



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Carolina Santezi Neto

**Eficácia da inativação fotodinâmica
mediada pela curcumina em diferentes
formulações sobre biofilme e efeito nas
propriedades de materiais
restauradores resinosos e esmalte
dental**

Araraquara

2016



Carolina Santezi Neto



**EFICÁCIA DA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA
MEDIADA PELA CURCUMINA SOBRE BIOFILME E
EFEITO NAS PROPRIEDADES DE MATERIAIS
RESTAURADORES RESINOSOS E
ESMALTE DENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

**Orientadora: Prof^a.Dr^a. Livia Nordi Dovigo
Co-Orientadora: Prof^a.Dr^a. Patrícia P.N.S. Garcia**

Araraquara

2016

Neto, Carolina Santezi

Eficácia da inativação fotodinâmica mediada pela Curcumina em diferentes formulações sobre biofilme e efeito nas propriedades de materiais restauradores resinosos e esmalte dental / Carolina Santezi Neto .-- Araraquara: [s.n.], 2016.

162 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra Lívia Nordi Dovigo

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia

1. Cárie dentária 2. Curcumina 3. Fotoquimioterapia 4. Placa dentária 5. Materiais dentários I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

CAROLINA SANTEZI NETO

Eficácia da inativação fotodinâmica mediada
pela curcumina em diferentes formulações sobre
biofilme e efeito nas propriedades de materiais
restauradores resinosos e esmalte dental

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de doutor

Presidente e Orientadora: Prof^a. Dr^a. Livia Nordi Dovigo

2ºExaminador: Prof^o. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3ºExaminador: Prof^a. Dr^a. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

4ºExaminador: Prof^a. Dr^a. Carla Raquel Fontana Mendonça

5ºExaminador: Prof^o. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara, 05 de agosto de 2016.

Dados Curriculares

Carolina Santezi Neto

NASCIMENTO	24/04/1981 - São Carlos, São Paulo
FILIAÇÃO	José Antonio Neto Ângela Maria Santezi Neto
2001 a 2004	Curso de Graduação pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2005 a 2005	Aperfeiçoamento em Odontologia para Bebês (216 horas) – Bebê Clínica, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP/FOA.
2008 a 2010	Aperfeiçoamento/ Estágio em Laserterapia no Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Biofotônica da Universidade de São Paulo (320 horas).
2010 a 2010	Aperfeiçoamento Profissional na Disciplina de Dentística II do Departamento de Odontologia Restauradora na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP/FOAr (270 horas).
2010 a 2012	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Dentística Restauradora, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2010 a 2014	Estágio de docência nas Disciplinas de Dentística Restauradora I e II, do Departamento de Odontologia Restauradora.
2014 a 2016	Estágio de docência na Disciplina de Bioestatística.

2015 a 2016

Especialização em "Informática em Saúde" pela UNIFESP.

2012 a 2016

Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Dentística Restauradora, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

“Knowledge is a treasure, but practice is the key to it. Do the difficult things while they are easy and do the great things while they are small. The journey of a thousand miles must begin with a single step. Watch your step.”

(Lao Tzu)

*“The struggles I'm facing
The chances I'm taking
Sometimes might knock me down
But no, I'm not breaking
I may not know it
But these are the moment that I'm gonna remember most and
Just gotta keep going...
...And I, I got to be strong
Just keep pushing on, cause

There's always gonna be another mountain
I'm always gonna want to make it move
Always gonna be an uphill battle
Sometimes I'm going to have to lose
Ain't about how fast I get there
Ain't about what's waiting on the other side
It's the climb...
...Keep on moving
Keep climbing
Keep the faith
Baby...
...It's all about the climb
Keep the faith...”*

(The Climb - Miley Cyrus)

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À *Deus*

Por ter me agraciado com Seu infinito e verdadeiro amor, sendo
meu alicerce e meu porto seguro desde o amanhecer até o
anoitecer.

Agradeço, sobretudo, por permitir que eu pertencesse à família a
que pertenço e pela oportunidade de estar neste mundo
aprendendo e querendo cada vez mais vivenciar a Sua palavra,
trilhando o caminho que o Senhor escolheu para mim. Agradeço
ainda por fortificar minha Fé nos momentos em que fraquejei,
lembrando-me sempre de que o Senhor é o

Caminho a Verdade e a Vida.

Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de

Deus em Cristo Jesus para convosco.

(1 Ts 5:18)

Dedico este trabalho...

Aos meus amados pais, *José e Ângela*

Que, por muitas vezes, deixaram de fazer por vocês para fazerem por mim,
me proporcionado o necessário para que hoje eu estivesse aqui nesse
inesquecível momento da minha vida.

Agradeço, acima de tudo e imensamente, por terem me ensinado o que realmente é importante para trilhar a caminhada da vida, e espero, do fundo do meu coração, que eu seja capaz de transmitir a sabedoria de vocês para meus futuros filhos. Agradeço ainda pelo amor incondicional e pelas broncas recebidas! Se hoje sou quem sou, foi simplesmente porque tiveram discernimento para me dizerem “não” quando este era, de fato, importante. Pai, tenho a mais plena certeza de que, daí de cima, está feliz por mais essa conquista!!!! Mãe, obrigada por me ensinar a ser forte, por estar do meu lado com o seu abraço carinhoso em todos os momentos da minha vida. Vocês são insubstituíveis.

“Amo vocês daqui até a lua, ida e volta, infinitas vezes.”

“Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato.”

(Ho'oponopono)

Dedico este trabalho...

Ao meu noivo e quase marido, *Mauricio*

Que ao entrar em minha vida trouxe consigo o seu jeito doce e carinhoso de me mostrar o amor e de me fazer te amar infinitamente.

Te amo por ser esse homem “à moda antiga” que me respeita, que me compreende e que é meu melhor amigo. Desejo que eu possa caminhar contigo o mesmo caminho, que meus passos estejam sempre ao lado dos teus e que tuas mãos não soltem as minhas. Desejo ainda, que a nossa vida possa se resumir em felicidade apesar de todos os pesares e que o meu lugar seja sempre ao lado teu. Obrigada por ser meu “porto seguro” e não deixar que eu desistisse dos meus sonhos quando estes pareciam distantes em demasia. Se hoje aqui estou, muito é em virtude de seus conselhos e de seu apoio.

Por isso, dedico esse trabalho a você, amor da vida...

Essa conquista é nossa! Te amo para sempre!

"I got all I need when I got you and I,

I look around me, I see a sweet life...

Kick start my heart when you shine it in my eyes,

Can 't lie, it 's a sweet life...

Cause you 're my flashlight,

My flashlight..."

(Flashlight - Jessie J)

Agradecimentos Especiais

À minha querida orientadora, Prof^a. Dr^a. *Livia Nardi Davigo*.

Agradeço imensamente por toda confiança em mim depositada, pelas oportunidades a mim oferecidas e por ter participado integral e ativamente de todas as fases da execução dessa pesquisa. Quero agradecer por ter sido não somente minha Orientadora, mas sim minha “Teacher”, me ensinando cuidadosa e carinhosamente o caminho para que eu me tornasse, além de pesquisadora, uma Professora e futura Orientadora. Seu exemplo foi muito importante para minha formação não somente no campo profissional. Quero ressaltar sobretudo que nossa agradável convivência aumentou ainda mais a admiração e o respeito que sinto por você desde o meu mestrado, quando somente a conhecia pelos seus artigos. Além de uma excelente Orientadora, eu tive uma amiga e sinto que ganhei uma amiga. Sou grata por Deus ter te colocado em minha vida!

À querida Prof^a. Dr^a. *Patrícia Petromilli N. S. Garcia*.

Agradeço profundamente por ter contribuído durante a realização desse estudo. Sou grata por todo o conhecimento científico transmitido a mim e por todo o conhecimento de vida comigo compartilhado. Sem saber, me auxiliou em inúmeros momentos da minha caminhada. Seu modo de ver e viver a vida serviram como inspiração para que eu estivesse sempre em busca do equilíbrio e hoje “respiro” e vivo “um dia de cada vez”.

“Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato.” (Ho’oponopono)

Ao Prof. Dr. *Marlus Chorilli.*

Agradeço pela ajuda na busca por novas formulações para a curcumina e por sua participação nas discussões dos resultados, fundamentais para a realização desse estudo.

Ao Prof. Dr. *Osmir Baptista de Oliveira Júnior.*

Agradeço por ter me apresentado e me colocado no caminho da Prof^a. Dr^a. Livia e por todo o suporte proporcionado para a execução desse estudo. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. *Vanderlei Salvador Bagnato.*

Muito obrigada pelas oportunidades a mim oferecidas no grupo de Óptica, por ter cedido inúmeras vezes os laboratórios para realização de parte desse estudo e por todo o auxílio prestado. Agradeço ainda por manter as portas do grupo de Biofotônica sempre abertas.

Sou grata!

À Prof^a Dr^a. *Juliana A. D. Bonini Campos,*

por estar disponível e ter me auxiliado nos momentos em que precisei.

