b, Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado^a, Thiago Cruvinel^a

^aDepartamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

^bDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo

Autor Correspondente:

Thiago Cruvinel

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, Vila Universitária, 17012-901, Bauru – SP, Brasil

Fone: +55 14 3235 8318 Telefax: +55 14 3223 4679

Email: thiagocruvinel@fob.usp.br

Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana mediada pela curcumina e LED azul sobre microcosmos de cárie em dentina

RESUMO

O uso da curcumina como agente fotossensibilizante aplicado na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido proposto, porém ainda não existem evidências relacionadas ao resultado deste tratamento sobre biofilmes complexos de lesão de cárie dentária. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da aPDT mediada pela curcumina sobre microcosmos de cárie em dentina, pela análise da contagem de microrganismos e produção de ácido láctico. Os biofilmes microcosmos cresceram sobre discos de dentina bovina em meio McBain com sacarose a 1%, em anaerobiose a 37°C por 5 dias. A aPDT foi realizada pela associação do corante curcumina a 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e um LED a 455 nm a 37,5 ou 75 J.cm^{-2} . A viabilidade de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos foi determinada pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia. A produção de ácido láctico foi analisada pelo método de espectrofotometria enzimática. A análise estatística foi conduzida pelos testes de Kruskal Wallis e post-hoc de Dunn ($P < 0,05$). Apenas a curcumina (L-C+) não foi capaz de interferir na viabilidade de microrganismos, ao contrário do LED a 75 J.cm^{-2} , que diminuiu a contagem de microrganismos totais e lactobacilos. A combinação entre o corante e o LED reduziu significativamente as contagens de todos os grupos de microrganismos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a produção de ácido láctico de nenhum dos grupos estudados. Portanto, a aPDT foi capaz de promover apenas a redução da viabilidade de biofilmes microcosmos de lesão de cárie em dentina, sem interferir sobre o seu perfil de acidogenicidade.

Palavras-Chave: Cárie Dentária, Biofilme, Dentina, Fotoquimioterapia, Curcumina

INTRODUÇÃO

Atualmente, as lesões profundas de cárie em dentina são tratadas pela utilização da remoção parcial do tecido cariado, visando à limitação dos danos causados pelo tratamento restaurador, à preservação dos tecidos passíveis de remineralização e ao maior sucesso clínico dos procedimentos (1, 2). Entretanto, apesar deste conhecimento ser difundido há quase uma década (3), apenas 49% dos dentistas que conhecem a técnica de remoção parcial a praticam, pois não acreditam em seus resultados ou não sentem segurança em executá-la (4).

Com o intuito de oferecer segurança adicional ao clínico, agentes antimicrobianos como a clorexidina foram incorporados ao cimento de ionômero de vidro (5, 6), comumente empregado para a realização da técnica (7). Esta medida foi adotada para diminuir a viabilidade dos microrganismos remanescentes na cavidade em dentina após a remoção do tecido cariado. Porém, a modificação da composição do material poderia comprometer a integridade das restaurações a longo prazo (8), devido às alterações em suas propriedades físico-químico-mecânicas (9).

Outra alternativa sugerida seria a utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) como um tratamento coadjuvante da remoção parcial ou da não-remoção do tecido cariado de lesões em dentina, para a redução imediata e localizada da viabilidade dos microrganismos do interior da lesão (10). A aPDT pode ser entendida sequencialmente pela aplicação prévia de um agente fotossensibilizante (Ps), que é absorvido pelas células microbianas. Em seguida, uma fonte de luz complementar é empregada para a fotoirradiação do local sensibilizado, aumentando a energia molecular do Ps, que passa a um estado tripleto excitado (11). A molécula em estado tripleto apresenta carga, com um elétron mais periférico e instável. Esta molécula pode formar radicais livres (reação fotoquímica tipo I) ou reagir com moléculas de oxigênio endógeno, produzindo espécies reativas, tais como o oxigênio singleto (reação fotoquímica tipo II) (12). Ambas as reações podem ou não ocorrer simultaneamente, provocando a morte e/ou danos às células, afetando a membrana celular, mitocôndrias, lisossomos ou o DNA celular (13-15).

Existem muitos agentes fotossensibilizantes que tem sido utilizados na aPDT, tais como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, riboflavina, corantes sintéticos, corantes fenotiazínicos, compostos naturais, entre outros (12). A curcumina é um corante extraído da raiz da *Curcuma longa*, comumente utilizada

como um tempero de cor amarela viva (16). Possui peso molecular igual a 368,38 g.mol⁻¹, sendo insolúvel em água. Com esta finalidade, o corante já foi dissolvido em soluções contendo n-metil-glucamina (17, 18), etanol (19) e dimetilsulfóxido (DMSO) (20). O corante tem sido usado como agente antitumoral, antioxidante e antiinflamatório (21). Estudos prévios demonstraram que a curcumina poderia ser utilizada como um agente fotossensibilizante na aPDT para reduzir a viabilidade de microrganismos cariogênicos (17-19, 22-24). Apesar de promissores, os resultados foram obtidos em sua maioria sobre células planctônicas de cepas de microrganismos padrão, menos resistentes aos tratamentos antimicrobianos (17-19, 22-24). A organização de múltiplos grupos microbianos em biofilmes predispõe à maior resistência contra agentes antimicrobianos, devido à maior proteção gerada pela matriz extracelular e restos de células mortas (25), bem como ao aumento da patogenicidade (26) virulência (27) e resistência das células-residentes (28, 29)

Estudos *in vivo* demonstraram resultados antimicrobianos mais modestos relacionados à aPDT (30-33). Entretanto, as condições utilizadas não haviam sido nem testadas e nem determinadas com base em modelos *in vitro* mais complexos, tais como biofilmes microcosmos. O biofilme microcosmos reflete uma situação mais próxima da real, pois representa uma comunidade microbiana que foi coletada diretamente de um tecido vivo específico (34). Testar os protocolos antimicrobianos sobre condições *in vitro* mais próximas das condições reais aumenta a possibilidade de obtenção de melhores resultados clínicos posteriores.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da aPDT sobre microcosmos de cárie em dentina, na redução da viabilidade de microrganismos e da produção de ácido láctico. As hipóteses nulas foram que não existe diferença na contagem de microrganismos de biofilmes tratados e não tratados com a aPDT mediada pela combinação de curcumina e LED azul (H0), e que não existe diferença na quantidade de ácido láctico produzida por biofilmes tratados e não tratados com a aPDT mediada pela combinação de curcumina e LED azul (H0').

