

UNIVERSIDADE DE UBERABA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ALINE APARECIDA DE OLIVEIRA

INATIVAÇÃO DE *Streptococcus mutans* POR TERAPIA FOTODINÂMICA COM  
EOSINA Y E LED

UBERABA -MG

2024



ALINE APARECIDA DE OLIVEIRA

INATIVAÇÃO DE *Streptococcus mutans* POR TERAPIA FOTODINÂMICA COM  
EOSINA Y E LED

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Biopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior

UBERABA (MG)

2024

## Ficha Catalográfica

Catologação elaborada pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- O4i Oliveira, Aline Aparecida de.  
Inativação de *Streptococcus mutans* por terapia fotodinâmica com Eosina Y e LED = Inactivation of *Streptococcus mutans* by photodynamic therapy with Eosin Y and LED / Aline Aparecida de Oliveira. – Uberaba, 2024.  
37 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Biopatologia.  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior.
1. Odontologia. 2. Terapia fotodinâmica. 3. *Streptococcus mutans*. I. Thedei Junior, Geraldo. II. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Biopatologia. III. Título. VI. Título: Inactivation of *Streptococcus mutans* by photodynamic therapy with Eosin Y and LED.

CDD 617.6

ALINE APARECIDA DE OLIVEIRA

INATIVAÇÃO DE STREPTOCOCCUS MUTANS POR TERAPIA FOTODINÂMICA  
COM EOSINA Y E LED

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Odontologia do Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia - Mestrado da  
Universidade de Uberaba.

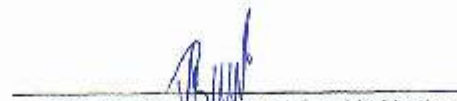
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 25/07/2024


BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Geraldo Thedel Júnior  
Orientador  
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Vinícius Rangel Geraldo Martins  
Universidade de Uberaba

 Documento assinado eletronicamente  
por LUIS CARLOS SCALON CUNHA  
em 25/07/2024 às 16:11:04:00  
verifique em <https://brasil.gov.br>

Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha  
Instituto Federal do Triângulo Mineiro



## Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, saúde, e oportunidades colocadas em meu caminho.

Ao Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior, que, com toda sua competência, determinação e incentivo, ajudou-me a conquistar esta vitória, com dedicação, compromisso e profissionalismo, e fico grata por ter acreditado em mim desde quando trabalhamos juntos no laboratório. Uma pessoa que tenho enorme admiração, e que acredito que Deus tenha colocado na minha vida com um propósito, estimular meu crescimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata por todo o apoio.

À minha mãe Teresinha, meu esposo Mauro e meus filhos Miguel e Gabriel, meus maiores incentivadores. Vocês são meu espelho, verdadeiros exemplos de vida! Agradeço, imensamente, por todo o apoio, onde em qualquer passo que eu dei, vocês nunca duvidaram de mim! Em especial ao meu pai Ostomar (in memoriam), que sei que olha e zela por mim de onde estiver, meu herói.

Aos professores da UNIUBE que são profissionais exemplares.

À FAPEMIG (Fundação de amparo à pesquisa de Minas Gerais) pela concessão da bolsa - processo nº 5.12/2021 e a CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - 001





## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>Introdução</b>                                  | 5  |
| <b>Capítulo 1</b>                                  | 10 |
| Summary  | 13 |
| Introduction                                       | 13 |
| Material and Methods                               | 14 |
| <i>Streptococcus mutans</i> strains                | 14 |
| Maintenance of <i>Streptococcus mutans</i> Strains | 15 |
| Biofilm Formation                                  | 15 |
| Eosin Y treatment                                  | 15 |
| LED treatment                                      | 15 |
| PDT with Eosin Y and LED                           | 16 |
| Biofilm quantification                             | 16 |
| Statistical analysis                               | 16 |
| Results  | 16 |
| Discussion   | 19 |
| Resumo   | 21 |
| References   | 22 |
| Tables and Graphics                                | 25 |
| <b>Referências</b>                                 | 29 |
| <b>Anexos</b>                                      | 34 |



## INTRODUÇÃO GERAL

A Cárie dentária é uma doença crônica não transmissível (DCNT) que está associada a mudanças na composição dos biofilmes dentários, onde prevalece uma microbiota tolerante e produtora de ácidos (PITTS *et al.*, 2021).

A lesão do tecido dentário é um problema crônico de saúde pública que pode afetar a qualidade de vida e resultar em despesas para os indivíduos. Por isso, é crucial a busca por tratamentos que combatam eficazmente esse problema. Além da escovação e uso de fio dental, substâncias como clorexidina e flúor são utilizadas na prevenção da deterioração dentária. No entanto, essas abordagens podem apresentar efeitos adversos como mancha nos dentes e neurotoxicidade. (GRANDJEAN, 2019; LIN *et al.*, 2021; DEUS, OUANOUNOU, 2022).

Os dentes possuem uma camada protetora feita de proteínas, chamada película de esmalte adquirida, que se origina de substâncias presentes na saliva e de enzimas bacterianas. Dentro da microbiota oral, algumas bactérias (como estreptococos e *Actinomyces* spp.) são capazes de se aderir às superfícies dos dentes cobertas pela película por meio de interações específicas entre receptores de adesina, que são reforçadas por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas. Isso conduz à formação de biofilme e à colonização microbiana nos dentes (NOBBS *et al.*, 2009).

Diversos fatores influenciam a formação da microbiota presente em diferentes regiões da cavidade oral, especialmente quando ocorre a erupção dos dentes, criando novas áreas que se tornam disponíveis para a colonização de microrganismos comensais e patógenos oportunistas. Esses fatores incluem, entre outros, a idade, o tipo de alimentação, a higiene bucal, as condições de saúde em geral e imunológicas, além do uso de determinados medicamentos que podem provocar hipossalivação. A importância crucial da alimentação na colonização microbiana é evidenciada em pacientes ou animais utilizados em pesquisas experimentais (MASLOWSKI, MACKAY, 2010; DAVID *et al.*, 2013).

Diversas espécies de bactérias interagem de maneira física e metabólica para formar a estrutura inicial da comunidade do biofilme. Algumas interações microbianas são positivas, pois combatem os agentes causadores da cárie, enquanto outras podem colaborar com bactérias que contribuem para o avanço da doença. O equilíbrio dinâmico entre bactérias benéficas e oportunistas pode ser desestabilizado pelo consumo frequente de carboidratos de alto índice glicêmico e pela falta de higiene bucal adequada, o que favorece o surgimento de biofilmes cariogênicos próximos à superfície dos dentes (BOWEN *et al.*, 2018).

Quando os indivíduos recebem uma quantidade excessiva de açúcares na alimentação, as características e a constituição dos biofilmes presentes nos dentes sofrem alterações significativas, fazendo com que as populações de microrganismos residentes se tornem especialmente adaptadas para metabolizar carboidratos e gerar ácidos, resultando no desenvolvimento de cáries dentárias (PITTS *et al.*, 2017).

Um dos microrganismos de grande importância na formação da cárie é o *Streptococcus mutans*, pela sua capacidade de produção de ácidos e por orquestrar mudanças no microbioma do biofilme via EPS (exopolissacarídeo) (LEMOS *et al.*, 2018).

A ação principal do *S. mutans* como agente causador de doenças pode estar relacionada à sua habilidade única de modificar o ambiente físico-químico local, aproveitando o carboidrato da dieta para criar uma estrutura polimérica resistente, garantindo estabilidade mecânica e protegendo as condições ácidas que favorecem bactérias patogênicas a se desenvolverem e se tornarem dominantes, dificultando seu tratamento (BOWEN *et al.*, 2018).

Uma das principais capacidades que permite *S. mutans* ser um patógeno oportunista tão eficaz na microbiota oral está em sua excepcional habilidade de utilizar uma ampla gama de carboidratos para produzir EPS e ácidos, e viver um estilo de vida de biofilme, incluindo resistência ao estresse e mecanismos de competição bacteriana. Um carboidrato específico, a sacarose, conhecido como açúcar comum de mesa e um adoçante tradicional na culinária, é mais propenso à cárie, pois suas hexoses (glicose e frutose) fornecem os blocos de EPS e são fermentadas de maneira eficaz para produzir ácidos. A sacarose é fundamental para o sucesso do organismo como patógeno devido à habilidade única de *S. mutans* em converter sacarose em glucanos extracelulares insolúveis que melhoram a adesão e coesão bacteriana, formando o núcleo da matriz EPS. Os glucanos são formados por fragmentos de glicose unidos principalmente por ligações glicosídicas  $\alpha$ 1,3 e  $\alpha$ 1,6 resultantes da atuação coordenada de enzimas bacterianas conhecidas como glicosiltransferases (GTF) (BOWEN, KOO, 2011).

Uma alimentação rica em carboidratos utilizáveis pelas bactérias orais para formação de glucanos, contribui para a formação da matriz EPS e favorece a proliferação de microbiota ácido-tolerante e acidogênica (HAJISHENGALLIS *et al.*, 2016).

Os microrganismos não patogênicos têm uma vantagem importante sobre os que causam cárie quando a dieta do hospedeiro não contém muitos carboidratos desse tipo, especialmente sacarose. Bactérias comensais associadas com a saúde oral conseguem se fixar com mais força na superfície dos dentes revestidas de saliva, conseguem se desenvolver melhor do que *S. mutans* e outras espécies acidogênicas e têm diversos mecanismos para atrapalhar sua instalação e crescimento. Entretanto, o cenário microbiano pode mudar drasticamente se houver um consumo frequente de carboidratos que promovem a produção da matriz EPS e a formação de ambientes ácidos, onde *S. mutans* pode trabalhar em conjunto com outras espécies e causar transformações que afetam, a estrutura e o metabolismo do biofilme, levando ao surgimento de cáries (BOWEN *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos em superfícies favorecem a proliferação de microrganismos bucais, além de promover novas associações entre diferentes espécies e aumentar a adesão entre as células (HOBLEY *et al.*, 2015; KARYGIANNI *et al.*, 2020).