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Aos

*Professores da Disciplina de Dentística
Restauradora,*

meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento, pela confiança depositada, pelos ensinamentos frequentes e pelo apoio com que me auxiliaram ao longo do curso de pós-graduação. Em especial, sou grata ao Prof. Marcelo e ao Prof. “Edinho” por terem permitido que eu acompanhasse o curso de atualização em Dentística pela FAEPO gratuitamente e pudesse transmitir os conhecimentos adquiridos aos alunos da fundação, me proporcionando uma linda e inspiradora experiência de docência.

Aos

Professores do Departamento de Odontologia Social,

meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento, pela confiança depositada, pelos ensinamentos frequentes e pelo apoio com que me auxiliaram ao longo do curso de pós-graduação. Em especial, sou grata à Profª. Patrícia e à minha orientadora Profª. Livia por todo o suporte a mim destinado.

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Aos

Professores do Departamento de Prótese Dentária,

meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento, pela confiança depositada, pelos ensinamentos frequentes e pelo apoio com que me auxiliaram ao longo do curso de pós-graduação. Em especial, sou grata ao Prof. Dr Francisco de Assis Mollo Júnior por ter permitido que grande parte da minha pesquisa fosse realizada no departamento, ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani e ao Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima por terem me acolhido no grupo de Microbiologia Aplicada. Agradeço ainda à Prof^a. Dr^a. Marlise Inêz Klein Furlan por ter me cedido as cepas microbianas utilizadas na pesquisa e por todo o suporte a mim concedido para que a pesquisa fluísse de modo menos difícil.

À amiga e companheira de laboratório

Sarah Raquel de Annunzio,

o meu muito obrigada por ter me auxiliado ativamente no preparo dos materiais utilizados na primeira fase da minha pesquisa! Ambas sabemos o quão árduo foi a realização dessa etapa! Muito obrigada por estar sempre disposta e por ter se comprometido tanto com a pesquisa. Agradeço sobretudo pelos momentos divertidos que compartilhamos, por inúmeras vezes ter me cedido um teto para posar em Araraquara e, principalmente, por essa doce amizade que surgiu e floresceu entre nós!

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Às técnicas do laboratório de Microbiologia Aplicada

Erica, Raíssa, Sarah, Geisiane e Bruna

o meu muito obrigada por todo o suporte durante a execução da minha pesquisa!
Agradeço ainda por tanto me ensinarem durante a nossa convivência. Que Deus ilumine
sempre o caminho de vocês e que o Espírito Santo lhes dê sabedoria para tomarem as
melhores decisões.

Às alunas de Iniciação Científica

*Gabriela Albulquerque, Bárbara Reina e
Lorena Campos,*

o meu muito obrigada por terem me auxiliado durante as três diferentes fases da minha
pesquisa! Muito obrigada por estarem sempre dispostas. Quero agradecer ainda pelos
momentos divertidos que compartilhamos! Que Deus ilumine sempre o caminho de vocês
e que o Espírito Santo lhes dê sabedoria para tomarem as melhores decisões.

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Aos queridos colegas de Pós Graduação,

Janaína Bortolatto, Cristina Presoto, Héli da Barud, Camila Lorenzetti, Kamila Figueiredo, Fernanda Jassé, Mateus Tonetto, Thiago Porto, Hercules Dias, Fernanda Bonafé, Moema Santana, Fernanda Mauricio, Fernanda Rocha, Keren Basso, Wanderson Roberto, Tamara Trevisan, Vanessa Vaz, Fabrício Amaral, Danielle Wanjngarten, Camila Foggi, Jéssica Bernegossi, Paula Tamião, Bia Panariello, Midian Castilho, Jefferson Trigo e toda turma do lab de micro,

muito obrigada pela convivência sempre alegre e agradável, pelo companheirismo, incentivo e pela amizade durante esses anos.

Às colegas de Pós-Graduação,

Giovana Calixto, Maíra Gonçalves e Camila Rodero

muito obrigada por terem manipulado as formulações utilizadas nessa pesquisa e por todo o auxílio prestado.

Aos voluntários da pesquisa,

muito obrigada pela boa vontade em colaborar e por cederem seu tempo para que parte dessa pesquisa pudesse ser realizada. Sabemos que usar um dispositivo intrabucal não é muito confortável!! Obrigada de coração!

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Aos funcionários dos Departamentos de Dentística, Odontologia Social e Prótese,

*Creuza, Dona Cida, Alessandra, Marinho, Vanderlei, Neli, Glaucia e
Martinha*

muito obrigada por todo apoio, carinho e atenção.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação,

Alexandre e Cristiano,

muito obrigada por serem sempre disponíveis, solícitos no esclarecimento das dúvidas e
pela atenção e paciência.

Aos funcionários da biblioteca,

*Adriano, Maria Inês, Silvia, Eliane, Ceres, Cristina, Marley, Maria
Aparecida e Odete,*

muito obrigada pela receptividade, orientação e disponibilidade.

Aos porteiros,

que nos recebem todos os dias com bom humor e um sorriso no rosto. Em especial, meu
muito obrigada ao “Paulinho”, ao “Romarinho” e ao “Rodrigo”.

“Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato.” (Ho’oponopono)

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas,
representado pelo *Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e pela Profª Drª*
Alessandra Nara de Souza Rastelli

muito obrigada pela oportunidade.

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

muito obrigada por dar todo o suporte financeiro necessário para a realização dessa
pesquisa (Processo FAPESP: 2013/15770-6).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e conclusão desse
trabalho,

O meu “muito obrigada”!!!!

"Sinto muito. Me perdoe. Te amo. Sou grato." (Ho'oponopono)

Santezi C. Eficácia da inativação fotodinâmica mediada pela curcumina em diferentes formulações sobre biofilme e efeito nas propriedades de materiais restauradores resinosos e esmalte dental [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Resumo

A formação de biofilmes em dentes e mucosas é considerada principal fator associado ao desenvolvimento de infecções bucais. Antimicrobianos tópicos, como a clorexidina (CLX), são utilizados para descontaminação de lesões cariosas, bolsas periodontais, e descontaminação bucal previamente a procedimentos cirúrgicos, porém podem promover efeitos adversos, além da possibilidade de promover resistência nos micro-organismos (MOs). Dessa forma, a busca por tratamentos antimicrobianos alternativos, como a Inativação Fotodinâmica (PDI) é muito relevante nas ciências odontológicas. Estudos prévios sugeriram que a curcumina (CUR) pode ser um promissor fotossensibilizador para PDI, porém existem ainda alguns aspectos que precisam ser mais bem avaliados. Assim, o presente estudo avaliou a eficácia da PDI mediada pela CUR para eliminação do biofilme dental e a existência de possíveis efeitos que essa terapia pode promover sobre algumas propriedades de materiais restauradores e superfície dental. O projeto foi dividido em três estudos consecutivos sendo que o Estudo 1 avaliou a eficácia da PDI utilizando diferentes formulações de CUR (líquida – DMSO a 10%; microemulsão eumulgin, hidrogel quitosana e microemulsão ácido oleico) sobre biofilmes mono-espécie de *Streptococcus mutans* (UA 159 ATCC 700610; Sm), *Lactobacillus casei* (ATCC 4646; Lc) e *Candida albicans* (ATCC 90028; Ca) formados in vitro. Previamente à realização dos tratamentos, a análise da taxa de fotodegradação das diferentes formulações e concentrações (20, 40, 60 e 80 µM) de CUR nos sistemas de hidrogel foi realizada e os resultados mostraram que, para o tempo de PDI proposto, as únicas formulações em hidrogel que poderiam ser utilizadas seriam a de quitosana ($R^2=0,989$) e a de ácido oleico ($R^2=0,976$), ambas na concentração de 80 µM. Em seguida a padronização da concentração celular de cada espécie foi estabelecida para o crescimento do biofilme e os seguintes grupos de tratamento foram testados para todas as formulações e espécies microbianas avaliadas: C-L- (CUR e luz ausentes; controle negativo), C-L+ (CUR ausente e luz presente - 18J/cm²; LED azul), C+L- (CUR presente e luz ausente) e