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (CAAE: 34559314.6.0000.5417) (Anexo A).

Coleta da Dentina Infectada

O termo de consentimento livre esclarecido foi assinado pelos responsáveis por três crianças após a orientação e esclarecimento da pesquisa. Os critérios de inclusão dos voluntários foram crianças na faixa etária de 7 a 11 anos sem síndromes e/ou alterações de saúde sistêmica congênitas ou adquiridas, com presença de lesão de cárie em dentina em primeiros ou segundos molares decíduos, sem exposição pulpar, não devendo estar sob tratamento antibiótico até 90 dias antes do procedimento de coleta (32).

As coletas de dentina foram realizadas na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP. Previamente, a criança foi anestesiada e o dente foi isolado e lavado com jato de água. Posteriormente, com o uso de uma colher de dentina estéril, amostras de dentina infectada foram removidas do interior da cavidade e transferidas para criotubos contendo 2 mL de meio Brain Heart Infusion [BHI, 37 g de infusão cérebro-coração diluídos em água deionizada/L, pH 7,2] com glicerol a 20%, sendo acondicionadas em gelo picado. Os dentes foram restaurados com cimento de ionômero de vidro (Ketac Fil Plus®, 3MESpe, Minnesota, E.U.A.). As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento de sua utilização.

Preparo das Soluções Estoque

As três amostras de biofilme dentinário foram descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, sonicadas vigorosamente a 40 mW, 1 pulso/s por 15 s (Vibra Cell™, Sonics and Materials Inc, Newtown, E.U.A.). Um pool de microrganismos foi preparado pela mistura de 1,5 mL de cada amostra coletada. Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex (Phoenix, AP 56, Araraquara, Brasil). Um volume de 400 µL da mistura foi transferido para um tubo universal contendo 10 mL de meio McBain modificado [mucina a 2,5 g.L⁻¹, peptona a 2,0 g.L⁻¹, peptona de caseína a 2,0 g.L⁻¹, extrato de levedura a 1,0 g.L⁻¹, NaCl a 0,35 g.L⁻¹, KCl a 0,2 g.L⁻¹, CaCl₂ a 0,2 g.L⁻¹, hemina a 0,001 g.L⁻¹, vitamina K1 a 0,0002 g.L⁻¹, agente tamponador PIPES a 50 mmol.L⁻¹, sacarose a 0,4%, diluídos em água deionizada/L, pH 7,0] (35). As suspensões foram incubadas em anaerobiose a 37°C overnight. Para o armazenamento da solução estoque, alíquotas de 600 µL das suspensões microbianas foram transferidas para criotubos e

misturadas a 600 μ L de glicerol a 60%. As soluções foram congeladas em freezer a -80°C até o momento de sua utilização.

Preparo dos Espécimes Dentinários

Os espécimes dentinários foram obtidos de raízes de incisivos bovinos. Restos de tecido gengival e ligamento periodontal foram removidos das raízes com o uso de uma cureta periodontal (Duflex 55G, SS White Artigos Dentários SA, Rio de Janeiro, Brasil). Posteriormente, as raízes foram seccionadas no sentido longitudinal com discos diamantados Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Petrópolis, Brasil), obtendo-se duas metades. Discos de dentina de 5 mm de diâmetro foram confeccionados com o uso de uma broca trefina n° 5 (Alpha Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil). Para a regularização superficial dos espécimes, os discos foram lixados sequencialmente com lixas de granulação 600, 800 e 1.200 (Erios Equipamentos Ltda, São Paulo, Brasil) por 10 s, e polidos na politriz metalográfica APL4 Arotec (Arotec S.A., Cotia, Brasil). Finalmente, os discos foram lavados no ultrassom T7 Thornton (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, Brasil) por 20 min, e posteriormente mantidos em água deionizada estéril até o momento de sua utilização.

Crescimento de Biofilme Microcosmos

A versão modificada do modelo Active Attachment Biofilm Model Amsterdam (ACTA, Amsterdã, Holanda) foi utilizado para esta finalidade (36). O modelo consiste em uma tampa de aço com 24 parafusos de poliestireno adaptados para a fixação horizontal dos espécimes dentários. A tampa se encaixa perfeitamente sobre placas de 24 poços, contendo os meios para o crescimento e tratamento dos biofilmes. Os espécimes foram fixados com silicone de condensação leve (Zetaplus®, Zhermack, Badia Polesine, Itália). Em seguida, os modelos permaneceram em temperatura ambiente por 12 h, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e posteriormente secos em estufa.

No dia anterior ao início do crescimento dos biofilmes, 400 μ L da solução estoque de microrganismos foi adicionado a 10 mL de meio McBain suplementado com sacarose a 1% e incubado em anaerobiose a 37°C overnight. Posteriormente, cada 10 mL da solução reativada foi misturada a 10 mL de meio McBain fresco suplementado com sacarose a 1%. Então, alíquotas de 1,5 mL foram uniformemente

distribuídas nos poços de uma placa de 24 poços e o modelo de biofilme foi adaptado. Os biofilmes cresceram em condições anaeróbicas a 37°C por 5 dias, com a renovação do meio McBain suplementado com sacarose a 1% a cada 24 h.

Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

O corante curcumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A.) foi utilizado como agente fotossensibilizante. A solução de curcumina foi preparada imediatamente antes de sua utilização, pela diluição em solução de água deionizada estéril e DMSO a 0,8% (Merck KGaA, Frankfurter, Germany), obtendo-se a concentração final de 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Alíquotas de 1,5 mL da solução de curcumina ou água deionizada mais DMSO a 0,8% foram transferidas para os poços de uma placa de 24 poços, sendo mantidas sob a proteção da luz até a sua utilização (31). O protótipo Biotable® RGB (Laboratório de Apoio Tecnológico, São Carlos, Brasil) foi utilizado como uma fonte de luz LED (light emitting diode) na etapa de fotoirradiação dos biofilmes. Para os experimentos, até 24 amostras de biofilme poderiam ser irradiadas ao mesmo tempo, utilizando a mesma faixa de comprimento de onda (455 ± 30 nm), mesma distância (≈ 25 mm) e irradiância (40 mW.cm^{-2}). Duas densidades de energia de luz foram utilizadas para os experimentos ($37,5$ e 75 J.cm^{-2}), correspondendo às energias totais de $3,75 \text{ J}$ e $7,5 \text{ J}$ e aos tempos de 15 min e 35 s e 31 min e 10 s de exposição à luz, respectivamente. A irradiância da Biotable® RGB foi mensurada antes de cada sessão de aPDT, utilizando-se o equipamento Laser Power/ Energy Meter Field Max II (Coherent, Portland, E.U.A.). Quando necessário, o tempo de irradiação foi corrigido pela seguinte fórmula:

$$t(s) = \text{Energia total (J)} \times [\text{Potência (W)}]^{-1}$$

Os biofilmes foram tratados pela associação do corante curcumina e LED azul, considerando-se seus respectivos controles negativos, como se segue: controle (L-C-), apenas corante (L-C+), apenas aplicação do LED (L37,5C- e L75C-), e aPDT (L37,5C+ e L75C+).

No momento do tratamento, cada biofilme foi previamente lavado em meio Água Cisteína-Peptona (CPW) [5 g de extrato de levedura, 1 g de peptona, 8,5 g de NaCl e 0,5 g de L-cisteína HCl, diluídos em água deionizada/L, pH 7,3] por duas vezes, para a remoção de células não aderidas. Os biofilmes foram então incubados

por 2 min na solução fotossensibilizante ou em água deionizada com DMSO a 0,8% e protegidos contra a luz. Em seguida, os biofilmes foram ou não irradiados pela luz LED, de acordo com os seus respectivos grupos. Por fim, os biofilmes foram cuidadosamente removidos do modelo de crescimento com uma pinça tipo Müller (Golgran, Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda, São Caetano do Sul, Brasil). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com três repetições.

Análise da Produção de Ácido Lático

Após os tratamentos, cada disco de dentina contendo biofilme foi transferido para um tubo Falcon com 3 mL do meio Água-Peptoná tamponado (BPW) [20 g de água-peptoná tamponada diluída em água deionizada/L, pH 7,2], suplementado com sacarose a 0,2%. Os tubos foram incubados anaerobicamente a 37 °C por 3 horas. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de microcentrifuga e mantidos em banho-maria a 85°C por 5 min, para a paralisação da produção de ácido lático. Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise. As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método de espectrofotometria enzimática (37). O princípio do método é baseado na conversão enzimática de L-lactato em piruvato, com concomitante conversão de NAD em NADH, com aumento do valor de absorbância de acordo com a formação de NADH. As leituras de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro BioTek (BioTek Instruments Inc, Winooski, E.U.A.), no comprimento de onda 340 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentrações de ácido láctico de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva-padrão, com valores entre 0 e 3 mmol.L⁻¹.

Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Os biofilmes aderidos aos discos de dentina foram dispersos por sonicação em gelo a 40 mW, 1 pulso/s, por 1 min (Vibra Cell™, Sonics and Materials Inc, Newtown, E.U.A.). Após a homogeneização em vórtex, as soluções foram diluídas serialmente em meio CPW (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 e 1:100.000). Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram inoculadas horizontalmente em placas de Petri contendo Agar Soja Triptoná Sangue, Agar Mitis Salivarius, Agar Mitis Salivarius com bacitracina a 0,2% e sacarose a 20% e Agar Rogosa com ácido acético glacial

a 0,13%, para o crescimento de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, respectivamente. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48-72 h, com exceção das placas de Agar Rogosa, incubadas em condições anaeróbicas a 37°C por 48-72 h. As UFC foram devidamente contadas e determinadas.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS Statistics 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova Iorque, E.U.A.). As contagens das UFC foram transformadas na base log10 antes da aplicação dos testes estatísticos. A hipótese de distribuição normal dos dados obtidos foi rejeitada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes não-paramétricos para amostras independentes de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn foram utilizados para determinar as diferenças significativas entre os grupos específicos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Contagem de UFC

Os resultados da contagem de UFC são apresentados na Figura 1. Quando as contagens de microrganismos do grupo controle foram comparadas aos grupos tratados apenas com LED azul ou apenas com curcumina, não foram observadas diferenças significativas para estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans, enquanto o tratamento apenas com LED a 75 J.cm⁻² reduziu significativamente a contagem de microrganismos totais e lactobacilos totais.

Após a aplicação da aPDT, evidenciou-se uma redução da viabilidade de todos os tipos de microrganismos estudados. A contagem de microrganismos totais foi 1,89 e 2,00 log10 menor para os grupos L37,5C+ e L75C+, respectivamente. Os mesmos padrões de redução foram observados para as contagens de estreptococos do grupo mutans (1,68 e 1,70 log10) e lactobacilos totais (1,79 e 2,33 log10). Um padrão diferente de resultados foi observado no grupo de estreptococos totais (1,71 e 1,52 log10). As contagens de UFC observadas no grupo L-C- foram estatisticamente menores que as contagens dos grupos L37,5C+ e L75C+, para todos os microrganismos estudados. Entretanto, em nenhum dos grupos estudados o efeito de dose-dependência foi observado.