A diversidade na composição e estrutura do EPS variando de acordo com as diferentes espécies de microrganismos e sua atividade metabólica, a presença de nutrientes, o ambiente do hospedeiro e o estágio de crescimento - apresenta desafios significativos para o desenvolvimento de tratamentos direcionados ao EPS. Estratégias terapêuticas inovadoras devem visar tanto os componentes da matriz do biofilme quanto os microrganismos incorporados para eliminar o nicho patogênico, com o mínimo de dano aos tecidos (KARYGIANNI *et al.*, 2020).

Os biofilmes representam um desafio significativo em termos médicos e econômicos. Essas estruturas formadas por micróbios resistentes a antibióticos estão relacionadas a várias condições de saúde. Por isso, é essencial desenvolver novas abordagens terapêuticas para lidar com a crescente resistência aos antibióticos (WARRIER *et al.*, 2021).

A Terapia fotodinâmica (TFD) se destaca como uma técnica de grande eficácia no combate a diferentes enfermidades, devido as suas vantagens como segurança, alta seletividade e alta eficiência (CIEPLIK *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2021). E é um tratamento antimicrobiano não invasivo que está se tornando cada vez mais popular na área da saúde. Sua importância é evidente em um momento em que a odontologia busca ser menos invasiva e focada na prevenção. Na odontologia, a TFD tem se mostrado eficaz no combate a bactérias, vírus e

fungos, sem os problemas de resistência que ocorrem com medicamentos convencionais. Embora não substitua os métodos tradicionais, a TFD pode ser uma alternativa valiosa, especialmente no tratamento de infecções orais (STÁJER *et al.*, 2020).

A terapia fotodinâmica emprega fundamentalmente substâncias fotossensibilizadoras (PS), uma fonte de luz de comprimento de onda específico e oxigênio. Cada um desses elementos é essencialmente inofensivo para o organismo humano, mas a associação dos 3 na combinação correta é capaz de controlar de maneira precisa a eliminação de microrganismos. Essa associação envolve um corante específico, naturalmente sem efeitos tóxicos, uma fonte de luz com um comprimento de onda específico capaz de ativar o corante e produzir os radicais tóxicos que levarão à morte celular (SUN *et al.*, 2020).

Esses radicais tóxicos são denominados genericamente “espécies reativas de oxigênio” (ROS na sigla em inglês) que surgem dos fotossensibilizadores após a exposição à luz. Esse mecanismo atua promovendo a morte das células microbianas de diversas maneiras, tais como prejudicando as organelas e inibindo a reprodução celular, interrompendo a transmissão de sinais e bloqueando o ciclo de vida celular (YU, 2022).

Existem três principais tipos de morte celular induzida por Espécies Reativas de Oxigênio na Terapia Fotodinâmica, que incluem necrose, apoptose e autofagia (MROZ *et al.*, 2011). Apoptose é a morte celular programada, que é controlada por uma série de processos que resultam na ativação permanente de caspases e na fragmentação das células. A necrose está ligada à redução expressiva nos níveis de ATP causada pelo desequilíbrio iônico decorrente da despolarização da membrana mitocondrial, e a autofagia é um fenômeno dentro das células no qual são formadas estruturas chamadas autofagossomos, responsáveis por digerir organelas e proteínas presentes no interior celular (DąBROWSKI, 2017).

A reação das células à lesão é influenciada por diversos elementos, como o agente fotossensibilizador utilizado, a quantidade de luz administrada e a condição metabólica da célula. Há dois mecanismos principais envolvidos na reação fotodinâmica, os quais são diretamente influenciados pelas moléculas de oxigênio presentes nas células (CASTANO *et al.*, 2005; ROBERTSON *et al.*, 2009). O fotossensibilizador desempenha um papel vital em todas as etapas da terapia fotodinâmica (YU *et al.*, 2022). Quando um fóton é absorvido pelo fotossensibilizador, este é levado a um estado de energia mais excitado ( $S_n$ ), e através do processo conhecido como conversão interna retorna para o seu estado fundamental ( $S^0$ ) ou para o estado excitado mais baixo ( $S^1$ ) para os próximos processos fotofísicos (KASHA, 1963). Uma parte da energia é liberada como fluorescência, enquanto o restante da energia conduz a molécula fotossensibilizadora para o estado excitado tripleto  $T^1$  (forma terapêutica apropriada),

através do processo de cruzamento inter sistema (CASTANO *et al.*, 2005; ROBERTSON; *et al.*, 2009).

A partir desse início similar, no mecanismo tipo I, no estado excitado  $T^1$ , o fotossensibilizador é capaz de transferir energia para as biomoléculas ao seu redor. Entre o fotossensibilizador nesse estado e o tecido, ocorre a transferência de um hidrogênio ou elétron, levando à formação de radicais livres e radicais ânions tanto do fotossensibilizador quanto do tecido. Os elétrons interagem com as moléculas de oxigênio, que se mantêm em seu estado energético fundamental. Esse processo resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) - inicialmente na forma de radical ânion superóxido ( $O^{\bullet-} 2$ ), gerando mais ROS dentro das células. A sequência de reações desencadeada acaba por provocar estresse oxidativo, culminando na destruição celular (NOWAK-STĘPNIOWSKA *et al.*, 2011).

No mecanismo tipo II, após a mudança do fotossensibilizador para o estado tripleto excitado, a energia é transferida de forma direta para a molécula de oxigênio em seu estado energético fundamental (o estado tripleto fundamental). Essa transferência direta de energia entre as moléculas ( $FS \rightarrow O_2$ ) é viável devido à coincidência de spins. Dessa maneira, as moléculas de oxigênio excitadas - conhecidas como oxigênio singleto - são produzidas, as quais se destacam por suas propriedades altamente oxidantes (JUZENIENE, GEME, 2007; NOWAK-STĘPNIOWSKA *et al.*, 2011).

Normalmente, as células reagem de maneiras diferentes ao dano causado por diversos motivos, incluindo o tipo de fotossensibilizador utilizado, a quantidade de luz recebida e o funcionamento metabólico celular. O tipo de fotossensibilizador escolhido é fundamental em todas as etapas do tratamento de terapia fotodinâmica e estudos da Terapia fotodinâmica sugere que a Eosina Y funciona como um fotossensibilizador e catalisador redox (LI *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2018).

Em consequência da produção de ROS, o processo induzido pela TFD leva à morte celular, e considerando que a cárie é uma doença de difusão global, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da terapia fotodinâmica aplicada “*in vitro*” sobre o metabolismo de biofilmes de *Streptococcus mutans* utilizando-se como fonte de luz um fotopolimerizador de resina composta do tipo LED e o corante eosina Y como agente fotossensível. Hipótese nula: a TFD não seja eficaz no tratamento em biofilmes com *S. mutans*.





Inactivation of *Streptococcus mutans* by photodynamic therapy with Eosin Y and LED

*Short Title: S. mutans inactivation by Eosin-mediated PDT*

Geraldo THEDEI Jr1

Aline Aparecida de OLIVEIRA2

<sup>1</sup>*University, University of Uberaba, Uberaba, MG, Brazil*

<sup>2</sup>*UNIUBE, Student of the Master's Program in Dentistry*

Correspondence: Geraldo Thedei Júnior, University of Uberaba, UNIUBE, Avenida Nenê Sabino, 1801, 38055-500, Uberaba, MG, Brazil. Tel: +55-343319-8816. email: [geraldo.thedei@uniube.br](mailto:geraldo.thedei@uniube.br)

Inactivation of *Streptococcus mutans* by photodynamic therapy with Eosin Y and LED

*Short Title: S. mutans inactivation by Eosin-mediated PDT*

## SUMMARY

*Streptococcus mutans* is a biofilm-forming, acidogenic and aciduric microorganism, considered one of the main causes of tooth decay. Biofilms represent a significant medical and economic challenge, especially with the growth of antibiotic-resistant microbes and it is essential to develop new therapeutic approaches to deal with this situation. Photodynamic Therapy (PDT) has become a widely used type of treatment due to its advantages such as safety, high selectivity and high efficiency, where a light source is used that activates a photosensitive agent generating toxic compounds such as Reactive Oxygen Species, causing cell death. The objective of the present study was to verify the effectiveness of PDT with Eosin Y and LED photopolymerizer light for inactivating *S. mutans*. The toxicity of Eosin Y ( $7 \times 10^{-3} \text{M}$  to  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ ) was tested in the absence of light and at fluences of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$ ,  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  and  $20 \text{J}/\text{cm}^2$ , in biofilms lasting 4 and 10 hours. There was toxicity in the dark by eosin and at concentrations  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  to  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  for the 4-hour biofilm ( $p < 0.0001$ ) and at concentrations  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  and  $7 \times 10^{-4} \text{M}$  for the 10-hour biofilm ( $p < 0.0001$ ). Concentrations  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  in the dark were not toxic in biofilms of 4 and 10 hours. The LED did not present toxicity in any of the fluences tested. The PDT was effective for biofilms of 4 hours at a concentration of  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $p < 0.0001$ ) at the 3 fluences tested. The concentration  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  showed toxicity only at fluence  $20 \text{J}/\text{cm}^2$   $p < 0.0001$ . In 10 hours PDT biofilm was effective at Eosin concentrations of  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , but only at fluence  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $p < 0.0001$ ). Therefore, PDT with Eosin may be useful in inactivating *S. mutans* depending on the appropriate association of fluence and dye concentration, and may be a promising strategy for controlling biofilm and reducing bacteremia.

Keywords: Biofilm, Eosin Y, LED, Photodynamic Therapy, *Streptococcus mutans*

## INTRODUCTION

Dental caries is a chronic non-communicable disease (NCD), which is associated with changes in the composition of lost biofilms, where a tolerant and fatty acid-producing microbiota prevails (1).

The tissue damage caused is a common public health problem that can affect quality of life and result in expenses for individuals. Therefore, it is crucial to search for treatments that effectively combat this problem. In addition to brushing and flossing, substances such as chlorhexidine and fluoride are used to prevent dental injuries. However, these approaches can have adverse effects such as tooth staining and neurotoxicity. There are several therapeutic alternatives available, but not all of them target virulence factors (2,3,4).

One of the microorganisms of great importance in the formation of caries is the Gram-positive bacterium *Streptococcus mutans*, due to its production capacity and resistance to organic acids and for orchestrating changes in the biofilm's microbiome, via the production of organic acids and extracellular polysaccharides (EPS) (5).