C+L+ (CUR e luz presentes; PDI). Os dados passaram por análise descritiva e análise inferencial (ANOVA two way seguida do pós- teste Games Howell), indicando que o efeito da formulação, do tratamento e da interação entre eles foi altamente significativo ($p < 0,0001$) para as três espécies testadas, sendo os grupos PDI mediados pela formulação veiculada em DMSO os que evidenciaram maior ação antimicrobiana para todos os MOs avaliados. Dentre as formulações em hidrogel, aquela que promoveu efeito antimicrobiano foi a veiculada no sistema denominado hidrogel ácido oleico, sendo essa a formulação de escolha para a realização dos estudos subsequentes. O Estudo 2 avaliou o efeito da PDI mediada pela CUR veiculada no sistema denominado hidrogel ácido oleico sobre a estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de corpos de prova confeccionados em esmalte dental bovino e resinas compostas. Os grupos de tratamento avaliados foram CN (controle negativo), AcO (controle positivo) e PDI. Os dados foram analisados descritivamente e, em seguida, análise inferencial (ANOVA de medidas repetidas mista seguida por pós-teste de Sidak para as variáveis “estabilidade de cor” e “microdureza” e Games Howell para a “rugosidade superficial”) foi realizada para as três variáveis, sendo considerado para a “estabilidade de cor” somente dois momentos de leitura (imediatamente e 60 dias após os tratamentos) e para as variáveis “microdureza” e “rugosidade superficial” as leituras efetuadas anteriormente aos tratamentos e 60 dias após a realização deles. Os resultados da ANOVA mostraram que para a variável “estabilidade de cor”, os fatores “tempo”, “tratamento”, “resina” e “interação entre eles” foram significativos ($p \leq 0,021$), sendo que de forma geral essa alteração foi maior nas leituras efetuadas no tempo “60 dias após os tratamentos”. Para a variável microdureza superficial, com exceção dos fatores “tempo x tratamento” e “tratamento”, todos os outros se mostraram significativos ($p < 0,001$), evidenciando que a PDI para as resinas TPH e AML não promoveu qualquer efeito deletério sobre essa propriedade; por outro lado, para a resina Z350, na leitura realizada no tempo “60 dias após os tratamentos”, houve redução da dureza quando comparada com os grupos CN e AcO, sugerindo efeito negativo da terapia sobre a microdureza. A ANOVA mostrou que o fator “tempo” não foi significativo ($p = 0,991$), tendo sido significativo somente os fatores “superfície”, “tratamento” e “superfície x tratamento” ($p < 0,001$). Além disso, foi possível verificar com os resultados que a rugosidade superficial das resinas TPH e Z350 não foi alterada,

enquanto que a rugosidade da resina AML foi reduzida após realização dos tratamentos. Diferentemente, para os corpos de prova confeccionados em esmalte dental bovino, as três variáveis investigadas não sofreram qualquer efeito negativo frente à realização dos tratamentos, tendo sido significativo somente o fator “tempo” ($p \leq 0,002$). O Estudo 3, piloto, avaliou a eficácia do protocolo de PDI previamente estabelecido sobre biofilmes multiespécies formados sobre blocos de esmalte dental bovino in situ. Para isso, após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa desta faculdade, 7 voluntários foram selecionados, moldados para confecção de dispositivo intra-bucal e orientados quanto ao uso do aparelho para formação do biofilme (48 horas). A etapa microbiológica consistiu na remoção dos blocos de esmalte do dispositivo, realização dos tratamentos (C+L+ e C-L-) e quantificação das células viáveis em meios de cultura específicos para Sm, Lc, *Candida* spp e em meio inespecífico para crescimento de MOs em geral. Os dados foram tratados e a análise inferencial (MANOVA seguida de ANOVA a um fator) demonstrou que o fator “grupo de tratamento” foi altamente significativo ($p < 0,001$) sobre a viabilidade microbiana, sendo observado eficácia da PDI sobre Sm e MOs em geral. Desse modo, conclui-se que embora a eficácia da PDI mediada pela CUR para redução de biofilmes formados in vitro tenha sido comprovada, esta se encontra diretamente relacionada ao tipo de veículo usado para a solubilização do fotossensibilizador. Além disso, o protocolo “CUR a 80 μ M veiculada em hidrogel ácido oleico associada à dose de 18J/cm² com tempo de pré-irradiação de 5 minutos” se mostrou eficaz para a redução quantitativa de Sm e MOs em geral de biofilmes crescidos in situ e não apresentou qualquer efeito deletério na estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de esmalte dental bovino. Em contrapartida, para algumas resinas, efeitos negativos sobre essas propriedades foram observados. Assim, o uso desse protocolo parece ser seguro sobre superfícies de esmalte dental, enquanto que para resinas, uma avaliação criteriosa previamente ao uso deve ser realizada, entretanto mais investigações são necessárias para melhor compreensão dos achados.

Palavras-chaves: Cárie dentária. Curcumina. Fotoquimioterapia. Placa dentária. Materiais dentários.

Santezi C. Efficacy of Curcumin-mediated photodynamic inactivation against dental biofilms and evaluation of possible changes on the properties of composite resins and dental surface. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Abstract

Formation of dental biofilm is the main factor associated to development of oral infections. Although topic antimicrobials, such as chlorhexidine (CHX), have been used to decontaminate the oral surfaces, they may promote adverse effects on hard and soft tissues as well as the possibility of promoting microbial resistance. Thus, the investigation of alternative antimicrobial treatments, such the Photodynamic Inactivation (PDI), is relevant to dental sciences. Previous research suggested that the curcumin (CUR) might be a promising photosensitizer for PDI, but there are some aspects that need to be better evaluated. The aim of this study was to assess the efficacy of CUR-mediated PDI against dental biofilms and the existence of possible negative effects of PDI on the properties of composite resins and dental surface. The research was divided into 3 consecutive studies. The study 1 aimed to evaluate the PDI efficacy using different CUR formulations (liquid – DMSO (dimethylsulfoxide) at 10%; eumulgin hydrogel, chitosan hydrogel and oleic acid hydrogel) on mono-species biofilm of *Streptococcus mutans* (UA 159 ATCC 700610; Sm), *Lactobacillus casei* (ATCC 4646; Lc) and *Candida albicans* (ATCC 90028; Ca) formed in vitro. Prior to the execution of the treatments, the photodegradation rate of each formulation in concentrations 20, 40, 60 and 80 μM was performed and the results showed that the chitosan hydrogel ($R^2=0,989$) and oleic acid hydrogel ($R^2=0,976$) were able to be used in the tests, both at 80 μM . Then, cell concentration of each species was standardized in order to the grow biofilm and the following treatment groups were tested for all formulations and evaluated species: C-L- (no CUR and light; negative control), C-L+ (no CUR and with light - 18J/cm²; blue LED), C+L- (with CUR and no light) and C+L+ (with both CUR and light; PDI). Data were analyzed descriptively and inferential analysis (two-way ANOVA followed by Games Howell test) indicated that the effect of the formulation, treatment and the interaction between them was highly significant ($p < 0,0001$) for the three species tested,

and the PDI groups mediated by the formulation of DMSO at 10% presented the best antimicrobial activity for all evaluated microorganisms (MOs). Among the hydrogel formulations, oleic acid hydrogel promoted antimicrobial effect, thus it was selected for conducting subsequent studies. Study 2 evaluated the effect of PDI-mediated CUR carried in a system called hydrogel oleic acid on the stability of color, hardness and surface roughness of specimens made of bovine enamel and composite resins. The treatment groups evaluated were CN (negative control), AcO (positive control) and PDI. Data were analyzed descriptively and then, inferential analysis (ANOVA mixed repeated measures followed by Sidak post-test for variables "color stability" and "microhardness"; Games and Howell for "surface roughness") was performed. However, to do the analysis for the "color stability" variable, it was considered only 2 moments of color measurement (immediately and 60 days after treatment). In the same way, the measurements for "hardness" and "surface roughness" were assessed prior to treatment and 60 days after performing them. To the "color stability" variable, the ANOVA results showed that the factors "time", "treatment", "resin" and "interaction between them" were significant ($p \leq 0.021$) on the color change of resins, and, in general, this change was greater in the measurements assessed in time "60 days after the treatments". For the microhardness variable, except the factors "time x treatment" and "treatment", all others were significant ($p < 0.001$), showing that PDI for TPH and AML resins did not cause any deleterious effect on this property. On the other hand, for the resin Z350, the measurements performed at time "60 days after the treatment", showed a reduction in hardness values compared to the values found in CN and AcO groups, suggesting that PDI promoted a negative effect on the hardness. ANOVA showed no significance on factor "time" ($p = 0.991$), but it showed that the factors "surface", "treatment" and "treatment x area" was significant ($p < 0.001$). In addition, results showed that the surface roughness of TPH and Z350 resins did not change, while the AML was reduced after both treatments. Differently, for the specimens prepared with dental enamel, the three investigated variables did not suffer any negative effect after the treatments, and the factor "times" was the only one considered significant ($p \leq 0.002$). Study 3, a pilot, evaluated the effectiveness of the PDI protocol previously established on multi-species biofilms formed on bovine enamel blocks in situ. For this, after approval by the ethics committee in

research of this faculty, 7 volunteers were selected and impressions were taken for making intra-oral device. They also were instructed on the use of the device for biofilm formation (48 hours). Microbiological step consisted in removal of enamel blocks of the device, application of the treatments (C+L+ and C-L-) and quantification of viable cells in specific culture media for Sm, Lc, *Candida* spp and unspecific media for MOs general growth. The data were processed and inferential analysis (MANOVA followed by ANOVA by a factor) showed that the factor "treatment group" was highly significant ($p < 0.001$) on Sm and general MOs viability. Thus, in conclusion, although the efficacy of PDI mediated by CUR in order to reduce biofilms formed in vitro has been established, the efficacy is directly related to the type of vehicle used for solubilization of the photosensitizer. Furthermore, the protocol "CUR at 80 μM carried by hydrogel oleic acid associated with fluence of $18\text{J}/\text{cm}^2$ with pre-irradiation time of 5 minutes" was effective for the quantitative reduction of Sm and MOs in general of the biofilms which grown in situ and showed no deleterious effect on color stability, hardness and surface roughness of tooth enamel. However, for some resins, negative effects on these properties were observed. Thus, the use of this protocol appears to be safe on surfaces of enamel, while for resins, a careful evaluation prior to use should be made. Thus, more investigations are necessary in order to better understand the findings.