Figura 1. Viabilidade de microrganismos totais (a), estreptococos totais (b), estreptococos do grupo mutans (c) e lactobacilos totais (d) após o tratamento com diferentes parâmetros de aPDT. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Concentração de Ácido Lático

Os resultados da concentração de ácido lático em meio BPW após o tratamento com aPDT são apresentados na Tabela 1. A produção de ácido lático em todos os grupos tratados com a luz LED azul foi ligeiramente maior que os grupos não tratados pelo LED (L-C- e L-C+), porém sem diferença estatisticamente significativa. Os grupos tratados pela combinação de curcumina e LED azul (L37,5C+ e L75C+) apresentaram um incremento menor que os grupos tratados apenas com a luz LED (L37,5C- e L75C-). A concentração de ácido lático no grupo L-C+ foi um pouco menor que a observada no grupo L-C-, embora também não estatisticamente significativa.

Tabela 1- Concentração de ácido láctico (mmol.L⁻¹) nos diferentes grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas.

Grupos	Média (±DP)	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo	IC (95%)	
					Limite inferior	Limite Superior
L-C ^{-a}	0,75±0,21	0,66	0,54	1,10	0,51	0,98
L37,5 C ^{-a}	0,92±0,10	0,94	0,76	1,06	0,80	1,04
L75 C ^{-a}	0,92±0,17	0,93	0,66	1,11	0,73	1,11
L-C ^{+a}	0,72±0,06	0,70	0,65	0,83	0,64	0,80
L37,5 C ^{+a}	0,88±0,22	0,98	0,47	1,09	0,64	1,13
L75 C ^{+a}	0,86±0,09	0,90	0,71	0,95	0,75	0,97

DISCUSSÃO

A capacidade antimicrobiana da aPDT mediada pela curcumina foi avaliada sobre grupos de microrganismos específicos de microcosmos de cárie em dentina. Quando comparados aos grupos controle, todos os microrganismos avaliados foram reduzidos significativamente pela combinação da curcumina a 600 µmol.L⁻¹ e ambas as densidades de energia de luz LED. A viabilidade dos microrganismos dos grupos L37,5+C+ e L75+C+ foi reduzida em 27,04% e 28,61 % para microrganismos totais, 26,58% e 23,63% para estreptococos totais, 20,58% e 31,12% para estreptococos do grupo mutans e 28,94% e 37,65% para lactobacilos totais, respectivamente. Resultados antimicrobianos promissores haviam sido apresentados sobre células planctônicas de diferentes microrganismos cariogênicos (18, 19, 22, 24). Entretanto, biofilmes são mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos quando comparados com células planctônicas (17, 19, 22, 24). Porém, reduções significativas da viabilidade de até 50% das células de biofilmes mono- e duo-espécies foram demonstradas pela aPDT mediada pela curcumina (19). Para o nosso conhecimento, ainda existem poucos estudos que avaliaram o efeito da aPDT mediada pela curcumina sobre biofilmes mais complexos relacionados à cárie dentária. A redução de estreptococos do grupo mutans (1,7 log10) demonstrada no presente estudo foi maior que aquela demonstrada por um estudo *in situ* prévio (0,88 log10) (38). Nosso estudo também evidenciou uma maior redução da contagem de lactobacilos totais (1,79 e 2,33 log10) em comparação com outros grupos microbianos, o que pode denotar uma maior sensibilidade deste microrganismo à aPDT mediada pela curcumina. Ao contrário, um trabalho *in vitro* demonstrou uma maior redução de células planctônicas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 (99,99%) em relação a *Lactobacillus acidophilus* ATCC-IAL523 (37,61%) (18).

Em relação à análise da influência da aPDT sobre a acidogenicidade dos biofilmes, nenhum dos protocolos foi capaz de reduzir significativamente a produção de ácido láctico. Exterkate et al. (2010) demonstrou não haver relação entre a redução de UFC e a produção de ácido láctico (39). Pelos resultados aqui apresentados, pode-se deduzir que os microrganismos que permaneceram viáveis após os tratamentos foram ainda mais acidogênicos. A maior redução foi alcançada no grupo L-C+, porém sem diferença significativa. Aparentemente, a luz LED azul estimulou de alguma forma a produção de ácido láctico. A redução do perfil metabólico dos biofilmes devido à toxicidade do DMSO seria uma possível explicação para os nossos resultados. Entretanto, um estudo prévio demonstrou que o uso do DMSO não foi capaz de produzir redução significativa da viabilidade de biofilmes de *S. mutans* (40). Além disso, duas medidas foram adotadas para não comprometer a análise de nossos resultados: (i) redução máxima da quantidade de DMSO necessária para a diluição da curcumina, e (ii) uso da solução diluente com água deionizada para o tratamento do grupo controle (L-C-). Portanto, a diminuição da produção de ácido láctico não estaria associada à morte de microrganismos, o que poderia justificar a baixa produção de ácido láctico detectada no grupo L-C-. Não foram encontradas evidências na literatura sobre o efeito do DMSO na produção de ácido por microrganismos cariogênicos.

Os biofilmes microcosmos crescidos neste estudo foram originados de três lesões de cárie com cavidade em dentina. Apesar da origem do inóculo não ser considerada importante para o desenvolvimento do potencial cariogênico de biofilmes *in vitro*, em comparação às condições de suplementação de carboidratos fermentáveis, tal evidência foi desenvolvida com base em microcosmos salivares (41). Acreditamos que o perfil microbiano de biofilmes de cavidade em dentina poderia ser significativamente diferente, especialmente pela seleção prévia de microrganismos cariogênicos ocorrida ainda no ambiente bucal. Esta hipótese deve ser testada em trabalhos futuros. O biofilme microcosmos tem demonstrando complexidade de estrutura e composição microbiana similares aos biofilmes polimicrobianos (39). Além disso, a virulência e a patogenicidade de um biofilme pode ser alterado segundo a quantidade de carboidratos fermentáveis (41, 42), pela seleção de microrganismos acidogênicos e acidúricos (43, 44). Até o momento, nenhum outro trabalho *in vitro* utilizou microcosmos salivares ou de lesão de cárie para a avaliação do efeito antimicrobiano da aPDT. As características de resistência

do biofilme microcosmos são similares aos biofilmes encontrados em condições *in vivo* (30, 31, 33, 45), corroborando com a aplicação frequente de metodologias similares, especialmente para a determinação inicial de potencial antimicrobiano de novas substâncias, sem riscos e desconfortos desnecessários para voluntários de modelos *in situ* e/ou pacientes de estudos *in vivo*, gerados pela transferência prematura de tecnologia em desenvolvimento.