Currently, there is increasing evidence demonstrating that Photodynamic Therapy (PDT) is emerging as an effective option to combat various microorganisms present in biofilms. It is a non-invasive treatment that is becoming increasingly popular in the field of dental medicine. The appropriate choice of the photosensitive molecule, its concentration and the correct application of light can transform PDT into an efficient strategy to eliminate biofilms (6,7).

PDT has become a widely used type of treatment due to its advantages such as safety, high selectivity and high efficiency (8), through the use of photosensitizing compounds, light and oxygen. Each element is essentially harmless to the human organism (9). Essential elements for the success of photodynamic therapies involve reactive oxygen species (ROS) that arise from photosensitizers after exposure to light (10,11).

Normally, cells react differently to damage caused for a variety of reasons, including the type of photosensitizer used, the amount of light received and cellular metabolic functioning. The type of photosensitizer chosen is fundamental in all stages of the photodynamic therapy treatment and Photodynamic Therapy studies suggest that Eosin Y functions as a photosensitizer and redox findings (12, 13).

Since biofilms represent a significant medical and economic challenge, especially with the growth of antibiotic-resistant microbes, it is essential to develop new therapeutic approaches to address this situation (14).

And considering that caries is a disease with global diffusion, the objective of this work was to verify the influence of photodynamic therapy applied “*in vitro*” on the metabolism of *Streptococcus mutans* biofilms using a composite resin photopolymerizer of the type LED and the dye eosin and as a photosensitive agent. Null hypothesis: PDT is not effective in treating biofilms with *S. mutans*.

## MATERIAL AND METHODS

### *Streptococcus mutans* strains

The ATCC 25175 strain of *Streptococcus mutans* was used, acquired from Fundação André Toselo, Campinas - SP(www.bdt.fat.org.br). The strain was stored in 40% (v/v) Glycerol at -20°C until use.

### *Maintenance of Streptococcus mutans Strains*

To start the experiment, 500 $\mu$ L of the strain was inoculated in 5mL of Tryptic Soy Broth medium – TSB (Bacto), and incubated for 24 hours at 37°C, followed by new cultivation for 12 hours, both in micro aerobiosis using the candle method, as described previously (15).

All culture media, as well as the solutions and materials used in the research, were autoclaved for 15 minutes at 121°C.

### *Biofilm Formation*

To form biofilms, the Complete Medium described by Dashper and Reynolds (16), supplemented with 50 mM sucrose and sterile 24-well culture plates was used

In 24 mL of complete medium, 300 $\mu$ l of an *S. mutans* culture whose absorbance was previously adjusted to 0.2 at 620 nm (T60U Spectrometer – PG Instruments, USA) and sucrose to reach a final concentration of 50 mM were added. Then, 1 mL of this inoculum was added to each well of the culture plate. The plates were incubated in microaerobiosis at 37°C for the time indicated in each experiment. After the incubation period, the complete medium was removed from the wells to begin the treatments. All experiments were performed in quadruplicate.

### *Eosin Y Treatment*

Eosin Y – yellow dye (Merck) was prepared at a concentration of 7x10<sup>-3</sup>M and serially diluted to concentrations of 7x10<sup>-4</sup>M, 7x10<sup>-5</sup>M, 7x10<sup>-6</sup>M and 7x10<sup>-7</sup>M with sterile 0,9% NaCl. Biofilms grown as described above were washed 3 times with sterile 0.9% NaCl and treated with 1 mL of eosin at different concentrations or sterile 0.9% NaCl (negative control). After 5 minutes, the eosin was removed and the wells were washed again with sterile 0.9% NaCl, 1 mL of TSB was added to each well and the plate was then incubated for 8 hours at 37°C in a micro aerobiosis atmosphere (candle technique). After this time, the culture medium was removed and the pH was measured with a digital pH meter (Alpax 200) and bacterial growth was measured using the 0.1% Violet Crystal method (see below).

### *LED treatment*

To test the effect of light, the biofilms formed on the culture plates after the incubation period of 4 hours and 10 hours received 1ml of sterile 0,9% NaCl and were irradiated with a dental LED (blue light 200 mW/cm<sup>2</sup> – 440 a 480 nm - SDI – Radical- USA) for 30 seconds (3J /cm<sup>2</sup>), 1 minute (6J /cm<sup>2</sup>) and 3 minutes (20J /cm<sup>2</sup>). LED fluence was assessed daily. Then, the

NaCl was removed, 1 mL of TSB was added to each well and the plates were incubated for 8 hours at 37°C in microaerobiosis. After this time, the pH was read and bacterial growth was measured using the Crystal Violet 0.1% method (see below). To avoid irradiation of adjacent wells, the bottom of the wells was stained prior to cultivation and gel prepared with 30% agar and 10% brilliant blue was added between the wells (Image 1). The distance between the laser and the sample surface was entered as 1cm for all samples.

#### *PDT with Eosin Y and LED*

To test the effect of the combination of light and Eosin, concentrations of Eosin  $7 \times 10^{-6}$ M and  $7 \times 10^{-7}$ M were used and NaCl was used as a negative control. 1 mL of eosin was placed in the plate wells, waited 5 minutes and after this period the wells were irradiated with the LED for 30 seconds ( $3 \text{J}/\text{cm}^2$ ), 1 minute ( $6 \text{J}/\text{cm}^2$ ) and 3 minutes ( $20 \text{J}/\text{cm}^2$ ). After treatment, the following steps were performed as previously described. The tests were performed in quadruplicate.

#### *Biofilm Quantification*

After the different treatments, the biofilms were gently washed with sterile saline solution 3 times, incubated for 60 minutes with 0.1% crystal violet solution in water, washed with saline solution and incubated for 30 minutes with absolute ethanol. The absorbance of the supernatant liquid was read at 550 nm (17).

#### *Statistical analysis*

The GraphPad Prism 9.5.1 program was used. Shapiro Wilk was used for the normality test, and ANOVA was used for the variance test followed by Dunett's test, with a significance level of 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTS

The growth curve of *S. mutans* in cell culture plates demonstrated the beginning of the log phase at around 4 hours and the stationary phase at around 16 hours (Graph 1).

The Eosin Y absorption spectrum (460-560 nm) corresponds with the LED absorption band (440-480 nm) (Graph 2).

All biofilms demonstrated metabolic activity after treatment with Eosin Y in the dark, and the acidification caused by the 4 hours biofilm was lower after eosin treatment in the dark in concentrations  $7 \times 10^{-3}$ M (pH  $5.0 \pm 0.012$ ),  $7 \times 10^{-4}$ M (pH  $4.9 \pm 0.017$ ) and  $7 \times 10^{-5}$ M (pH

4.6±0.062) observed after treatment with NaCl (pH 4.7±0.024) ( $p < 0,0001$ ). At concentrations  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  (pH 4.7±0.030,  $p = 0,3671$ ) and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  (pH 4.6±0.022), acidification was not different when compared to NaCl ( $p = 0,053$ ) (Table 1).

Similarly, biofilms maintained their growth capacity after treatment with Eosin, and in 4-hour biofilms growth was lower after treatment with eosin at concentrations  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,22 \pm 0,023$ ),  $7 \times 10^{-4} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,23 \pm 0,0022$ ) and  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,26 \pm 0,0015$ ) observed after treatment with NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0,31 \pm 0,010$ ) with a significant difference ( $p < 0,0001$ ). In concentrations  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,29 \pm 0,0018$ ,  $p = 0,0601$ ) and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,29 \pm 0,0032$ ), growth was not different when compared to the biofilm treated with NaCl ( $p = 0,068$ ) (Table 1).

For 10-hour biofilms, acidification was lower in biofilms treated with eosin at concentrations  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  (pH 5.1±0.0058) and  $7 \times 10^{-4} \text{M}$  (pH 5.0±0.0050) than the acidification observed after treatment with NaCl (pH 4.9±0.0082) ( $p < 0,0001$ ). In concentrations,  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  (pH 4.9±0.0130),  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  (pH 4.9±0.005) and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  (pH 4.9 ± 0,  $p = 0,227$ ) acidification was not different when compared to NaCl ( $p = 0,0951$  and  $p = 0,156$  respectively) (Table 1).

Similarly, 10-hour biofilm growth was lower in biofilms treated with eosin at concentrations  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,47 \pm 0,0042$ ),  $7 \times 10^{-4} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,50 \pm 0,005$ ) and  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,55 \pm 0,0050$ ) than after treatment with NaCl ( $0,66 \pm 0,0013$ ) ( $p < 0,0001$ ). In concentrations,  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,62 \pm 0,0014$ ) and  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  ( $A_{550\text{nm}} 0,67 \pm 0,0017$ ) growth was not different when compared to the biofilm treated with NaCl ( $p = 0,0651$  and  $p = 0,117$ , respectively) (Table 1).

When investigating the toxicity of LED on biofilm for 4 hours, irradiation did not affect the acidification of the medium at fluences of  $3 \text{J} / \text{cm}^2$  (30 minutes) (pH 5.0±0.019  $p = 0,2698$ )  $6 \text{J} / \text{cm}^2$  (1 minute) (pH 5.0±0.022  $p = 0,923$ ) and  $20 \text{J} / \text{cm}^2$  (3 minutes) (pH 5.0±0.0082  $p = 0,16$ ) when compared with NaCl (pH 5.0±0.029) and also did not affect biofilm growth at the same fluences of  $3 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,33 \pm 0,023$   $p = 0,8506$ ),  $6 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,34 \pm 0,017$   $p = 0,9775$ ) and in  $20 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,34 \pm 0,024$   $p = 0,9835$ ) when compared with NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0,34 \pm 0,020$ ) (Table 2).

Similarly, LED irradiation on the biofilm for 10 hours also did not affect the acidification of the medium at fluences  $3 \text{J} / \text{cm}^2$  (pH 5.0±0.014  $p = 0,0717$ ),  $6 \text{J} / \text{cm}^2$  (pH 5.0±0.015  $p = 0,1156$ ) and  $20 \text{J} / \text{cm}^2$  (pH 5.0±0.017  $p = 0,06$ ) when compared with NaCl (pH 4.9±0.029). Biofilm growth was also not affected by water fluences  $3 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,50 \pm 0,012$   $p = 0,681$ ),  $6 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,51 \pm 0,0098$   $p = 0,9478$ ) and  $20 \text{J} / \text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0,51 \pm 0,018$   $p = 0,9319$ ) when compared with NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0,51 \pm 0,020$ ) (Table 2).