Key words: Curcumin. Dental Caries. Dental Materials. Dental Plaque. Photochemotherapy.

Lista de Abreviaturas e Siglas

1.	Curcumina	CUR
2.	MCUR	Mistura de curcumina e curcuminóides
3.	CLX	Clorexidina
4.	UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
5.	Log ₁₀	Logarítimo na base de 10
6.	DMSO	Dimetilsulfóxido
7.	RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
8.	BHI	Ágar Brain Heart Infusion
9.	MRS	Ágar Man Rogosa Sharpe
10.	Mitis	Ágar Mitis Salivarius
11.	SDA	Ágar sabouraud dextrose
12.	PBS	Tampão fosfato salino
13.	SSE	Solução salina estéril
14.	MOs	Micro-organismos
15.	Sm	<i>Streptococcus mutans</i>
16.	Ca	<i>Candida albicans</i>
17.	Lc	<i>Lactobacillus casei</i>
18.	PI	Pré-inóculo
19.	I	Inóculo
20.	DO	Densidade Óptica
21.	G	Força G
22.	cps	Corpos de Provas
23.	Cdam	Conjunto dente-aparato de madeira

24.	PDI	Inativação Fotodinâmica
25.	C+L+	Curcumina e luz presentes
26.	C+L-	Curcumina presente e luz ausente
27.	C-L+	Curcumina ausente e luz presente
28.	C-L-	Curcumina e luz ausentes
29.	CN	Controle negativo
30.	AcO	Controle positivo
31.	LED	Diodo Emissor de Luz
32.	FS	Fotossensibilizador
33.	PIT	Tempo de pré- irradiação
34.	AML	Resina Composta Amelogem
35.	A	Previamente aos tratamentos
36.	60d	60 dias após os tratamentos
37.	$\bar{x}$	Média
38.	dp	Desvio Padrão
39.	IC _{95%}	Intervalo de Confiança
40.	p	Valor de probabilidade
41.	η^2_p	<i>Effect Size</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	34
3 PROPOSIÇÃO	59
4 MATERIAL E MÉTODO	60
4.1 Estudo 1	60
4.2 Estudo 2	72
4.3 Estudo 3	90
5 RESULTADO	97
5.1 Estudo 1	97
5.2 Estudo 2	107
5.3 Estudo 3	120
6 DISCUSSÃO	123
7 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	136
ANEXOS	152
ANEXO A	152
ANEXO B	153
ANEXO C	156

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal do ser humano hospeda mais de 700 espécies de micro-organismos incluindo bactérias e fungos ⁶. Alguns desses micro-organismos colonizam as estruturas dentais e protéticas por meio da formação de biofilme, principal fator associado ao desenvolvimento de infecções bucais ^{7, 12, 35, 41, 52-54, 69, 92, 141, 145, 148-149}. Os biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície, organizados em camadas de células e envoltos em uma matriz polimérica extracelular ^{35, 41, 69, 92, 102-103, 141, 148}. De forma geral, a organização dos micro-organismos em biofilme provoca uma diminuição considerável na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, dificultando a ação das drogas e aumentando a resistência aos diferentes agentes ^{41, 69, 148}.

A placa dentária é o biofilme mais antigo já descrito na literatura e pode ser composto por diferentes espécies que interagem combinando-se em arranjos complexos ^{3-4, 34, 36-37, 81, 84, 96, 122, 131, 144, 163}. Entre essas espécies destaca-se a atuação de *Lactobacillus* ^{36-37, 63, 81, 96, 149} e de estreptococos do grupo mutans, sendo o *Streptococcus mutans* (Sm) considerado o principal agente etiológico da cárie dental ^{3-4, 36-37, 47, 81, 89, 96, 131}. A cárie é considerada uma das enfermidades mais frequentes no ser humano ¹¹⁰, sendo que no Brasil, dados relatados pelo Projeto SB Brasil 2010 apontam que ela ainda é uma doença muito frequente na população e continua sendo a principal razão para a perda do elemento dental ¹²⁴. Por isso, a busca de técnicas novas ou complementares que auxiliem na prevenção da cárie e no tratamento minimamente invasivo das lesões possui grande relevância. Diferentes procedimentos e produtos têm sido utilizados para prevenir a instalação e controlar a progressão do processo carioso e doença periodontal, tais como a eliminação mecânica da placa bacteriana por meio de profilaxia dental, a raspagem e o alisamento radicular, a aplicação tópica de flúor e a utilização de antimicrobianos como a clorexidina (CLX) e o triclosan ^{16, 21, 92, 94, 99, 101, 143-145}. Além da cárie, os biofilmes microbianos presentes na cavidade bucal são associados ao desenvolvimento de outras condições patológicas, como doenças periodontais e endodônticas, candidose orofaríngea, estomatite protética, mau hálito e peri-implantite ^{13, 15-17, 31, 34, 38, 45, 52-54, 61, 64-67, 73, 77}. Outra importante implicação da presença de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal é o risco de infecções durante procedimentos cirúrgicos. O elevado número de bactérias na cavidade bucal é apontado como a principal causa de infecções locais após cirurgias orais

e, por essa razão, a profilaxia antibiótica sistêmica e a descontaminação local com antissépticos são indicadas previamente aos procedimentos cirúrgicos ^{17, 127, 145}.

A clorexidina (CLX) é o antimicrobiano mais frequentemente utilizado tanto para descontaminação de sítios infecciosos, lesões cariosas e bolsas periodontais, como para descontaminação bucal previamente a procedimentos cirúrgicos ^{17, 113, 127, 145}. Apesar de sua eficiente redução microbiana, a utilização intrabucal de enxaguatórios de CLX pode promover efeitos adversos, como a alteração de paladar, sensação de queimação, manchamento de dentes e materiais restauradores e, mais raramente, irritação das mucosas e alergias ¹⁶⁶. Além disso, o desenvolvimento de cepas resistentes a CLX já vem sendo apontada na literatura ^{68, 94, 166}. Por isso, a busca por tratamentos antimicrobianos alternativos é muito relevante nas ciências odontológicas.

Nos últimos anos, a Terapia Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Therapy ou PDT) vem sendo apontada como modalidade terapêutica promissora para a inativação de micro-organismos bucais ^{51-54, 91, 104, 106-108, 119, 123, 125, 127-128, 131, 136, 141-142, 145, 147, 157, 159-162}, especialmente visando sanar os problemas relacionados com a resistência dos micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos convencionais ^{31, 83, 120}. A PDT, quando aplicada com o intuito de inativar micro-organismos, é também denominada de Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, PACT) ¹⁵⁴ e Inativação Fotodinâmica (do inglês Photodynamic Inactivation, PDI) ⁷³, sendo este o termo adotado nesse trabalho.

O processo fotodinâmico requer a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio ^{28, 34, 51, 79-80, 141, 154, 165}. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons pelo FS, levando seus elétrons a um estado excitado ^{8, 28, 34, 51, 79-80, 141, 154, 165} que pode reagir com moléculas vizinhas por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), culminando na produção de espécies reativas ^{8, 28, 34, 51, 79-80, 141, 154, 165}. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e a ocorrência do tipo de reação pode estar relacionada com as características do FS empregado ^{8, 28, 34, 51, 79-80, 82, 132, 141, 146, 154, 165}. Como as espécies reativas formadas durante o processo fotodinâmico parecem possuir reatividade não específica com moléculas orgânicas, significa que qualquer

macromolécula celular pode ser um alvo em potencial ^{8, 34, 79-80, 141, 154}. Por isso, a PDI parece possuir uma importante vantagem em comparação aos antimicrobianos convencionais, já que a multiplicidade de alvos torna improvável o desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos expostos. Além disso, já foi mostrado que a PDI pode possuir efeito sinérgico com antibióticos convencionais, potencializando a ação de ambos no combate a biofilmes ⁴⁵. Outro aspecto importante relacionado à PDI é a possibilidade desta terapia desarticular a estrutura e diminuir a biomassa de biofilmes ^{53, 74}. Por ser um tratamento minimamente invasivo e com grande potencial antimicrobiano, a PDI pode ter ampla utilização na Odontologia contribuindo para sanar as deficiências dos tratamentos antimicrobianos atualmente disponíveis.