A curcumina é amplamente utilizada na gastronomia, sendo de fácil obtenção (16). Entretanto, ensaios laboratoriais similares ao presente estudo são realizados com produtos certificados e controlados, de alto custo e grau de pureza (20), chegando a 70% no produto utilizado nesta pesquisa. Esta característica poderia interferir na eficácia do tratamento (46). Porém, não existem pesquisas comparando a capacidade antimicrobiana do corante produzido em laboratório com o tempero vendido em mercados e feiras.

Os tempos de pré-irradiação utilizados para a sensibilização celular com curcumina são bastante variáveis, entre 1 e 20 min (20, 22, 38, 47), parecendo não afetar significativamente o efeito antimicrobiano da aPDT. As concentrações relatadas variam ainda mais, entre 0,075 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 13.000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (17-19, 22-24, 48). O aumento da concentração da curcumina parece melhorar o efeito antimicrobiano da aPDT sobre células planctônicas e biofilmes de microrganismos cariogênicos (17, 18). Entretanto, o benefício do aumento parece ser limitado pelo processo de extinção ótica por excesso de corante, que impede a penetração da luz nas membranas celulares (22). A concentração de curcumina utilizada no presente estudo (600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi determinada pela execução de estudos-pilotos (dados não mostrados). O aumento da concentração do corante para valores acima de 600 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ não promoveu um melhor efeito fotodinâmico, o que pode ser justificado pelo processo descrito acima.

A maioria dos trabalhos prévios utilizou o LED azul para a fotoativação da curcumina (17, 20, 22, 24, 38, 49, 50). Embora efeitos dependentes da densidade de energia de luz tenham sido demonstrados para a aPDT mediada pela curcumina sobre células planctônicas (22), Dovigo et al. (2011) consideram que a reação de foto-branqueamento da curcumina seria o principal responsável pela perda da efetividade da aPDT. Após longos períodos de irradiação, deve ocorrer menor liberação de oxigênio singleto, mesmo com a manutenção da estabilidade do pico de absorção e da fluorescência do corante (20), independentemente do diluente

utilizado (51). Esta hipótese poderia explicar a não observância de dose-dependência de nossos resultados, apesar da redução significativa da contagem de UFC em todos os grupos de microrganismos estudados.

A aplicação da aPDT para o tratamento coadjuvante da cárie dentária apresenta algumas limitações. Primeiramente, a maioria das evidências produzidas, incluindo o presente estudo, não possuem um grupo controle-positivo (52). Isso ocorre porque a aPDT é um agente antimicrobiano que apresenta como uma de suas especificidades de ação a atuação de um agente físico (luz), o que não é observado em outros tipos de terapias. O uso da clorexidina com esta finalidade deve ser considerado com cautela, pois o antimicrobiano apresenta efeito de substantividade (5), não observado na aPDT. Outra desvantagem da técnica é a possibilidade de pigmentação da estrutura dentária, o que seria proporcionalmente dependente da concentração do corante (46). Comparado a outros estudos (17-19, 22), a concentração de curcumina utilizada em nossos experimentos é baixa. Além disso, a aplicação da aPDT em clínica pode tornar os procedimentos mais complexos e caros, pela introdução de novos passos na sequência clínica e pela necessidade de domínio de novas tecnologias.

Os resultados do presente estudo demonstram que a terapia fotodinâmica antimicrobiana, mediada pela aplicação da curcumina combinada ao LED azul, diminuiu significativamente a viabilidade de grupos específicos de microrganismos de microcosmos de cárie em dentina, sem a observação do efeito de dose-dependência. A produção de ácido láctico não foi reduzida significativamente por nenhum dos protocolos de tratamento utilizados. Portanto, deve-se rejeitar a hipótese H0 e reter a hipótese H0'.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não possuir qualquer tipo de conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Profs. Rodrigo Cardoso Oliveira e Vanderlei Bagnato por suas colaborações em infraestrutura, e a Veridiana Lopes Rizzato por seu apoio durante os ensaios laboratoriais. Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão de auxílio regular à pesquisa (processo nº. 2014/10897-0) e bolsas de

estudos de Mestrado (processo nº. 2015/08595-9) e iniciação científica (processo nº. 2014/22238-1).

REFERÊNCIAS

1. E. C. Lula et al., "Partial caries removal in primary teeth: association of clinical parameters with microbiological status," *Caries Res.* **45**(3), 275-280 (2011).
2. D. K. Singhal, S. Acharya, and A. S. Thakur, "Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin using two different techniques in primary teeth: A randomized clinical trial," *Dent. Res. J. (Isfahan)*. **13**(1), 30-37 (2016).
3. D. Ricketts, "Deep or partial caries removal: which is best?," *Evid. Based. Dent.* **9**(3), 71-72 (2008).
4. C. R. Katz et al., "The concepts of minimally invasive dentistry and its impact on clinical practice: a survey with a group of Brazilian professionals," *Int. Dent. J.* **63**(2), 85-90 (2013).
5. J. E. Frencken et al., "Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study," *Caries Res.* **41**(2), 102-107 (2007).
6. A. Mishra, R. K. Pandey, and N. Manickam, "Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements," *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* **35**(1), 28-33 (2017).
7. V. Dhar et al., "Evidence-based Update of Pediatric Dental Restorative Procedures: Dental Materials," *J. Clin. Pediatr. Dent.* **39**(4), 303-310 (2015).
8. L. Sbordone, and C. Bortolaia, "Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease," *Clin. Oral Investig.* **7**(4), 181-188 (2003).