When the 4-hour biofilm was treated with eosin at a concentration of  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  and LED at a fluency of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$ , the pH was less acidified (pH  $5.3 \pm 0.067$ ), as well as at a fluency of  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $6.2 \pm 0.009$ ) and in fluency  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $6.6 \pm 0.013$ ) when compared with NaCl (pH  $5.0 \pm 0.054$ ; pH  $5.0 \pm 0.060$ ; pH  $5.0 \pm 0.027$ , respectively) ( $p < 0.0001$ ). In concentration  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , acidification was not affected at fluences  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $5.0 \pm 0.062$   $p = 0.8267$ ) and  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  (1 minute) (pH  $5.0 \pm 0.012$   $p = 0.3723$ ) compared to treatment with NaCl (pH  $5.0 \pm 0.054$ ; pH  $5.0 \pm 0.060$ , respectively). At fluence  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  (3 minutes) acidification was lower (pH  $5.5 \pm 0.058$   $p < 0.0001$ ) when compared with the control (pH  $5.0 \pm 0.027$ ) (Table 3).

In relation to biofilm growth, PDT with eosin at the concentration  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  and fluence of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  affected growth ( $A_{550\text{nm}} 0.24 \pm 0.019$ ) as well as the fluency of  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.14 \pm 0.0011$ ) and  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.089 \pm 0.013$ ) when compared with NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0.31 \pm 0.008$ ,  $A_{550\text{nm}} 0.31 \pm 0.009$ ,  $A_{550\text{nm}} 0.33 \pm 0.013$  respectively) ( $p < 0.0001$ ). In concentration  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , growth was not affected at fluence of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.31 \pm 0.0011$ ;  $p = 0.9214$ ), nor at fluence of  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.32 \pm 0.023$ ;  $p = 0.6144$ ). The fluence of  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  (3 minutes) affected biofilm growth ( $A_{550\text{nm}} 0.22 \pm 0.025$ ;  $p < 0.0001$  when compared to NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0.31 \pm 0.008$ ,  $A_{550\text{nm}} 0.31 \pm 0.009$ ,  $A_{550\text{nm}} 0.33 \pm 0.013$ , respectively) (Table 3).

PDT with  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  eosin did not affect the metabolism of biofilms of 10 hours at a fluence of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $4.8 \pm 0.13$ ;  $p = 0.0849$ ) or  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $4.8 \pm 0.0016$ ;  $p = 0.8991$ ), compared with NaCl (pH  $4.9 \pm 0.072$  and pH  $4.8 \pm 0.0012$ , respectively). Already with the fluency of  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  leads to less acidification ( $6.0 \pm 0.013$ ;  $p < 0.0001$ ) compared to the control (pH  $4.8 \pm 0.150$ ). In a similar way, the concentration  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  did not affect acidification in water  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  (pH  $4.9 \pm 0.029$   $p = 0.5051$ ) nor at fluence of  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  (1 minute) (pH  $4.8 \pm 0.0024$ ;  $p = 0.9971$ ) compared to the control (pH  $0.48 \pm 0.06$  and pH  $0.49 \pm 0.0018$ , respectively). The fluency of  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  led to lower acidification (pH  $5.8 \pm 0.070$   $p < 0.0001$ ) when compared with NaCl (pH  $4.8 \pm 0.150$ ) (Table 4).

Biofilm growth after PDT with Eosin at a concentration of  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  and fluence of  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.49 \pm 0.0026$ ;  $p = 0.9068$ ) and  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.50 \pm 0.0010$ ;  $p = 0.8805$ ) compared with the respective controls ( $A_{550\text{nm}} 0.48 \pm 0.06$  and  $0.49 \pm 0.0018$ , respectively). The fluence of  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  (3 minutes) affected biofilm growth qualities ( $A_{550\text{nm}} 0.34 \pm 0.013$ ) when compared to NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0.54 \pm 0.012$ ,  $p < 0.0001$ ). In concentration  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , with fluences  $3 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.54 \pm 0.011$ ;  $p = 0.1121$ ) and  $6 \text{J}/\text{cm}^2$  ( $A_{550\text{nm}} 0.51 \pm 0.0008$ ;  $p = 0.0565$ ) did not affect biofilm growth compared to the control group ( $A_{550\text{nm}} 0.48 \pm 0.06$ ,  $0.49 \pm 0.0018$ , respectively) while TFD at this concentration with a fluence of  $20 \text{J}/\text{cm}^2$  affected biofilm growth ( $A_{550\text{nm}} 0.49 \pm 0.010$ ) when compared with NaCl ( $A_{550\text{nm}} 0.54 \pm 0.012$ ;  $p < 0.0001$ ) (Table 4).



## DISCUSSION

The results demonstrated that concentration of Eosin used was lethal to biofilms since after treatment with any of the concentrations the biofilm showed growth and acidification capacity. There was eosin toxicity at concentrations  $7 \times 10^{-3}$ ,  $7 \times 10^{-4}$  and  $7 \times 10^{-5}$ , for the 4-hour biofilm and at concentrations  $7 \times 10^{-3}$ ,  $7 \times 10^{-4}$  for the 10-hour biofilm. In this biofilm, the  $7 \times 10^{-5}$  concentration only affected growth. At concentrations  $7 \times 10^{-6}$ M and  $7 \times 10^{-7}$ M, Eosin does not present toxicity to the *S. mutans* biofilm, but when associated with light, the inhibitory effect on the metabolic and proliferative activity of biofilms exists and is dependent on the dose of dye and the fluence used. This observation is important for its use in Photodynamic Therapy, which recommends that the dye alone cannot be toxic to the target cell or tissue, but only when associated with an adequate source of light (18).

ALVES et al (2019), used PDT with 0,005% methylene blue dye and low-intensity laser in carious lesions of first molars. The reduction of *S. mutans* was 76,4% after caries removal, and when associated with PDT was 92,6%, concluding that PDT could serve as a complement to caries reduction (19).

The treatment of extracted and non-cavished human molar teeth with PDT using Indocyanine Green (0,5 mL) and 1W diode laser for 60 seconds significantly reduced the number of *S. mutans* compared to the positive control group (20).

Another important aspect in PDT is the time that the dye must remain in contact with the cell for its absorption in sufficient quantities to induce cell death when irradiated with a light source. In the present study, eosin was in contact with the biofilm for 5 minutes, the same time used in a study that evaluated PDT in *S. mutans* biofilm using the dyes erythrosine and methylene blue at concentrations of 100 $\mu$ M and 250 $\mu$ M for 5 minutes (21), there was no toxicity of the drugs “per se”. Also in this study, the combination of the photosensitizers erythrosine and methylene blue (at a concentration of 250  $\mu$ M) and white halogen light at a fluence of 0.6 J/cm<sup>2</sup>, led to a significant reduction in Biofilm (21).

When PDT was tested against *S. mutans* using the Rose Bengal dye and the halogen light photopolymerizer as a light source, the dye was shown to be toxic only in concentrations above 0,5 $\mu$ mol/liter for light intensity up 216.6J/cm<sup>2</sup>. The association of Rose Bengal 0.5 $\mu$ mol/liter with the light source led to the death of 100% of bacterial cells (22).

In the presente study, the LED applied to the biofilm treated only with saline solution had no toxicity in any of the fluences used. In another study, the red diode laser also did not harm the growth of *S. mutans* at the fluences used (10, 20 and 30 J/cm<sup>2</sup>), but unlike the present

study, the green diode led to an inhibition of growth between 32,69% and 40,2%, and the blue diode of 40,7% at a fluence of 20J/cm<sup>2</sup> (23), indicating the possibility that some cellular metabolite may be excited by these light sources, leading to the cytotoxic effect.

In the present study, the younger biofilm (4 hours) was more susceptible to PDT, with lower fluences 3J/cm<sup>2</sup> and 6J/cm<sup>2</sup> and Eosin Y concentration (7x10<sup>-6</sup>M) affecting both pH and growth. These same conditions did not affect the biofilm when associated with Eosin and the concentration of 7x10<sup>-7</sup>M, thus showing a dose-dependent effect.

In fact, PDT with fluence 20J/cm<sup>2</sup> was effective in both the 7x10<sup>-6</sup>M and 7x10<sup>-7</sup>M dilutions, affecting growth and pH, showing that fluence is important to induce the production of reactive oxygen species sufficient to compromise the physiology of the biofilm.

Merigo et al (2019) tested different photosensitizers in PDT with different wavelengths in *S.mutans* cultures, and observed that this microorganism is susceptible to different photosensitizers when using the appropriate wavelength. The red diode laser used with toluidine blue caused a growth inhibitory effect varying between 99,91% (at fluences of 10 J/cm<sup>2</sup>) and 100% (at fluences of 20 and 30 J/cm<sup>2</sup>). The PDT with blue diode and curcumin impaired growth by 99,26% at a fluence of 30 J/cm<sup>2</sup> and the green diode inhibited 100% of growth at all fluences tested (10, 20 and 30 J/cm<sup>2</sup>) (23).

In one study, the signal of the presence of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was detected after 5 minutes of simulated sunlight associated with 10 μM eosin (24). In another experiment, photodynamic therapy using a concentration of 2.4x10<sup>-3</sup> mol/L of chlorophyllin-phycoerythrin and 3 minutes of diode laser times *S. mutans* virulence factors were reduced (25). Research used a 100mW laser as a light source and the study demonstrated that 10 μM of the photosensitizers toluidine blue, Azure A and methylene blue inhibit biofilm formation by 49, 50 and 27%, respectively when irradiated with continuous light 5J/cm<sup>2</sup>, and 57, 62 and 55%, respectively, with fractionated light dose. EPS production was reduced to 30, 18 and 10% respectively under continuous light and 36%, 30% and 14% respectively under fractional light (26).