Muitas investigações laboratoriais vêm mostrando que tanto bactérias como fungos da cavidade bucal, incluindo os envolvidos com o processo carioso, possuem susceptibilidade a diferentes protocolos de PDI ^{27, 65, 67, 119, 159-160}. Estudos como os de Fimple et al. ⁶¹, Fontana et al. ⁶⁵ e Dovigo et al. ⁵³, entre outros, vêm mostrando que um grande número de micro-organismos bucais é susceptível a essa terapia ^{64, 73-74, 77, 85, 91, 97-98, 102, 104, 106-108, 119-120, 123, 127-128, 131, 141-142, 144-147, 159}. Especificamente como método de desinfecção ou controle microbiano incluem-se a redução bacteriana em canais radiculares, em bolsas periodontais, sítios com peri-implantite, descontaminação oral previamente à cirurgias e lesões de cárie ^{38, 52-54, 65, 77, 85, 123, 127-128, 141-142, 159}. Embora o volume de informações acerca da eficácia da PDI tenha crescido de forma substancial na literatura científica internacional, ainda se percebe uma grande dificuldade em tornar a PDI uma técnica aplicável clinicamente. Uma das razões que pode ser sugerida para tal dificuldade se refere ao modelo microbiano utilizado nos estudos laboratoriais. Muitos concluem sobre a eficácia da PDI após sua avaliação sobre micro-organismos planctônicos, os quais, comprovadamente, necessitam de concentrações de antimicrobianos 10 a 1000 vezes menores ^{32, 125, 159}. Por isso, a utilização de biofilmes nos estudos *in vitro* pode aproximar as condições laboratoriais daquelas que seriam encontradas clinicamente ^{32, 128, 148}. Ainda assim, os modelos *in vitro* de biofilme normalmente utilizados são muito distantes da realidade intrabucal, como é o caso dos modelos estáticos e a formação de biofilmes com apenas uma ou duas espécies microbianas ^{13, 16, 52-53, 91, 120, 131, 157}. Nessas situações, as conclusões extraídas dos

experimentos são muitas vezes difíceis de serem transferidas diretamente para a situação in vivo e, portanto, nem sempre permitem a definição de um protocolo clínico da terapia.

Outra questão relacionada à dificuldade em se determinar um protocolo clínico eficaz está vinculada aos FSs empregados nos estudos. De forma geral, os FSs com maior destaque são o azul de toluidina, azul de metileno, rosa bengala, porfirinas, ftalocianinas e eritrosina^{32, 70, 128, 132, 142, 154, 162}. Além desses, também tem sido sugerido o uso de fitoterápicos, como a hipericina^{56, 119} e a curcumina (CUR)^{13, 15-17, 29, 38-40, 52-54, 106-108, 115, 120, 127}. Devido à variação nas propriedades fotofísicas dos diferentes FSs, a comparação de resultados entre diferentes estudos é muito difícil de ser realizada. Ainda que o mesmo tipo de FSs seja empregado em estudos diferentes, existem variações no modo de preparo do composto, nas concentrações utilizadas e nos tempos de incubação antes da iluminação. Uma grande diversidade nos parâmetros de iluminação também é encontrada, incluindo o tipo de fonte de luz (laseres, diodos emissores de luz ou LEDs, lâmpadas de tungstênio entre outras), comprimento de onda e dosimetria empregada. A enorme diversidade de dados publicados leva, muitas vezes, a resultados conflituosos entre as diferentes investigações e a impossibilidade de se determinar, a partir da literatura, um protocolo que possa ser avaliado clinicamente com segurança. Adicionalmente, resultados incompatíveis entre diferentes investigações científicas também podem ser explicados por problemas durante o delineamento e análises dos dados. São muito frequentes os trabalhos sobre PDI que não deixam claro como as etapas de delineamento e análise foram conduzidas¹²⁸, impossibilitando que o leitor faça seu julgamento sobre a confiabilidade dos dados apresentados. Recentemente, editoriais publicados pela revista *Nature* chamam a atenção para o problema da falta de reprodutibilidade entre os estudos publicados¹⁴. Nesses textos, algumas questões são levantadas como, por exemplo, a falta de informações nos artigos sobre a calibração das medidas, o cálculo do tamanho das amostras e o poder dos testes estatísticos utilizados para embasar as conclusões.

Considerando que as pesquisas in vitro constituem o passo inicial na caracterização de um novo FS e podem fornecer a evidência de possíveis protocolos de tratamento, tais estudos possuem grande relevância. No entanto, devem ser realizados buscando a maior semelhança possível com a situação clínica que se procura simular e com rigor metodológico que garanta a confiabilidade dos dados obtidos. Modelos de

formação de biofilme *in situ* têm sido indicados como método adequado para se estudar tanto a arquitetura e a fisiologia da formação do biofilme sobre estrutura dental e restauradora^{7, 36-37, 47-49, 78, 81, 84, 96, 102, 122, 144} como o efeito de agentes antimicrobianos sobre biofilmes^{20, 99, 143, 155}. Estudos com modelos *in situ* também chamam a atenção para a variabilidade inter-indivíduos que pode ser encontrada na formação e composição do biofilme dental formado^{46-47, 81, 102, 148, 153, 163, 169}. Além disso, a utilização de um modelo de biofilme *in situ* associado a um delineamento hierárquico e, conseqüentemente, a análise de dados em uma abordagem multinível, pode permitir a incorporação da variabilidade do efeito antimicrobiano entre os diferentes sujeitos que fornecerão as amostras⁷¹.

Estudos prévios conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a CUR, um pigmento natural extraído dos rizomas da planta *Curcuma longa* L. e conhecida como açafrão-da-índia^{57, 133}, parece ser um FS promissor^{15-17, 29-31, 38-40, 45, 52-54, 104, 106-108, 115, 120, 123, 127-128, 135-136, 147} para PDI. Além de suas propriedades fotodinâmicas, um número crescente de estudos tem confirmado o potencial terapêutico da CUR, como seu efeito anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e antitumoral^{2, 5, 22, 57, 117, 134, 152}. A alta capacidade de absorção de luz em comprimentos de onda próximos ao azul faz com que a CUR seja um possível FS para eliminação de micro-organismos. Apesar de seu grande potencial, a CUR apresenta baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo a alternativa utilizada nos estudos para a solubilização do pó, a sua dissolução em DMSO (dimetilsulfóxido) ou etanol previamente a incorporação de água^{13, 27, 39-40, 52-54, 120, 135}. No entanto, a utilização clínica desses solventes não é desejável. Dessa forma, para que a PDI mediada pela CUR possa ser indicada clinicamente na eliminação de micro-organismos bucais, a investigação de veículos biocompatíveis capazes de solubilizá-la mantendo seu excelente efeito fotodinâmico ainda é necessária.

Além disso, um aspecto que precisa ser investigado previamente ao uso da PDI na Odontologia é a possibilidade dessa técnica promover alterações indesejáveis nas superfícies de materiais restauradores estéticos e esmalte dental, uma vez que os FS utilizados para PDI são substâncias corantes⁶⁴. Se a aplicação tópica do FS for capaz de promover alteração na cor de restaurações estéticas que o paciente já possua e esmalte dental, ou mesmo em suas propriedades superficiais como a dureza ou a rugosidade

superficial, a PDI não poderá ser recomendada com segurança, pois alterações na rugosidade da superfície poderiam promover maior acúmulo de placa dentária^{10, 21, 23, 43-44, 55, 66, 95, 114, 116, 118, 139, 156, 164, 168} enquanto que alterações na dureza poderiam acarretar no desgaste ou diminuição da resistência superficial à abrasão, às fraturas, diminuição da resistência flexional e resistência à compressão, o que influenciaria diretamente na longevidade da restauração^{9-10, 21, 24, 35, 42-43, 54-55, 76, 90, 100, 105, 112, 118, 121, 138, 140, 151} e do elemento dental^{1, 18, 50, 72, 88, 101, 111, 158}.

Isso deve-se levar em consideração uma vez que a CUR possui elevada ação antioxidante, absorvendo as espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nos tecidos e quando excitada por luz com comprimento de onda compatível ao seu espectro de absorção ($\lambda = 430 \pm 10$ nm) se torna altamente instável^{8, 28, 30, 39-40, 51, 115}, de modo que na tentativa de voltar ao seu estado fundamental de energia, reage com moléculas circunvizinhas originando radicais livres como o peróxido de hidrogênio, as hidroxilas reativas e os superóxidos^{8, 28, 30, 39-40, 51, 115, 165}. Considerando o mecanismo de ação da PDI e a possibilidade de liberação de radicais livres e outros subprodutos, pode-se supor que não somente as células microbianas, mas qualquer tecido ou material exposto a ação fotodinâmica, possa sofrer algum dano após a ocorrência das reações tipo I e II.