-
9. S. Mittal et al., "Comparative evaluation of the antibacterial and physical properties of conventional glass ionomer cement containing chlorhexidine and antibiotics," *J. Int. Soc. Prev. Com. Dent.* **5**(4), 268-275 (2015).
 10. H. Gursoy et al., "Photodynamic therapy in dentistry: a literature review," *Clin. Oral Investig.* **17**(4), 1113-1125 (2013).
 11. K. Konopka, and T. Goslinski, "Photodynamic therapy in dentistry," *J. Dent. Res.* **86**(8), 694-707 (2007).
 12. H. Abrahamse, and M. R. Hamblin, "New photosensitizers for photodynamic therapy," *Biochem. J.* **473**(4), 347-364 (2016).
 13. T. Maisch, "Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?," *Lasers Med. Sci.* **22**(2), 83-91 (2007).
 14. A. Taraszkiewicz et al., "Innovative strategies to overcome biofilm resistance," *Biomed. Res. Int.* **2013**(150653 (2013).
 15. F. Vatansever et al., "Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond," *FEMS Microbiol. Rev.* **37**(6), 955-989 (2013).
 16. J. V. Crivello, and U. Bulut, "Curcumin: A naturally occurring long-wavelength photosensitizer for diaryliodonium salts," *J. Polym. Sci. A. Pol. Chem.* **43**(21), 5217-5231 (2005).
 17. N. C. Araujo et al., "Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine," *Lasers Med. Sci.* **29**(2), 629-635 (2014).
 18. N. C. Araujo et al., "Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens," *Photomed. Laser Surg.* **30**(7), 393-399 (2012).

19. D. Manoil et al., "Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11**(3), 372-379 (2014).
20. L. N. Dovigo et al., "Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*," *Photochem. Photobiol.* **87**(4), 895-903 (2011).
21. A. Duvoix et al., "Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin," *Cancer Lett.* **223**(2), 181-190 (2005).
22. M. A. Paschoal et al., "Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture," *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.* **10**(3), 313-319 (2013).
23. P. Soria-Lozano et al., "In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms," *BMC Microbiol.* **15**(187) (2015).
24. C. C. Tonon et al., "Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*," *J. Contemp. Dent. Pract.* **16**(1), 1-6 (2015).
25. E. Zaura-Arite, J. van Marle, and J. M. ten Cate, "Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm," *J. Dent. Res.* **80**(5), 1436-1440 (2001).
26. T. R. de Kievit, and B. H. Iglewski, "Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships," *Infect. Immun.* **68**(9), 4839-4849 (2000).
27. L. C. Antunes et al., "Quorum sensing in bacterial virulence," *Microbiology.* **156**(Pt 8), 2271-2282 (2010).

-
28. J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*. **284**(5418), 1318-1322 (1999).
 29. W. Costerton et al., "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections," *J. Clin. Invest.* **112**(10), 1466-1477 (2003).
 30. I. M. Diniz et al., "Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**(3), 511-518 (2015).
 31. A. Guglielmi Cde et al., "Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions," *J. Biomed. Optics*. **16**(8), 088003 (2011).
 32. P. A. Neves et al., "Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal," *Braz. Oral. Res.* **30**(1), (2016).
 33. C. Steiner-Oliveira et al., "Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin," *J. Biomed. Optics*. **20**(10), 108003 (2015).
 34. C. H. Sissons, "Artificial dental plaque biofilm model systems," *Adv. Dent. Res.* **11**(1), 110-126 (1997).
 35. A. J. McBain et al., "Development and characterization of a simple perfused oral microcosm," *J. Appl. Microbiol.* **98**(3), 624-634 (2005).
 36. T. C. Silva et al., "Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model," *J. Dent.* **40**(1), 41-47 (2012).
 37. D. M. Deng et al., "Novel metabolic activity indicator in *Streptococcus mutans* biofilms," *J. Microbiol. Methods*. **77**(1), 67-71 (2009).

38. V. Panhoca et al., "Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy against *Streptococcus mutans* Biofilm in situ," *J. Contemp. Dent. Pract.* **17**(3), 184-191 (2015).
39. R. A. Exterkate, W. Crielaard, and J. M. Ten Cate, "Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model," *Caries Res.* **44**(4), 372-379 (2010).
40. M. L. Zoccolillo, S. C. Rogers, and T. S. Mang, "Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials," *Lasers Surg. Med.* **48**(10), 995-1005 (2016).
41. C. Signori et al., "Influence of the Inoculum Source on the Cariogenicity of in vitro Microcosm Biofilms," *Caries Res.* **50**(2), 97-103 (2016).
42. M. S. Azevedo et al., "Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges," *Caries Res.* **45**(6), 510-517 (2011).
43. A. F. Paes Leme et al., "The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight," *J. Dent. Res.* **85**(10), 878-887 (2006).
44. D. Beighton, "The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process," *Community. Dent. Oral Epidemiol.* **33**(4), 248-255 (2005).
45. P. V. Araujo et al., "Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **12**(3), 401-407 (2015).
46. H. A. Ricci Donato et al., "Clinical Comparison of Two Photosensitizers for Oral Cavity Decontamination," *Photomed. Laser Surg.* **35**(2), 105-110 (2017).

-
47. E. M. Bruzell, E. Morisbak, and H. H. Tønnesen, "Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations," *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**(7), 523-530 (2005).
 48. M. A. Paschoal et al., "Streptococcus mutans photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers," *Photomed. Laser Surg.* **32**(3), 175-180 (2014).
 49. N. C. Araujo et al., "Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin," *Photomed. Laser Surg.* **30**(2), 96-101 (2012).
 50. M. A. Paschoal et al., "Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study," *Lasers Med. Sci.* **30**(8), 2059-2065 (2015).
 51. C. F. Chignell et al., "Spectral and photochemical properties of curcumin," *Photochem. Photobiol.* **59**(3), 295-302 (1994).
 52. F. Cieplik et al., "Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions-a systematic review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2017).