Only one study using Eosin as a photosensitizing agent in PDT for *S. mutans* was found, but associated with HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). In this study it was demonstrated that the use of Eosin combined with light generates an inhibitory effect on the *S. mutans* biofilm, and that this effect is dependent on the dose and fluence of light. The lowest concentration (7x10<sup>-7</sup>M), associated with a fluence of 20J/cm<sup>2</sup>, proved to be more effective, due to the use of a lower concentration of the photosensitizer.

Our study is the first, to our knowledge, that tests the effectiveness of PDT with Eosin and on *S. mutans* in biofilms of different ages and reinforces that the choice of photosensitizer

concentration, together with irradiation conditions, can make PDT a strategy efficient, for example, for the treatment and eradication of biofilm and reduction of bacteremia in the surgical process of carious lesions.

## RESUMO

*Streptococcus mutans* é um microrganismo formador de biofilme, acidogênico e acidúrico, sendo considerado um dos principais causadores da cárie dental. Os biofilmes representam um desafio significativo em termos médicos e econômicos, especialmente com o crescimento dos micróbios resistentes a antibióticos sendo essencial desenvolver novas abordagens terapêuticas para lidar com essa situação. A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem se tornado um tipo de tratamento muito utilizado devido as suas vantagens como segurança, alta seletividade e alta eficiência, onde se utiliza uma fonte de luz que ativa um agente fotossensível gerando compostos tóxicos tais como Espécies Reativas de Oxigênio, causando morte celular. Objetivo do presente estudo foi verificar a eficácia da TFD com Eosina Y e luz do fotopolimerizador LED para inativação de *S. mutans*. Foi testada a toxicidade da Eosina Y ( $7 \times 10^{-3} \text{M}$  a  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ ) na ausência de luz e nas fluências de  $3 \text{J/cm}^2$ ,  $6 \text{J/cm}^2$  e  $20 \text{J/cm}^2$ , em biofilmes de 4 e 10 horas. Houve toxicidade no escuro pela eosina Y nas concentrações  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  a  $7 \times 10^{-5} \text{M}$  para o biofilme de 4 horas ( $p < 0,0001$ ) e nas concentrações  $7 \times 10^{-3} \text{M}$  e  $7 \times 10^{-4} \text{M}$ , para o biofilme de 10 horas ( $p < 0,0001$ ). As concentrações  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  e  $7 \times 10^{-7} \text{M}$  no escuro, não se mostraram tóxicas nos biofilmes de 4 e 10 horas. O LED não apresentou toxicidade em nenhuma das fluências testadas. A TFD foi eficaz para biofilmes de 4 horas na concentração  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) nas 3 fluências testadas. A concentração  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , apresentou toxicidade apenas na fluência  $20 \text{J/cm}^2$   $p < 0,0001$ . No biofilme de 10 horas a TFD foi eficaz nas concentrações de Eosina de  $7 \times 10^{-6} \text{M}$  e  $7 \times 10^{-7} \text{M}$ , mas apenas na fluência  $20 \text{J/cm}^2$  ( $p < 0,0001$ ). Dessa forma a TFD com Eosina Y pode ser útil na inativação de *S. mutans* a depender da associação adequada de fluência e concentração de corante, podendo ser uma estratégia promissora para o controle do biofilme e diminuição da bacteremia.

## ACKNOWLEDGMENTS

I thanks to FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) for financial support through the scholarship (process no. 5.12/2021) and CAPES (Foundation for the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel) - 001

## REFERENCES

- 1- PITTS, Nigel B.; MARSH, Philip D. Understanding tooth decay as a non-communicable disease. *British Dental Journal*, [SL], v. 231, no. 12, p. 749-753, 17 Dec. 2021. Springer Science and Business Media LLC.<http://dx.doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>
- 2- LIN, Yongwang; CHEN, Jiamin; ZHOU, Xuedong; LI, Yuqing. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting exopolysaccharide metabolism. *Critical Reviews In Microbiology*, [SL], v. 47, no. 5, p. 667-677, 3 May 2021. Informa UK Limited.<http://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2021.1915959>.
- 3-GRANDJEAN, Philippe. Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review. *Environmental Health*, [SL], v. 18, no. 1, p. 520-527, Dec. 2019. Springer Science and Business Media LLC.<http://dx.doi.org/10.1186/s12940-019-0551-x>.
- 4-GOD, Frank Poppolo; OUANOUNOU, Aviv. Chlorhexidine in Dentistry: pharmacology, uses and adverse effects. *International Dental Journal*, [SL], v. 72, no. 3, p. 269-277, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>
- 5- LEMOS, JA; PALMER, SR; ZENG, L.; WEN, ZT; KAJFASZ, JK; FREIRES, IA; ABRANCHES, J.; BRADY, L.J. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, [SL], v. 7, no. 1, p. 237-254, 8 Feb. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>
- 6-WARRIOR, Anjali; MAZUMDER, Nirmal; PRABHU, Sudharshan; SATYAMOORTHY, Kapaettu; MURALI, Thokur Sreepatia. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, [SL], v. 102090, Mar. 2021. Elsevier BV.<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>.
- 7- STÁJER, Anette; KAJÁRI, Szilvia; GAJDÁCS, Márió; MUSAH-EROJE, Aima; BARÁTH, Zoltán. Usefulness of Photodynamic Therapy in Dentistry: current concepts. *Revista Odontológica*, [SL], v. 2, p. 43, May 7, 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/dj80>
- 8- WANG, Shuai; SUN, Mingliang. Progress and trends in photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to aie-based photosensitizers. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy*, [SL], v. 34, p. 102254, jun. 2021. Elsevier BV.<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102254>
- 9- SUN, Yixin; ZHAO, Dongyang; WANG, Gang; WANG, Yang; CAO, Linlin; Sun, Jin; JIANG, Qikun; HE, Zhonggui. Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges and future development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, [SL], v. 10, no. 8, p. 1382-1396, Aug. 2020. Elsevier BV.<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.004>

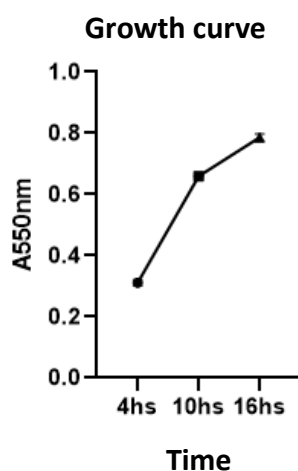
- 10- ARUOMA, Okezie I.; HALLIWELL, Barry. Oxygen free radicals and human diseases. *Journal Of The Royal Society Of Health*, [SL], v. 111, no. 5, p. 172-177, Oct. 1991. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/146642409111100506>.
- 11- YU, Ben Zhong Tang; Xinggui Gu; Guan Wang; Jiangman Sun; Zhentao He; Huiming Huang; Binjie Chen; Hao. AIE-Active Photosensitizers: Manipulation of the Generation of Reactive Oxygen Species and Applications in Photodynamic Therapy. *Biosensors*, [SL], v. 348, n. 12, p. 327-345, May 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/bios12050348>
- 12- LI, Xingshu; LEE, Dayoung; HUANG, Jian-Dong; YOON, Juyoung. Phthalocyanine-assembled nanodots as photosensitizers for highly efficient type I photoreactions in photodynamic therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, [SL], v. 57, no. 31, p. 9885-9890, 4 July. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201806551>.
- 13- YAN, Dong-Mei; RAO, Li; CHEN, Jia-Rong; XIAO, Wen-Jing. Eosin Y as a redox catalyst and photosensitizer for sequential amination and oxidation of benzylic C–H. *Chemistry – A European Journal*, [SL], v. 24, no. 63, p. 16895-16901, 17 Oct. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201804229>
- 14- KARYGIANNI, L.; REN, Z.; THURNHEER, T.. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends In Microbiology*, [SL], v. 28, no. 8, p. 668-681, Aug. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.
- 15- Azevedo, RVP, Nelson P, Assed S, Ito IY. Streptococci of the mutans group: isolation, identification and prevalence of species in the saliva of mother/child pairs. *Rev Odontol Univ São Paulo*, v.12, n.1, p.47-50, Jan./Mar. 1998. doi: 10.1590/S0103-06631998000100008
- 16-DASHPER, SG; REYNOLDS, E C. Characterization of the transmembrane movement of glucose and glucose analogues in Streptococcus Ingbritt mutants. *Journal Of Bacteriology*, [SL], v. 172, no. 2, p. 556-563, Feb. 1990. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.172.2.556-563.1990>..
- 17- AHN, Sug-Joon; AHN, Sang-Joon; WEN, Zezhang T.; BURNE, Robert A.. Characteristics of biofilm formation by Streptococcus mutans in the presence of saliva. *Infection And Immunity*, [SL], v. 76, no. 9, p. 4259-4268, Sep. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00422-08>
- 18-Portuguese SUN, Yixin; ZHAO, Dongyang; WANG, Gang; WANG, Yang; CAO, Linlin; Sun, Jin; JIANG, Qikun; HE, Zhonggui. Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges and future development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, [SL], v. 10, no. 8, p. 1382-1396, Aug. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.004>.