Na Odontologia, a exposição de tecidos dentais e restauradores a radicais livres e subprodutos semelhantes aos formados durante a PDI vem sendo descrita em investigações de clareamento dental. Quando se utiliza a técnica do clareamento caseiro, o agente clareador se decompõe em ureia e peróxido de hidrogênio, que por sua vez, se degrada em oxigênio e água, a principal responsável pela degradação hidrolítica dos compósitos^{59, 118, 140, 156, 168}. Essa degradação resultará em falha de ligação entre a matriz resinosa e as partículas de carga das resinas, culminando no aumento da rugosidade superficial da mesma^{59, 118, 140, 156, 168}. Uma reação semelhante é observada quando se realiza a técnica de clareamento em consultório, no entanto, pelo fato da formulação inicial já ser o peróxido de hidrogênio, este se dissociará em água e oxigênio, desencadeando os mesmos resultados acima descritos para os materiais restauradores resinosos. Em se tratando do esmalte dental, acredita-se que os agentes clareadores bem como seus subprodutos agem não somente sobre as moléculas de pigmentos, mas também diretamente sobre a matriz orgânica do esmalte dental, resultando em destruição das

cadeias orgânicas longas em cadeias curtas por uma reação de oxidação ^{1, 72, 158}. Alguns estudos relatam também a existência de uma íntima relação entre a realização do procedimento clareador e o aumento da rugosidade superficial, da microdureza superficial e da alteração de cor de materiais resinosos e elementos dentais ^{21, 23, 35, 90, 156, 168}. Por outro lado, alguns autores relatam nenhum resultado sobre a microdureza e a rugosidade em resinas compostas e elementos dentais após o uso de agentes clareadores ^{1, 50, 88, 95, 105, 138-139, 158}.

Considerando os aspectos já descritos, entende-se que para que as pesquisas científicas da área odontológica possam cumprir verdadeiramente seu papel na melhora das condições de saúde humana, é essencial que seja feita a tradução dos novos conhecimentos gerados pelo avanço nas pesquisas básicas para a prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças na prática clínica. Sem a definição de um protocolo eficaz e seguro não será possível transpor os resultados da avaliação da PDI em pesquisas básicas para um novo nível, o das investigações clínicas. Assim, este estudo buscou definir um protocolo eficaz para a Inativação Fotodinâmica utilizando a curcumina como FS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inativação Fotodinâmica

Segundo Anchordoguy et al.¹¹ (1992), o Dimetilsulfóxido (DMSO) protege enzimas isoladas, porém desestabiliza proteínas quando submetidas a altas temperaturas. Devido a este fato, os autores realizaram um estudo no qual investigaram a interação de DMSO com bicamadas de fosfolípidios. Vesículas de fosfolípidos contendo carboxifluoresceína foram expostas a várias concentrações de DMSO em diferentes temperaturas. Os valores de escape aumentaram de acordo com a concentração de DMSO e com a temperatura. Mesmo na presença de solutos conhecidos por neutralizar a toxicidade de DMSO em tecidos, esse efeito de escape não foi reduzido, sendo observado boa correlação entre o aumento das taxas de escape e do particionamento de DMSO, de água para octanol a temperaturas mais elevadas. Observou-se também que as reduções nas vibrações de CH₂ da bicamada também mostraram-se dependentes da concentração de DMSO e da temperatura. Além disso, notou-se também uma redução parecida nas vibrações de CH₂, em soluções de octanol e DMSO, indicando que este efeito não é mediado através de uma interação com água. A investigação de vibrações sulfóxido mostraram que o DMSO não é ligado ao hidrogênio para a metade de álcool do octanol e, por conseguinte, muito provavelmente a interação entre DMSO e octanol se deve a uma associação hidrofóbica. Os resultados desse estudo condizem com uma desestabilização das membranas fosfolipídicas, a temperaturas mais elevadas, por consequência de uma associação hidrofoba entre DMSO e a bicamada.

Um estudo realizado por Bruzell et al.²⁹ (2005) avaliou o potencial fotossensibilizador da curcumina para aplicações orais. Investigou-se a fotocitotoxicidade da curcumina em células da glândula salivar (SM 10-12), em cinco preparos aquosos que consistem em 5% de DMSO, micelas não-iônicas, ciclodextrina, lipossomas, ou um polímero hidrófilo. Foi avaliada a diferença de efeitos fototóxicos entre a curcumina natural e a curcumina sintética. A citotoxicidade em células 10-12 SM, expostos a curcumina na gama de concentração de 0,4-13,5 µM foi avaliada por um teste MTT, um teste microscópico de fluorescência de coloração, e através de técnicas de Western immunoblotting. Um ensaio de fluorescência foi utilizado para investigar o potencial de

formação de um produto de fotorreacção, o peróxido de hidrogênio. Como fonte de luz, utilizou-se uma lâmpada halógena, usada na clínica odontológica, emitindo na parte azul do espectro principalmente. O efeito fototóxico em células SM10-12 se mostrou dependente da concentração de curcumina, da dose de luz e do tipo de preparo. A indução da fototoxicidade da curcumina natural e sintética ocorreu na mesma medida. Foram obtidos efeitos significativos sobre as células a partir de concentrações baixas de curcumina ($\leq 0,5$ mM) e a uma dose de luz baixa (≤ 6 J/cm²), após três horas de incubação. Não foram detectadas a ativação de caspases, nem a formação de peróxido de hidrogênio, em células expostas à luz e curcumina. O veículo mais eficiente para que a curcumina induzisse à morte celular, foi o preparo de lipossomas. Este estudo concluiu que o efeito fototóxico, mediado por curcumina, é altamente dependente do tipo de preparação. Se houver uma seleção cuidadosa do veículo, a curcumina pode ser um fotossensibilizador em potencial para o tratamento de lesões bucais e cânceros.

Uma revisão de literatura realizada por Marsh ⁹² (2010) relatou as propriedades e o modo de ação de vários compostos disponíveis, para o controle do biofilme e placa dental. Há um conjunto diversificado, porém característico de microorganismos que colonizam a cavidade bucal, que conferem benefícios ao hospedeiro. Vários agentes anti-placa (por exemplo: surfactantes, óleos essenciais) e agentes antimicrobianos (por exemplo: bisbiguanidas, íons metálicos, fenóis, compostos de amônio quaternário, etc.) têm sido adicionados com sucesso em colutórios e pastas de dentes, para controlar biofilme da placa bacteriana. Esses agentes, em concentrações elevadas, podem remover os biofilmes e/ou matar as bactérias relacionadas com doença; além disso, mesmo em níveis sub-letais podem causar a inibição da expressão de características patogênicas desses microorganismos. Agentes antimicrobianos eficazes são capazes promover a manutenção do biofilme bucal, em níveis compatíveis com a saúde bucal, mantendo as propriedades naturais e benéficas da microflora oral residente. Portanto, o objetivo de produtos de higiene oral é controlar a placa dental, em vez de eliminá-la, diferentemente dos antibióticos, que são prescritos para matar e eliminar o agente infeccioso. Mas ainda há a necessidade do desenvolvimento de produtos ainda mais eficazes, que melhorem a eficácia clínica, preservando de forma mais efetiva os benefícios da microflora oral normal.

Soukos et al.¹⁴¹ (2011) revisaram o uso da terapia fotodinâmica através dos anos. A capacidade dessa terapia de inativar micro-organismos, foi demonstrada pela primeira vez a mais de 100 anos atrás, quando relatou-se o efeito letal de cloridrato de acridina e luz visível em *Paramecia caudatum*. O emprego da terapia fotodinâmica em infecções de seres humanos, baseia-se na concepção de que um agente fotossensibilizador, que absorve a luz, tem a capacidade de ser absorvido pelas bactérias e depois, ativado pela luz de um comprimento de onda apropriado, na presença de oxigênio, gera radicais livres de oxigênio e singleto que são citotóxicos para os microrganismos. É improvável que os microorganismos desenvolvam resistência à ação citotóxica do oxigênio singleto, devido à natureza molecular primitiva desse elemento. A terapia fotodinâmica tem emergido como uma alternativa aos tratamentos antimicrobianos e meios mecânicos na eliminação de espécies contidas na placa dental ao longo desses últimos 15 anos. As aplicações potenciais da terapia fotodinâmica no tratamento de doenças orais, podem ser feitas não só para doenças orais comuns como a cárie dental e doença periodontal, mas também para câncer oral, periimplantite, terapia endodôntica, candidose e halitose. As qualidades mais notáveis dessa terapia através dos anos são: a baixa toxicidade e rapidez de efeito.

Dovigo et al.⁵⁴ (2011) avaliaram a viabilidade da utilização da CUR como agente fotossensibilizador (FS) em PDI (inativação fotodinâmica) para inativação de uma cepa padrão de *Candida albicans* e seu efeito tóxico sobre culturas celulares de macrófagos. Para isso, suspensões planctônicas de *C. albicans* (ATCC 90028) foram expostas a nove concentrações de curcumina (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1, 5, 10 e 20 μM) e sete doses de luz (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,60; 13,20 e 26,4J/cm²). O efeito de diferentes tempos de pré - irradiação (PIT), a possível captação de curcumina pelas células fúngicas e a participação do oxigênio singleto na fotoinativação também foram avaliados. Adicionalmente, a PDI mediada pela curcumina foi avaliada em biofilmes formados pela cepa de referência de *C. albicans* e sobre culturas celulares de macrófagos. Além disso, as características ópticas da solução de curcumina foram investigadas em função da dose de luz utilizada. Os resultados foram submetidos à análise descritiva, Análise de Variância (ANOVA) e Kruskal-Wallis ($\alpha= 5\%$). As suspensões planctônicas de *C. albicans* foram completamente inativadas com a utilização de 20 μM de curcumina e 5,28 J/cm². Somado a isso, foi observada redução significativa na viabilidade celular dos

biofilmes de *C. albicans*. O efeito fotodinâmico foi acentuado pela presença da curcumina durante a iluminação e pela utilização de 20 minutos de PIT. Apesar da toxicidade observada nos macrófagos, a PDT foi mais efetiva para inativar as células fúngicas do que as células imunológicas. Além disso, uma elevada taxa de fotodegradação da curcumina foi observada.