3 Discussão

3. DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* avaliou a capacidade de diferentes protocolos de aPDT, mediada pelo azul de metileno e curcumina, em reduzir a viabilidade de grupos de microrganismos específicos e a produção de ácido láctico de microcosmos de cárie em dentina. Os presentes resultados sugerem uma similaridade de efeitos entre os dois corantes, com reduções de contagem de UFC mais representativas relacionadas à curcumina e efeito de dose-dependência relacionado ao azul de metileno. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em modelos *in vivo* sob mediação de corantes fenotiazínicos (GUGLIELMI CDE et al., 2011; MELO et al., 2015; STEINER-OLIVEIRA et al., 2015). A efetividade da aPDT no controle da viabilidade de microrganismos de biofilmes complexos foi menor que aquelas observadas em estudos *in vitro* com células planctônicas (SORIA-LOZANO et al., 2015) e biofilmes mono- e duo-espécies (ROLIM et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2012; DE FREITAS-PONTES et al., 2014; DINIZ et al., 2015). Estes achados podem ser explicados pela maior complexidade dos biofilmes microcosmos, caracterizados por um consórcio de múltiplos grupos microbianos coletados de tecidos vivos específicos (LIMA et al., 2011; DIGE; GRONKJAER; NYVAD, 2014; SIM; DASHPER; REYNOLDS, 2016). Esta hipótese pode ser justificada pela utilização dos mecanismos de *quorum sensing*, nos quais ocorre a comunicação célula-célula pela produção, detecção e resposta a pequenas moléculas sinais difusíveis, que influenciam diretamente no aumento da patogenicidade (DE KIEVIT; IGLEWSKI, 2000), virulência (ANTUNES et al., 2010) e resistência das células-residentes de comunidades microbianas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; COSTERTON et al., 2003).

No caso do azul de metileno, é interessante observar uma tendência de efeito dose-dependente em todos os grupos de microrganismos estudados, com a confirmação significativa para o grupo de microrganismos totais. Este resultado subsidia o conceito de maior benefício fotodinâmico pelo aumento da dose total de luz. Para a elucidação dos resultados alcançados, a ação da aPDT sobre outros grupos de microrganismos específicos ou mesmo sobre espécies determinadas deve ser o foco de análises futuras, com a utilização de metodologias biomoleculares.

As concentrações de ácido láctico revelam a capacidade metabólica acidogênica dos microrganismos (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010), estando diretamente relacionada à quantidade de açúcar que os microrganismos podem fermentar. Por este motivo, os biofilmes foram re-incubados logo após os tratamentos em um meio pobre em nutrientes (BPW), com a suplementação de sacarose a 0,2% (BEIGHTON, 2005; EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010). Os resultados de azul de metileno, combinados com a luz LED vermelha, demonstraram uma diminuição significativa da produção de ácido láctico em todos os grupos com aplicação da luz, porém sem demonstração do efeito de dose-dependência. No caso da curcumina associada ao luz LED azul, nenhum dos protocolos foi capaz de reduzir significativamente a produção de ácido láctico. Exterkate et al. (2010) demonstrou não haver relação entre a redução de UFC e a produção de ácido láctico (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010). A redução do perfil metabólico dos biofilmes devido à toxicidade do DMSO seria uma possível explicação para os nossos resultados. A produção de ácido láctico pelos microcosmos do grupo controle dos experimentos com azul de metileno foi sensivelmente maior que aquela observada nos experimentos com curcumina. No primeiro caso, os biofilmes foram tratados apenas com água deionizada, enquanto no segundo caso, os biofilmes foram tratados com solução de DMSO a 0,8%. No entanto, um estudo prévio demonstrou que o uso do DMSO não foi capaz de produzir redução significativa da viabilidade de biofilmes de *S. mutans* (ZOCCOLILLO; ROGERS; MANG, 2016). Além disso, duas medidas foram adotadas para não comprometer a análise de nossos resultados: (i) redução máxima da quantidade de DMSO necessária para a diluição da curcumina, e (ii) uso da solução diluente com água deionizada para o tratamento do grupo controle (L-C-). Portanto, a diminuição da produção de ácido láctico não estaria associada à morte de microrganismos, o que também justificaria a baixa produção de ácido láctico detectada no grupo L-C-. Não foram encontradas evidências na literatura sobre o efeito do DMSO na produção de ácido por microrganismos cariogênicos.

Os biofilmes microcosmos crescidos neste estudo foram originados de três lesões de cárie com cavidade em dentina. Apesar da origem do inóculo não ser considerada importante para o desenvolvimento do potencial cariogênico de biofilmes *in vitro*, em comparação às condições de suplementação de carboidratos fermentáveis, tal evidência foi desenvolvida com base em microcosmos salivares

(SIGNORI et al., 2016). Acreditamos que o perfil microbiano de biofilmes de cavidade em dentina poderia ser significativamente diferente, especialmente pela seleção prévia de microrganismos cariogênicos ocorrida ainda no ambiente bucal. Esta hipótese deve ser testada em trabalhos futuros. O biofilme microcosmos tem demonstrando complexidade de estrutura e composição microbiana similares aos biofilmes polimicrobianos (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010). Além disso, a virulência e a patogenicidade de um biofilme pode ser alterado segundo a quantidade de carboidratos fermentáveis (AZEVEDO et al., 2011; SIGNORI et al., 2016), pela seleção de microrganismos acidogênicos e acidúricos (BEIGHTON, 2005; PAES LEME et al., 2006). Até o momento, nenhum outro trabalho *in vitro* utilizou microcosmos salivares ou de lesão de cárie para a avaliação do efeito antimicrobiano da aPDT. As características de resistência do biofilme microcosmos são similares aos biofilmes encontrados em condições *in vivo* (GUGLIELMI CDE et al., 2011; ARAUJO et al., 2015; DINIZ et al., 2015; STEINER-OLIVEIRA et al., 2015), corroborando com a aplicação frequente de metodologias similares, especialmente para a determinação inicial de potencial antimicrobiano de novas substâncias, sem riscos e desconfortos desnecessários para voluntários de modelos *in situ* e/ou pacientes de estudos *in vivo*, gerados pela transferência prematura de tecnologia em desenvolvimento.