- 19-ALVES, Luísa Valente Gotardo Lara; CURYLOFO-ZOTTI, Fabiana Almeida; BORSATTO, Maria Cristina; SALVADOR, Sérgio Luiz de Souza; VALÉRIO, Rodrigo Alexandre; SOUZA-GABRIEL, Aline Evangelista; CORONA, Silmara Aparecida Milori. Influence of antimicrobial photodynamic therapy on carious lesions. Randomized split-mouth clinical trial on primary molars. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, [SL], v. 26, p. 124-130, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.02.018>.
- 20- BAL, Fatma Aytac; OZKOCAK, Ismail; CADIRCI, Bilge Hilal; KARAARSLAN, Emine Sirin; CAKDINLEYEN, Melis; AGACCIOLU, Merve. Effects of indocyanine green photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy*, [SL], v. 26, p. 229-234, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.005>.
- 21- TOKUBO, Laíse Midori; ROSALEN, Pedro Luiz; SARDI, Janaina de Cássia Orlandi; FREIRES, Irlan Almeida; FUJIMAKI, Mitsue; UMEDA, Josely Emiko; BARBOSA, Patrícia Magalhães; TECCHIO, Gabriela Ortolan; HIOKA, Noboru; FREITAS, Camila Fabiano de. Antimicrobial effect of photodynamic therapy with erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, [SL], v. 94-98, defined. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>.
- 22- PAULINO, Tony P.; MAGALHÃES, Prislaine P.; THEDEI, Geraldo; TEDESCO, Antônio C.; CIANCAGLINI, Pietro. Use of visible light-based photodynamic therapy for bacterial photoinactivation. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, [SL], v. 33, no. 1, p. 46-49, Jan. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010424>.
- 23- Merigo E, Conti S, Vescovi P, Fornaini C. Antimicrobial photodynamic therapy protocols in *mutans streptococci* with different wavelength modifications and photosensitizing dyes. *Bioengineering*. 2019.,6,42; doi:10.3390/bioengenharia6020042
- 24- Fan, B; Peng, W; Zhang, Yu; Liu, P; Shen, Jiang. ROS conversion promotes the bactericidal efficiency of Eosin Y-based photodynamic therapy. *Biomaterials Science*, [SL], v. 11, no. 14, p. 4930-4937, 2023. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d3bm00804e>.
- 25-AFRASIABI, Shima; POURHAJIBAGHER, Maryam; CHINIFORUSH, Nasim; AMINIAN, Mahdi; VARAEI, Samaneh Sadat Rasi; BAHADOR, Abbas. Effects of sublethal dose of antimicrobial photodynamic therapy on the main virulence characteristics of *Streptococcus mutans*. *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy*, [SL], v. 32, p. 102044, Dec. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102044>.

26- MISBA, Lama; KHAN, Asad u. Enhanced photodynamic therapy using light fractionation against *Streptococcus Mutans* biofilm: type i and type ii mechanism. *Future Microbiology*, [SL], v. 13, no. 4, p. 437-454, 22 Feb. 2018. Informa UK Limited.<http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2017-0207>.

## TABLES AND GRAPHICS

Graph 1 – *S. mutans* growth curve at 4 hours, 10 hours and 16 hours



Graph 2 – Eosin absorption spectrum and LED emission spectrum

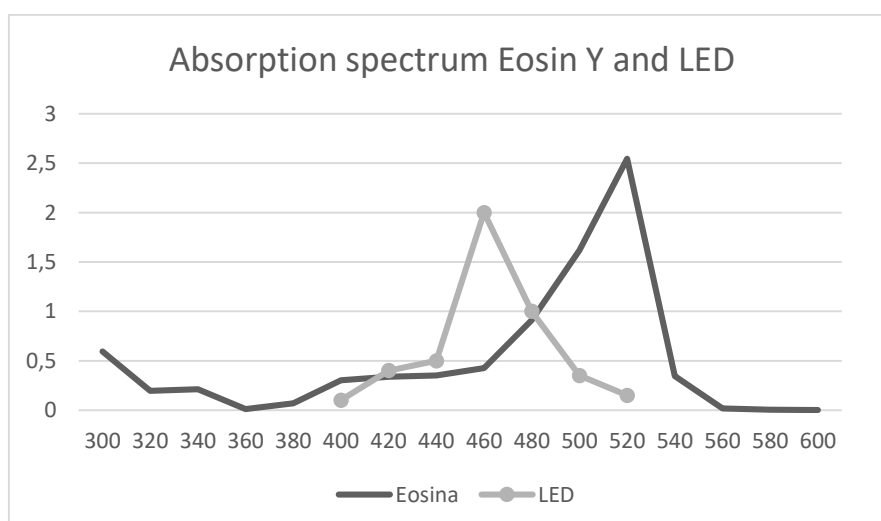


Table 1 – Mean and standard deviation of the assessment of acidification and bacterial growth after treatment with eosin at different concentrations, in 4-hour and 10-hour biofilms. Letters

stored in the columns indicate statistical differences in absorption in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours). Lowercase letters in the columns indicate significant differences in pH in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours).

| Treatment            |           | 4 hours                  | 10 hours                 |
|----------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|
| NaCl                 | ABS 550nm | 0.31±0.010 <sup>A</sup>  | 0.66±0.0013 <sup>A</sup> |
|                      | pH        | 4.7±0.024 <sup>a</sup>   | 4.9±0.0082 <sup>a</sup>  |
| 7x10 <sup>-3</sup> M | ABS 550nm | 0.22±0.023 <sup>B</sup>  | 0.47±0.0042 <sup>B</sup> |
|                      | pH        | 5.0±0.012 <sup>b</sup>   | 5.1±0.0058 <sup>b</sup>  |
| 7x10 <sup>-4</sup> M | ABS 550nm | 0.23±0.0022 <sup>B</sup> | 0.50±0.0051 <sup>B</sup> |
|                      | pH        | 4.9±0.017 <sup>b</sup>   | 5.0±0.0050 <sup>b</sup>  |
| 7x10 <sup>-5</sup> M | ABS 550nm | 0.26±0.0015 <sup>B</sup> | 0.55±0.0050 <sup>B</sup> |
|                      | pH        | 4.6±0.062 <sup>b</sup>   | 4.9±0.0130 <sup>a</sup>  |
| 7x10 <sup>-6</sup> M | ABS 550nm | 0.29±0.0018 <sup>A</sup> | 0.62±0.0014 <sup>A</sup> |
|                      | pH        | 4.7±0.030 <sup>a</sup>   | 4.9±0.0058 <sup>a</sup>  |
| 7x10 <sup>-7</sup> M | ABS 550nm | 0.29±0.0032 <sup>A</sup> | 0.67±0.0017 <sup>A</sup> |
|                      | pH        | 4.6±0.022 <sup>a</sup>   | 4.9±0 <sup>a</sup>       |

Table 2 – Mean and standard deviation of the assessment of acidification and bacterial growth after treatment with LED, in biofilms at 4 hours and 10 hours. Letters stored in the columns indicate statistical differences in absorption in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours). Lowercase letters in the columns indicate significant differences in pH in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours).

|          | NaCl                    |                        | 30 seconds (3J/cm <sup>2</sup> ) |                        | 1 minutes (6J/cm <sup>2</sup> ) |                        | 3 minutes (20J/cm <sup>2</sup> ) |                         |
|----------|-------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------|
|          | ABS 550nm               | pH                     | ABS 550nm                        | pH                     | ABS 550nm                       | pH                     | ABS 550nm                        | pH                      |
| 4 hours  | 0.34±0.020 <sup>A</sup> | 5.0±0.029 <sup>a</sup> | 0.33±0.023 <sup>A</sup>          | 5.0±0.019 <sup>a</sup> | 0.34±0.017 <sup>A</sup>         | 5.0±0.022 <sup>a</sup> | 0.34±0.024 <sup>A</sup>          | 5.0±0.0082 <sup>a</sup> |
| 10 hours | 0.51±0.020 <sup>A</sup> | 4.9±0.029 <sup>a</sup> | 0.50±0.012 <sup>A</sup>          | 5.0±0.014 <sup>a</sup> | 0.51±0.0098 <sup>A</sup>        | 5.0±0.015 <sup>a</sup> | 0.51±0.018 <sup>A</sup>          | 5.0±0.017 <sup>a</sup>  |

Table 3 – Mean and standard deviation of the assessment of acidification and bacterial growth after treating the biofilm for 4 hours with eosin at concentrations 7x10<sup>-6</sup>M and 7x10<sup>-7</sup>M and LED at times of 30 seconds, 1 minute and 3 minutes. Letters stored in the columns indicate statistical differences in absorption in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours). Lowercase letters in the columns indicate significant differences in pH in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours).



|                            | 30 seconds (3J/cm <sup>2</sup> ) |                        | 1 minute (6J/cm <sup>2</sup> ) |                        | 3 minutes (20J/cm <sup>2</sup> ) |                        |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|
|                            | ABS 550nm                        | pH                     | ABS 550nm                      | pH                     | ABS 550nm                        | pH                     |
| NaCl                       | 0.31±0.008 <sup>A</sup>          | 5.0±0.054 <sup>a</sup> | 0.31±0.009 <sup>A</sup>        | 5.0±0.060 <sup>a</sup> | 0.33±0.013 <sup>A</sup>          | 5.0±0.027 <sup>a</sup> |
| Eosin 7x10 <sup>-6</sup> M | 0.24±0.019 <sup>B</sup>          | 5.3±0.067 <sup>b</sup> | 0.14±0.0011 <sup>B</sup>       | 6.2±0.009 <sup>b</sup> | 0.089±0.013 <sup>B</sup>         | 6.6±0.013 <sup>b</sup> |
| Eosin 7x10 <sup>-7</sup> M | 0.31±0.0011 <sup>A</sup>         | 5.0±0.062 <sup>a</sup> | 0.32±0.023 <sup>A</sup>        | 5.0±0.012 <sup>a</sup> | 0.22±0.025 <sup>B</sup>          | 5.5±0.058 <sup>b</sup> |

Table 4 – Mean and standard deviation of the evaluation of acidification and bacterial growth after treating the biofilm for 10 hours with eosin at concentrations 7x10<sup>-6</sup>M and 7x10<sup>-7</sup>M and LED at times of 30 seconds, 1 minute and 3 minutes. Letters stored in the columns indicate statistical differences in absorption in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours). Lowercase letters in the columns indicate significant differences in pH in relation to the control (NaCl) at each of the indicated times (4 and 10 hours).

|                            | 30 seconds (3J/cm <sup>2</sup> ) |                        | 1 minute (6J/cm <sup>2</sup> ) |                         | 3 minutes (20J/cm <sup>2</sup> ) |                        |
|----------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|
|                            | ABS 550nm                        | pH                     | ABS 550nm                      | pH                      | ABS 550nm                        | pH                     |
| NaCl                       | 0.48±0.06 <sup>A</sup>           | 4.9±0.072 <sup>a</sup> | 0.49±0.0018 <sup>A</sup>       | 4.8±0.0012 <sup>a</sup> | 0.54±0.012 <sup>A</sup>          | 4.8±0.150 <sup>A</sup> |
| Eosin 7x10 <sup>-6</sup> M | 0.49±0.0026 <sup>A</sup>         | 4.8±0.130 <sup>a</sup> | 0.50±0.0010 <sup>A</sup>       | 4.8±0.0016 <sup>a</sup> | 0.34±0.013 <sup>B</sup>          | 6.0±0.013 <sup>b</sup> |
| Eosin 7x10 <sup>-7</sup> M | 0.54±0.011 <sup>A</sup>          | 4.9±0.029 <sup>a</sup> | 0.51±0.0008 <sup>A</sup>       | 4.8±0.0024 <sup>a</sup> | 0.49±0.010 <sup>B</sup>          | 5.8±0.070 <sup>b</sup> |

## IMAGES

Image 1 – 24-well culture plate, prepared for irradiation with LED or treatment with LED and eosin. The bottom of the plate was painted black and gel prepared with agar and brilliant blue dye was added between the wells to avoid irradiation in adjacent wells.