Um estudo publicado por Dovigo et al.⁵³ (2011) investigou a efetividade da PDT mediada pela CUR para inativação de suspensões planctônicas e biofilmes formados por diferentes isolados clínicos de *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Para isso, suspensões planctônicas de 15 isolados clínicos de *Candida* foram expostas a três concentrações de curcumina (5, 10 e 20 μM) e quatro doses de luz (5,28; 18; 25,5 e 37,5 J/cm^2). As concentrações de 20, 30 e 40 μM foram selecionadas para avaliação da PDT sobre biofilmes, assim como as doses de 5,28 e 18 J/cm^2 . A atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada por meio do ensaio de XTT, e a biomassa foi avaliada por coloração Cristal Violeta (CV). Os resultados foram analisados segundo um modelo linear ANOVA aninhado, teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). As associações de curcumina e luz promoveram efeito antifúngico significativo nas suspensões planctônicas dos micro-organismos. Além disso, a utilização de 40 μM de curcumina com 18 J/cm^2 de luz promoveu reduções de 85, 85 e 73% na atividade metabólica dos biofilmes formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, respectivamente. Os resultados da coloração CV mostraram que a PDT reduziu a biomassa dos biofilmes, e que os isolados clínicos de *C. albicans* possuíam maior capacidade de formação de biofilme.

Mang et al.⁹¹ (2012) objetivou determinar a eficácia da PDT mediada por porfímero sódico para tratar infecções localizadas causadas por biofilme de *Streptococcus mutans*. Para isso, biofilmes formados por *S. mutans* (ATCC 27351) foram expostos ao fotossensibilizador (FS; 125 mg/mL) por 5 min, seguido de irradiação com laser a 630 nm (100 mW/cm^2 ; 60 J/cm^2). Os efeitos sobre a viabilidade bacteriana foram observados por meio do monitoramento da conversão alamarBlue. Além disso, dados suplementares caracterizando os biofilmes antes e após exposição a PDT foram adquiridos espectroscopia infra-vermelha de reflexão. Os resultados deste estudo mostraram que PDT usando porfímero de sódio e 630 nm de luz laser foi eficaz para reduzir

significativamente a viabilidade de *S. mutans* em forma de biofilme quando comparado ao controle. Cinco min de incubação do FS (25 mg/mL) associado a 30 J/cm² resultou em reduções significativas na viabilidade das bactérias. De acordo com os autores, este estudo demonstrou que é possível reduzir significativamente a viabilidade de *S. mutans* ao associar-se um fotossensibilizador com laser de comprimento de onda compatível com o espectro de absorção da droga mesmo quando as bactérias estão em forma de biofilme.

Araújo et al.¹⁷ (2012) desenvolveram um estudo com o objetivo de analisar a predisposição de patógenos da flora salivar em relação à terapia fotodinâmica (PDI), posteriormente à sensibilização com curcumina e após exposição à luz azul com o comprimento de onda de 450 nm. Foram utilizados 13 voluntários adultos e realizou-se uma aleatorização em três grupos diferentes: L-D- (grupo controle: sem luz e sem fármaco), L-D+ (tratado apenas com o fármaco, grupo curcumina), L+D+ (tratado com fármaco e luz, grupo da terapia fotodinâmica). Coletou-se amostras de saliva não estimulada antes e após a fase experimental para que fosse feita a contagem microbiana. As amostras, após diluições em série, foram cultivadas em placas de ágar sangue, em microaerofilia, e determinou-se o número de unidades formadoras de colônia. Como resultado desse experimento, foi observada uma diferença notável na capacidade de redução bacteriana entre os dois grupos experimentais: o grupo L-D+ apresentou uma diminuição bacteriana inferior (9%) ao grupo L+D+ (68%), isto é, este último foi o único a apresentar uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não foi evidenciada nenhuma redução para o grupo que foi somente tratado com a curcumina; isso indica que não há toxicidade desse fármaco na ausência de luz. Esse estudo mostrou que a terapia fotodinâmica possui eficácia na redução de micro-organismos salivares e pode ser utilizada para desinfecção geral da cavidade oral.

Segundo Araújo et al.¹⁶ (2012), a diminuição dos níveis bacterianos na cavidade oral pode ser um meio de prevenção da cárie dental. Dessa forma, como a terapia fotodinâmica é capaz de promover a morte celular, Araújo et al.¹⁶(2012) fizeram um estudo para avaliar a susceptibilidade para terapia fotodinâmica de culturas de *S. mutans* (ATCC) e *L. acidophilus* (ATCC) do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Suspensões de *S. mutans* e *L. acidophilus* isoladas (como espécie única) e combinadas (multiespécies) foram preparadas e avaliadas. Foram divididos quatro grupos diferentes: L-D- (grupo

controle), L-D+ (grupo fármaco), L+D- (grupo luz) e L+D+ (grupo terapia fotodinâmica). Foram testadas duas concentrações de curcumina (0,75 e 1,5 g/L) em associação com exposição à luz azul a 450 nm e 5,7 J/cm. Somente foi observada diminuição significativa na viabilidade de *S. mutans*, quando as amostras foram expostas a ambos, curcumina e luz. Quando se utilizou 1,5 g/L do fotossensibilizador, foi observada uma diminuição da viabilidade em até 99,99%. Já a susceptibilidade de *L. acidophilus* em relação à terapia fotodinâmica, foi significativamente menor para as duas concentrações de curcumina. Dessa forma, concluiu-se que a terapia fotodinâmica se mostrou efetiva na redução de *S. mutans* e *L. acidophilus* e que não houve redução representativa para o grupo L-D+, evidenciando que não há toxicidade da curcumina na ausência de luz.

Teixeira et al ¹⁴⁷ (2012) investigaram o efeito da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais. Para isso, os biofilmes formados in situ foram tratados com fotossensibilizador (S; TBO a 100 µg) e luz (L; 620 nm; 55 J/cm²) nos grupos (S+L+; PDT) e controles (S-L- (sem S e L); S + L- (com S e sem L); S-L+ (sem S e com L). Além disso, 21 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais por 7 dias para formação de biofilmes in situ. Após, os blocos de esmalte bovino foram aleatoriamente divididos entre os grupos de tratamento “S+L+” e “S-L-“. Os autores relataram que reduções significativas na viabilidade dos biofilmes crescidos in vitro foram observados após PDT. Para os biofilmes crescidos in situ, PDT não foi eficaz. Assim, os autores concluem que a PDT, utilizando o protocolo testado, foi eficaz na redução de biofilmes in vitro, porém ineficaz para biofilmes formados in situ.

Shrestha e Kishen ¹³⁶ (2012) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos de vários inibidores de tecidos, como dentina, matriz de dentina, tecido pulpar, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e albumina de soro bovino (BSA) na atividade antibacteriana de CSNPs e PDT. O efeito antibacteriano da CSNPs e da PDT usando os fotossensibilizadores rosa bengala (RB) e azul de metileno (MB) foi testado sobre *Enterococcus faecalis* na forma planctônica com ou sem pré-tratamento com diferentes inibidores de tecido por uma hora. A sobrevivência bacteriana foi avaliada após 1, 8, e 24 horas de incubação com CSNPs e após a PDT mediada por RB e MB. Os dados foram analisados (one way ANOVA com pós -teste de Tukey com $\alpha = 0,05$) e os resultados mostraram que o tecido pulpar e BSA inibiram o efeito antibacteriano do CSNPs

significativamente ($p < 0,05$), entretanto, o efeito antibacteriano não foi afetado pela dentina, matriz de dentina, ou APLs. A atividade antibacteriana da PDT mediada por MB ou RB foi inibida em ordem decrescente pela matriz de dentina, de BSA, polpa, dentina, e o LPS ($p < 0,05$). O efeito dos inibidores de tecidos foi maior no caso de PDT mediada por RB. Dependendo no mecanismo antibacteriano do CSNPs e PDT, padrões inibitórios diferentes foram observados para diferentes inibidores de tecidos. Os autores concluíram que os diferentes inibidores de tecido (dentina, matriz de dentina, tecido pulpar, LPS bacteriana, e BSA) existentes dentro do canal radicular afetaram a atividade antibacteriana de CSNPs e PDT em graus variados. Desse modo, são necessárias mais investigações para amplificar sua eficácia antimicrobiana para uso para descontaminação de canais radiculares.