A aplicação da aPDT para o tratamento coadjuvante da cárie dentária apresenta algumas limitações. Primeiramente, a maioria das evidências produzidas, incluindo o presente estudo, não possuem um grupo controle-positivo (CIEPLIK et al., 2017). Isso ocorre porque a aPDT é um agente antimicrobiano que apresenta como uma de suas especificidades de ação a atuação de um agente físico (luz), o que não é observado em outros tipos de substâncias. O uso da clorexidina com esta finalidade deve ser considerado com cautela, pois o antimicrobiano apresenta efeito de substantividade (FRENCKEN et al., 2007), não observado na aPDT. Outra desvantagem da técnica é a possibilidade de pigmentação da estrutura dentária, o que seria proporcionalmente dependente da concentração do corante (RICCI DONATO et al., 2017).

4 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados demonstrados neste estudo, pode-se concluir que:

- A aPDT mediada pelo azul de metileno foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de todos os grupos de microrganismos estudados, provenientes de microcosmos de cárie em dentina;
- A associação do azul de metileno e LED vermelho diminuiu significativamente a acidogenicidade dos microcosmos de cárie em dentina;
- A aPDT mediada pela curcumina foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade de todos os grupos microbianos estudados, em comparação com o grupo controle de microcosmos de cárie em dentina;
- A combinação de curcumina e LED azul não interferiu na concentração de ácido láctico produzida por biofilmes microcosmos de cárie em dentina.

Referências

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 Apr;46(4):1407-17.

Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical J.* 2016 Feb 15;473(4):347-64.

Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology.* 2010 Aug;156(Pt 8):2271-82.

Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg.* 2012 Jul;30(7):393-9.

Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014 Mar;29(2):629-35.

Araujo PV, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, Massara Mde L, Cortes ME, Poletto LT. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Sep;12(3):401-7.

Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res.* 2011;45(6):510-7.

Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005 Aug;33(4):248-55.

Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions-a systematic review. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 2017.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1466-77.

Crivello JV, Bulut U. Curcumin: A naturally occurring long-wavelength photosensitizer for diaryliodonium salts. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2005;43(21):5217-31.

Cummins D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century. The exploration of a breakthrough technology for caries prevention. *J Clin Dent*. 2013;24(Spec Iss A):A1-A14.

Freitas-Pontes KM, Gomes CE, de Carvalho BM, Saboia Rde S, Garcia BA. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. *J Prosthet Dent*. 2014 Sep;112(3):632-7.

Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):4839-49.

Dige I, Gronkjaer L, Nyvad B. Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. *Caries Res*. 2014;48(5):451-60.

Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Sep;12(3):511-8.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011 Jul-Aug;87(4):895-903.

Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 2005 Jun 08;223(2):181-90.

Exterkate RA, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res.* 2010;44(4):372-9.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):182-91.

Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, et al. Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res.* 2007;41(2):102-7.

Guglielmi Cde A, Simionato MR, Ramalho KM, Imparato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Optics.* 2011 Aug;16(8):088003.

Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig.* 2013 May;17(4):1113-25.

Katz CR, de Andrade Mdo R, Lira SS, Ramos Vieira EL, Heimer MV. The concepts of minimally invasive dentistry and its impact on clinical practice: a survey with a group of Brazilian professionals. *Int Dent J.* 2013 Apr;63(2):85-90.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83:C35-8.

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

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.

Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IV, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.* 2011;45(1):21-30.

Lula EC, Almeida LJ, Jr., Alves CM, Monteiro-Neto V, Ribeiro CC. Partial caries removal in primary teeth: association of clinical parameters with microbiological status. *Caries Res.* 2011;45(3):275-80.

Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Science.* 2007 Jun;22(2):83-91.

Manoil D, Filieri A, Gameiro C, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, et al. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Sep;11(3):372-9.

Melo MA, Rolim JP, Passos VF, Lima RA, Zanin IC, Codes BM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Dec;12(4):581-6.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003 Dec;67(4):593-656.

Paes Leme AF, 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.

Paschoal MA, Tonon CC, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Sep;10(3):313-9.

Ricci Donato HA, Pratavieira S, Grecco C, Brugnera-Junior A, Bagnato VS, Kurachi C. Clinical Comparison of Two Photosensitizers for Oral Cavity Decontamination. *Photomed Laser Surg.* 2017 Feb;35(2):105-10.

Ricketts D. Deep or partial caries removal: which is best? *Evid Based Dent.* 2008;9(3):71-2.

Rolim JP, de-Melo MA, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NA, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B.* 2012 Jan;106(40-6.

Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci.* 2012 May;27(3):615-20.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *The Lancet.* 2007 369(9555):51-9.

Signori C, van de Sande FH, Maske TT, de Oliveira EF, Cenci MS. Influence of the Inoculum Source on the Cariogenicity of in vitro Microcosm Biofilms. *Caries Res.* 2016;50(2):97-103.

Sim CP, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent.* 2016 Jul;50:1-11.

Singhal DK, Acharya S, Thakur AS. Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin using two different techniques in primary teeth: A randomized clinical trial. *Dent Res J.* 2016 Jan-Feb;13(1):30-7.

Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Perez-Artiaga L, Lampaya-Perez V, Aporta J, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. *BMC Microbiology.* 2015 Sep 26;15(187.

Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012 May;16(2):251-5.

Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha AC, Ramalho KM, Mayer MP, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015 Oct;20(10):108003.

Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed Res Int.* 2013;150653.

Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidorio D, Bagnato VS, Giusti J, et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(1):1-6.

Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiology Rev.* 2013 Nov;37(6):955-89.

Zoccolillo ML, Rogers SC, Mang TS. Antimicrobial photodynamic therapy of *S. mutans* biofilms attached to relevant dental materials. *Lasers Surg Med.* 2016 Dec;48(10):995-1005.

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética (FOB-USP)

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre Microcosmos de Lesões de Cárie em Dentina

Pesquisador: Thiago Cruvinel da Silva

Versão: 3

CAAE: 34559314.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 077703/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Efeito da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre Microcosmos de Lesões de Cárie em Dentina que tem como pesquisador responsável Thiago Cruvinel da Silva, foi recebido para análise ética no CEP USP - Faculdade de Odontologia de Bauru da USP em 11/08/2015 às 13:31.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br