## REFERÊNCIAS

BOWEN, William H.; BURNE, Robert A.; WU, Hui; KOO, Hyun. Oral Biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 229-242, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>

BOWEN, W.H.; KOO, H.. Biology of Streptococcus mutans-Derived Glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 69-86, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000324598>.

CASTANO, Michael R. Hamblin; Tatiana N. Demidova; Ana P.. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 2, n. 8, p. 1-23, maio 2005. [http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00030-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00030-x)

CIEPLIK, Fabian; BUCHALLA, Wolfgang; HELLWIG, Elmar; AL-AHMAD, Ali; HILLER, Karl-Anton; MAISCH, Tim; KARYGIANNI, Lamprini. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions—A systematic review. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 18, p. 54-62, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.01.005>.

DąBROWSKI, Janusz M.. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: mechanisms of their generation and potentiation. **Inorganic Reaction Mechanisms**, [S.L.], p. 343-394, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adioch.2017.03.002>.

DAVID, Lawrence A.; MAURICE, Corinne F.; CARMODY, Rachel N.; GOOTENBERG, David B.; BUTTON, Julie E.; WOLFE, Benjamin E.; LING, Alisha V.; DEVLIN, A. Sloan; VARMA, Yug; FISCHBACH, Michael A.. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, [S.L.], v. 505, n. 7484, p. 559-563, 11 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12820>.

DEUS, Frank Poppolo; OUANOUNOU, Aviv. Chlorhexidine in Dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects. **International Dental Journal**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 269-277, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>

GRANDJEAN, Philippe. Developmental fluoride neurotoxicity: an updated review. **Environmental Health**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 520-527, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12940-019-0551-x>

HAJISHENGALLIS, E.; PARSAEI, Y.; KLEIN, M.I.; KOO, H.. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. **Molecular Oral Microbiology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 24-34, 4 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/omi.12152..>

HOBLEY, Laura; HARKINS, Catriona; MACPHEE, Cait E.; STANLEY-WALL, Nicola R.. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 649-669, 22 abr. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuv015>.

JUZENIENE, Asta; GEME, Johan. A história da PDT na Noruega : Parte II. Avanços recentes na PDT geral e ALA-PDT. **Fotodiagnóstico e Terapia Fotodinâmica**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 80-87, jun. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2006.11.00>

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T.. Biofilm Matrixome: extracellular components in structured microbial communities. **Trends In Microbiology**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 668-681, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.

KASHA, Michael. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates. **Radiation Research**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 55, set. 1963. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3571331>

LEMONS, J.A.; PALMER, S.R.; ZENG, L.; WEN, Z.T.; KAJFASZ, J.K.; FREIRES, I.A.; ABRANCHES, J.; BRADY, L.J.. The Biology of Streptococcus mutans. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 237-254, 8 fev. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>.

LI, Xingshu; LEE, Dayoung; HUANG, Jian-Dong; YOON, Juyoung. Phthalocyanine-Assembled Nanodots as Photosensitizers for Highly Efficient Type I Photoreactions in Photodynamic Therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 57, n. 31, p. 9885-9890, 4 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201806551>

LIN, Yongwang; CHEN, Jiamin; ZHOU, Xuedong; LI, Yuqing. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. **Critical Reviews In Microbiology**, [S.L.], v. 47, n. 5, p. 667-677, 3 maio 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2021.1915959>.

MASLOWSKI, Kendle M; MACKAY, Charles R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 5-9, 17 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni0111-5>.

MROZ, Pawel; YAROSLAVSKY, Anastasia; KHARKWAL, Gitika B; HAMBLIN, Michael R.. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 2516-2539, 3 jun. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers3022516>

NOBBS, Richard J. Lamont; Howard F.Jenkinson; Angela H.. *Streptococcus* Adherence and Colonization. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 3, n. 73, p. 407-450, ago. 2009. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00014-09>.

NOWAK-STĘPNIOWSKA, Agata; MAŁECKI, Maciej; WIKTORSKA, Katarzyna; ROMISZEWSKA, Anna; PADZIK-GRACZYK, Alfreda. Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)2-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cell lines. Part I. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 39-48, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.09.002>.

PITTS;, Nigel B.; ZERO, Domenick T.; MARSH, Phil D.; EKSTRAND, Kim; WEINTRAUB, Jane A.; RAMOS-GOMEZ, Francisco; TAGAMI, Junji; TWETMAN, Svante; TSAKOS, Georgios; ISMAIL, Amid. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 320-334, maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

PITTS, Nigel B.; TWETMAN, Svante; FISHER, Julian; MARSH, Philip D.. Understanding dental caries as a non-communicable disease. **British Dental Journal**, [S.L.], v. 231, n. 12, p. 749-753, 17 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>.

ROBERTSON, C.A; ABRAHAMSE Evans; HAWKINS David;. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PD. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B**, [S.L.], v. 96, n. 8, p. 1-8, abr. 2009

WARRIER, Anjali; MAZUMDER, Nirmal; PRABHU, Sudharshan; SATYAMOORTHY, Kapaettu; MURALI, Thokur Sreepathy. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 33, p. 102090, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>

WANG, Shuai; WANG, Xiao; YU, Liangmin; SUN, Mingliang. Progress and trends of photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to aie-based photosensitizers. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 34, p. 102254, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102254>.

STÁJER, Anette; KAJÁRI, Szilvia; GAJDÁCS, Márió; MUSAH-EROJE, Aima; BARÁTH, Zoltán. Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: current concepts. **Dentistry Journal**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 43, 7 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/dj8020043>.

SUN, Yixin; ZHAO, Dongyang; WANG, Gang; WANG, Yang; CAO, Linlin; SUN, Jin; JIANG, Qikun; HE, Zhonggui. Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 10, n. 8, p. 1382-1396, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.004>.

YAN, Dong-Mei; ZHAO, Quan-Qing; RAO, Li; CHEN, Jia-Rong; XIAO, Wen-Jing. Eosin Y as a Redox Catalyst and Photosensitizer for Sequential Benzylic C–H Amination and Oxidation. **Chemistry – A European Journal**, [S.L.], v. 24, n. 63, p. 16895-16901, 17 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201804229>

YU, Ben Zhong Tang; Xinggui Gu ; Guan Wang; Jiangman Sun; Zhentao He; Huiming Huang; Binjie Chen; Hao. AIE-Active Photosensitizers: Manipulation of Reactive Oxygen Species Generation and Applications in Photodynamic Therapy. **Biosensors**, [S.L.], v. 348, n. 12, p. 327-345, maio 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/bios12050348>

## ANEXOS

## Instruções aos autores

## Escopo e política

O Brazilian Dental Journal é um periódico científico revisado por pares (sistema duplo-cego) que publica Documentos Originais Completos, Comunicações Curtas, Relatórios de Casos e Críticas Comidadas, tratando os diversos campos da Odontologia ou áreas relacionadas, com acesso aberto. Serão consideradas para publicação apenas artigos originais. Na submissão de um manuscrito, os autores devem informar em carta de encaminhamento que o material não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação em outro periódico, quer seja no formato impresso ou eletrônico.

## ENDEREÇO ELETRÔNICO PARA SUBMISSÃO

SERÃO CONSIDERADOS APENAS TRABALHOS REDIGIDOS EM INGLÊS. Autores cuja língua nativa não seja o Inglês, devem ter seus manuscritos revisados por profissionais proficientes na Língua Inglesa. **Os trabalhos aceitos para publicação serão submetidos à Revisão Técnica, que compreende revisão linguística, revisão das normas técnicas e adequação ao padrão de publicação do periódico. O custo da Revisão Técnica será repassado aos autores. A submissão de um manuscrito ao BDJ implica na aceitação prévia desta condição.** A decisão de aceitação para publicação é de responsabilidade dos Editores e baseia-se nas recomendações do corpo editorial e/ou revisores "ad hoc". Os manuscritos que não forem considerados aptos para publicação receberão um e-mail justificando a decisão. Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados no BDJ são de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do corpo editorial.

Todos os manuscritos serão submetidos a revisão por pares. Autores e revisores serão mantidos anônimos durante o processo de revisão. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Brazilian Dental Journal é um jornal de acesso aberto, o que significa que todos os artigos publicados estão disponíveis gratuitamente na Internet imediatamente após a publicação.

O Brazilian Dental Journal manterá os direitos autorais e editoriais de todos os artigos publicados, incluindo traduções. Os usuários podem usar, reutilizar e construir sobre o material publicado na revista, mas apenas para fins não comerciais e desde que a fonte seja claramente e adequadamente mencionada.

A Revista adota sistema para identificação de plágio (AntiPlagiarist - ACNP Software).

O Brazilian Dental Journal está indexado na base de dados DCAJ para acesso público.

## Registro e publicação de Erratas

Errata são correções de erros identificados em um artigo ou outro tipo de documento já publicado. A publicação de uma errata é necessária quando o(s) autor(es) do artigo ou editor, identificam um ou mais erros no artigo já publicado. O procedimento para publicação de errata segue a orientação das bases internacionais e visa preservar o registro original do manuscrito informando, todavia sobre eventuais correções. As correções devem ser identificadas e informadas ao Editor-chefe da Brazilian Dental Journal através do e-mail [sousane@fhop.usp.br](mailto:sousane@fhop.usp.br). Em seguida, o editor-chefe iniciará o processo de publicação no SciELO informando sobre o erro localizado em um artigo já publicado.

## Retração de artigos publicados

A retratação é um instrumento público para registrar problemas em artigo publicado (Retração Parcial) ou comunicar o seu cancelamento (Retração Total) e é parte integral do sistema de comunicação científica. O procedimento de registro de retratação de um artigo publicado pela Brazilian Dental Journal é iniciado após o recebimento de comunicação formal ao Editor-chefe da revista, através do e-mail [sousane@fhop.usp.br](mailto:sousane@fhop.usp.br), que comunicará a SciELO. A comunicação deve vir acompanhada do texto de retratação informando os motivos pelos quais o artigo sofrerá retratação. O artigo retratado não será suprimido do veículo onde foi originalmente publicado. Na versão XML, para os casos de retratação total, ficará publicada somente o texto da retratação com a justificativa encaminhada pelo editor e os dados básicos do artigo, como: título, autor, afiliação e resumo. Para retratação parcial, apenas será suprimido a parte na qual se identificou o problema. Em ambos os casos, o PDF original é mantido, mas com o texto da retratação agregado antes do texto completo original e com tarjas de marca d'água que o identificam como artigo retratado.



#### Publicação de Adendo

A publicação de um Adendo é realizada nos casos em que não há correções de texto ou ativos digitais, mas quando ocorre a inclusão de informação sobre um documento já publicado. Os adendos não contradizem a publicação original e não são usados para corrigir erros, devem ser utilizados quando a adição da informação for benéfica para a compreensão do leitor sobre uma parte significativa da contribuição publicada. Os adendos podem ser revisados por pares, de acordo com a política editorial da revista. Todos os adendos são vinculados com link ao artigo publicado ao qual se relacionam. Neste caso as informações adicionadas não são inseridas efetivamente no documento já publicado como ocasionalmente ocorre com a errata, por exemplo. O procedimento para publicação de adendo segue a orientação das bases internacionais e visa preservar o registro original do manuscrito informando, todavia sobre eventuais adições. O processo de publicação de um adendo pode ser iniciado por uma comunicação ao Editor-chefe da revista Brazilian Dental Journal, através do e-mail [sousane1@forp.usp.br](mailto:sousane1@forp.usp.br), que comunicará a SciELO informando sobre a necessidade do adendo em um artigo já publicado.

#### Guia de boas práticas para o fortalecimento da ética na publicação científica

A Brazilian Dental Journal segue o guia de boas práticas para o fortalecimento da ética na publicação científica padrão para todos os periódicos das coleções da Rede SciELO. O programa SciELO segue normas e recomendações de padrões de ética e responsabilidade na comunicação científica estabelecidas pelas instituições nacionais e internacionais, entre as quais se destacam: COPE, CSE, Equator Network, ICMJE, CNPq, Fapesp e o Manual de Boas Práticas para o Fortalecimento da Ética na Publicação Científica do SciELO. Este guia promove a integridade e transparência no processo de avaliação de manuscritos e na reprodutibilidade da pesquisa, sobre a ocorrência de manipulação ou invenção de dados, a cópia não referenciada de dados ou do texto de outro autor, a duplicidade da publicação do mesmo texto ou de pesquisa, conflitos de interesse ou de autoria. Tudo o que é publicado no periódico, assim como as ações corretivas que se façam necessárias, são de responsabilidade do editor chefe. Nesse sentido, este guia explicita conceitos e ações que promovem a integridade no processo de publicação e encaminhamentos em casos de suspeita ou de comprovação de má conduta. Maiores informações podem ser obtidas através do contato formal com o Editor-chefe da revista, através do e-mail: [sousane1@forp.usp.br](mailto:sousane1@forp.usp.br).

#### Forma e preparação de manuscritos

##### AS NORMAS DESCRITAS A SEGUIR DEVERÃO SER CRITERIOSAMENTE SEGUIDAS.

#### Geral

- Submeter o manuscrito em Word e em PDF, composto pela página de rosto, texto, tabelas, legendas das figuras e figuras (fotografias, micrografias, desenhos esquemáticos, gráficos e imagens geradas em computador, etc).
- O manuscrito deve ser digitado usando fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margens de 2,5 cm em todos os lados. **NÃO UTILIZAR** negrito, marcas d'água ou outros recursos para tornar o texto visualmente atrativo.
- As páginas devem ser numeradas sequencialmente, começando no Summary.
- Trabalhos completos devem estar divididos sequencialmente conforme os itens abaixo:
  1. Página de Rosto
  2. Summary e Key Words
  3. Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão
  4. Resumo em Português (*obrigatório* apenas para os autores nacionais)
  5. Agradecimentos (se houver)
  6. Referências
  7. Tabelas
  8. Legendas das Figuras
  9. Figuras
- Todos os títulos dos capítulos (Introdução, Material e Métodos, etc) em letras maiúsculas e sem negrito.
- Resultados e Discussão **NÃO** podem ser apresentados conjuntamente.
- Comunicações rápidas e relatos de casos devem ser divididos em itens apropriados.
- Produtos, equipamentos e materiais: na primeira citação mencionar o nome do fabricante e o local de fabricação completo (cidade, estado e país). Nas demais citações, incluir apenas o nome do fabricante.
- Todas as abreviações devem ter sua descrição por extenso, entre parênteses, na primeira vez em que são mencionadas.

#### Página de rosto

- A primeira página deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, nome dos autores (máximo 6), Departamento, Faculdade e/ou Universidade/Instituição a que pertencem (incluindo cidade, estado e país) **NÃO INCLUIR** titulação (DDB, MSc, PhD etc) e/ou cargos dos autores (Professor, Aluno de Pós-Graduação, etc).
- Incluir o nome e endereço **completo** do autor para correspondência (**informar e-mail, telefone e fax**).
- A página de rosto deve ser incluída em arquivo separado do manuscrito.

#### Manuscrito

- A primeira página do manuscrito deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, sem o nome dos autores.

#### Summary

- A segunda página deve conter o Summary (resumo em Inglês: máximo 250 palavras), em redação contínua, descrevendo o objetivo, material e métodos, resultados e conclusões. Não dividir em tópicos e não citar referências.
- Abaixo do Summary deve ser incluída uma lista de Key Words (5 no máximo), em letras minúsculas, separadas por vírgulas.

### Introdução

- Breve descrição dos objetivos do estudo, apresentando somente as referências pertinentes. Não deve ser feita uma extensa revisão da literatura existente. As hipóteses do trabalho devem ser claramente apresentadas.

### Material e métodos

- A metodologia, bem como os materiais, técnicas e equipamentos utilizados devem ser apresentados de forma detalhada. **Indicar os testes estatísticos utilizados neste capítulo.**

### Resultados

- Apresentar os resultados em uma sequência lógica no texto, tabelas e figuras, enfatizando as informações importantes.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto.
- Tabelas e figuras devem trazer informações distintas ou complementares entre si.
- Os dados estatísticos devem ser descritos neste capítulo.

### Discussão

- Resumir os fatos encontrados sem repetir em detalhes os dados fornecidos nos Resultados.
- Comparar as observações do trabalho com as de outros estudos relevantes, indicando as implicações dos achados e suas limitações. Citar outros estudos pertinentes.
- Apresentar as conclusões no final deste capítulo. Preferencialmente, as conclusões devem ser dispostas de forma corrida, isto é, evitar citá-las em tópicos.

### Resumo (em Português) - Somente para autores nacionais

O resumo em Português deve ser **IDÊNTICO** ao resumo em inglês (Summary). OBS: **NÃO COLOCAR** título e palavras-chave em Português.

### Agradecimentos

- O Apoio financeiro de agências governamentais deve ser mencionado. Agradecimentos a auxílio técnico e assistência de colaboradores podem ser feitos neste capítulo.

### Referências

- As referências devem ser apresentadas de acordo com o estilo do **Brazilian Dental Journal (BDJ)**. É recomendado aos autores consultar números recentes do BDJ para se familiarizar com a forma de citação das referências.
- As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto e citadas entre parênteses, sem espaço entre os números: (1), (3,5,8), (10-15). **NÃO USAR SOBRESCRITO**.
- Para artigos com dois autores deve-se citar os dois nomes sempre que o artigo for referido. Ex: "According to Santos **and** Silva (1)..." Para artigos com três ou mais autores, citar apenas o primeiro autor, seguido de "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."
- Na lista de referências, os nomes de **TODOS OS AUTORES** de cada artigo devem ser relacionados. Para trabalhos com 7 ou mais autores, os 6 primeiros autores devem ser listados seguido de "et al."
- A lista de referências deve ser digitada no final do manuscrito, em sequência numérica. Citar **NO MÁXIMO 25 referências**.
- A citação de abstracts e livros, bem como de artigos publicados em revistas não indexadas deve ser evitada, a menos que seja absolutamente necessário. **Não citar referências em Português.**
- Os títulos dos periódicos devem estar abreviados de acordo com o Dental Index. O estilo e pontuação das referências devem seguir o formato indicado abaixo.

### Tabelas

- As tabelas com seus respectivos títulos devem ser inseridas após o texto, numeradas com algarismos arábicos; **NÃO UTILIZAR** linhas verticais, negrito e letras maiúsculas (exceto as iniciais).
- O título de cada tabela deve ser colocado na parte superior.
- Cada tabela deve conter toda a informação necessária, de modo a ser compreendida independentemente do texto.

### Figuras

- **NÃO SERÃO ACEITAS FIGURAS INSERIDAS EM ARQUIVOS ORIGINADOS EM EDITORES DE TEXTO COMO O WORD E NEM FIGURAS EM POWER POINT.**
- Os arquivos digitais das imagens devem ser gerados em Photoshop, Corel ou outro software similar, com extensão TIFF e resolução mínima de 300 dpi. Apenas figuras em **PRETO E BRANCO** são publicadas. Salvar as figuras no CD-ROM.
- Letras e marcas de identificação devem ser claras e definidas. Áreas críticas de radiografias e fotomicrografias devem estar isoladas e/ou demarcadas.
- Partes separadas de uma mesma figura devem ser legendadas com letras **maiúsculas** (A, B, C, etc.). Figuras simples e planchas de figuras devem ter largura mínima de 8 cm e 16 cm, respectivamente.
- As legendas das figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos e apresentadas em uma página separada, após a lista de referências (ou após as tabelas, quando houver).