Rolim et al.¹²³ (2012) investigaram a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica mediada por diferentes fotossensibilizadores (FS) sobre *Streptococcus mutans*, objetivando comparar a ação fotodinâmica de diferentes fotossensibilizadores (azul de metileno, azul de toluidina, verde de malaquita, eosina, eritrosina e rosa bengala) por meio da análise da liberação de oxigênio singlete e da viabilidade celular. A dose de luz empregada foi de $24\text{J}/\text{cm}^2$ e o tempo de pré-irradiação foi de 5 min para todos os FS testados. As condições experimentais avaliadas foram: “controle” (FS-L-), “só luz” (L+ FS-), “só FS” (FS + L-) e FS e luz presentes (FS+L+). Após realização dos tratamentos, as suspensões microbianas foram diluídas, plaqueadas em BHI agar e incubadas por 48h a 37°C para quantificação celular. A análise da taxa de liberação de oxigênio singlete foi realizada e os resultados mostraram que PDT mediada por azul de toluidina e verde de malaquita promoveram uma redução de 3 e 1,4 logs, respectivamente. Adicionalmente, os dados mostraram que o azul de metileno promoveu a formação de 1,3 vezes mais oxigênio singlete do que o azul de toluidina, porém ambos produziram mais oxigênio singlete do que os outros FS testados. 99,9% de morte microbiana foi verificada após PDI mediada por azul de toluidina.

Andrade et al.¹³ (2013) publicaram um estudo em que avaliaram os efeitos do tempo de pré-irradiação (PIT) em terapia fotodinâmica (PDT) mediada por curcumina (CUR) sobre culturas planctônicas e na forma de biofilme de cepas de referência de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*. Para isso, suspensões e

biofilmes de espécies de *Candida* foram mantidas em contato com diferentes concentrações de CUR por diferentes intervalos de tempo (1, 5, 10 e 20 minutos) antes da irradiação com LED (diodo emissor de luz; 450 nm; 5,28 J/cm²). Os grupos testados foram: “controle” (CUR-L-), “só luz” (L+ CUR-), “só CUR” (CUR + L-) e CUR e luz presentes (CUR+L+). Depois de PDT, as suspensões foram plaqueadas em ágar sabouraud dextrose, enquanto que os resultados do biofilme foram obtidos utilizando o método de redução de XTT. Observações por meio de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foram realizadas para fornecer uma melhor compreensão da penetração da CUR através dos biofilmes após 5 e 20 minutos de contato com as culturas. PITs diferentes não apresentaram diferenças estatísticas na PDT mediada pela CUR para as espécies de *Candida* na forma planctônica. Além disso, inativação completa das três espécies foram observadas após associação de CUR 20,0 µM com PIT de 5, 10 e 20 minutos. Os resultados encontrados para as culturas biofilme mostraram significativa redução da viabilidade celular após a PDT. Em geral, as três espécies de *Candida* avaliadas apresentaram maior redução na viabilidade ao se associar CUR a 40 µM com 20 minutos de PIT. Além disso, observações CLSM mostraram diferentes intensidades de fluorescência após 5 e 20 minutos de incubação. Os autores concluíram que a fotoinativação de culturas planctônicas não foi dependente do PIT, entretanto, para os testes realizados sobre as espécies na forma de biofilme, foi possível observar que a PIT-dependência diferiu entre as espécies avaliadas. Além disso, análises no CLSM confirmaram a necessidade de maiores tempos de incubação para a CUR penetrar no interior do biofilme.

Dovigo et al.⁵² (2013), observaram a fotoinativação de *C. albicans*, presente em candidose induzida em camundongos, por meio da utilização de diferentes concentrações de curcumina. Camundongos imunossuprimidos receberam uma inoculação tópica de *C. albicans* (10⁷ UFC/mL) para indução de candidose experimental no dorso da língua. Após sete dias, a PDT foi aplicada sobre as lesões de *Candida* por meio da fotossensibilização com três concentrações de curcumina (20, 40 e 80 µM), durante 20 minutos de PIT, e dose de luz de 37,5 J/cm² (P+L+). A aplicação de curcumina sem luz (P+L-) e a utilização de luz sem curcumina (P-L+) também foram avaliadas. Animais com candidose induzida que não receberam tratamento foram considerados controle

positivo (P-L-), e os animais que não receberam imunossupressão, inoculação, nem tratamento foram considerados controle negativo (NCG). As línguas de todos os animais foram removidas para avaliação histológica. A viabilidade de *C. albicans* foi determinada por meio de contagem de colônias (UFC/mL) e os resultados foram analisados com ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=5\%$). Foi observado que todas as associações de curcumina e luz promoveram redução significativa na viabilidade de *C. albicans*, em comparação com o grupo P-L-. Nestes casos, a utilização de 80 μM promoveu a maior redução no número de colônias, sendo superior que 4 logs. Os valores de UFC/mL encontrados nos grupos P-L-, P+L- e P-L+ foram semelhantes. Além disso, a análise histológica sugeriu que a PDT não ocasionou nenhum efeito tóxico aos tecidos subjacentes. Após a realização do estudo foi possível concluir que a PDT mediada pela curcumina parece ser um método efetivo para inativação de diferentes espécies de *Candida*. Os resultados do estudo in vivo sugerem sua futura aplicação para o tratamento clínico de pacientes com candidose bucal.

O mecanismo da terapia fotodinâmica se baseia na associação da luz, com comprimento de onda específico a banda de absorção da droga, com um agente fotossensibilizador. Essa associação promove a ativação do fotossensibilizador que, na presença de oxigênio, provoca a morte de células-alvo. Devido a esse efeito, essa terapia é utilizada na odontologia para reduzir o crescimento de bactérias envolvidas no processo da cárie dental e da periodontite. Baseados nessas evidências, Paschoal et al.¹⁰⁸ (2013) avaliaram a eficácia, in vitro, da terapia fotodinâmica (PDT) utilizando curcumina juntamente com um diodo emissor de luz (LED) azul, sobre *Streptococcus mutans* na forma planctônica. Foram preparadas suspensões de 0,5 mL de *S. mutans* e divididas em quatro grupos: C-L- (controle: sem tratamento e com uma condição experimental), C+L- (curcumina em três concentrações diferentes: 2000, 4000 e 8000 μM e três condições experimentais), C-L+ (luz em 3 doses diferentes: 24, 48 e 72 J/cm e três condições experimentais) e o grupo C+L+ (PDT: curcumina nas respectivas concentrações e 9 condições experimentais). As amostras foram cultivadas em placas de Petri, contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*); depois foram incubadas em condição de microaerofilia, durante 48 horas a 37°C. Após esse período, foi feita contagem visual de unidade formadoras de colônia (UFC/mL). Os dados obtidos foram transformados em $\log_{10}$ e

analisados pelo teste ANOVA (a dois critérios) e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi observado que o grupo C+L+ possuiu uma diminuição bacteriana 70% maior do que o grupo C-L-. Já os grupos C-L+ e C+L- apresentaram uma pequena redução na contagem bacteriana.

Ribeiro et al.¹²⁰ (2013) investigaram o efeito fotodinâmico da curcumina em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), em cepas suscetíveis à meticilina (MSSA) e sobre fibroblastos L929. Suspensões de MSSA e MRSA foram tratadas com diferentes concentrações de curcumina (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20 μM) e expostas a diodo emissor de luz (LED; 18,0, 25,5 e 37,5J/cm²). Na sequência, foram realizadas diluições seriadas a partir de cada amostra e as contagens de colônias foram quantificadas. Para os fibroblastos, a viabilidade celular subsequente à terapia fotodinâmica mediada por curcumina foi avaliada utilizando o ensaio de MTT e as alterações morfológicas foram avaliada através da análise MEV (microscopia eletrônica de varredura). As concentrações de curcumina a 5,0 e a 20,0 μM em combinação com qualquer dose de luz testada resultou em na fotoinativação de MSSA. No entanto, apenas a concentração de 20,0 μM combinada com a maior dose resultou na inativação de MRSA. Esta combinação também promoveu uma redução de 80% no metabolismo celular de fibroblastos e alterações morfológicas foram visualizadas, indicando que a membrana celular foi o principal alvo desta fototerapia. Os autores concluíram que a combinação da curcumina com luz LED causou inativação de ambas as cepas de *S. aureus* e pode representar um tratamento alternativo na redução de MRSA, o maior responsável pela mortalidade e aumento dos custos dos cuidados de saúde em instituições e hospitais.

Paschoal et al.¹⁰⁶ (2013) investigaram o efeito antimicrobiano de um novo dispositivo de luz LED (Diodo Emissor de Luz) que emite luz em toda banda espectral visível em alta intensidade associado a diferentes concentrações dos fotossensibilizadores (FS) testados (curcumina a 2,5; 1,25; e 0,75 mM; azul de toluidina a 25, 50 e 100 μM) sobre suspensões de *Streptococcus mutans*. Além disso, o efeito antimicrobiano foi avaliado utilizando-se distintos tempos de irradiação luminosa (para curcumina: 12, 24 e 36 J/cm²; azul de toluidina: 9, 17,5 e 26,5 J/cm²). Os grupos testados foram FS+L+ (terapia fotodinâmica), FS-L- (controle), FS+L- (FS presente e luz ausente) e FS-L+ (FS

ausente e luz presente), sendo o tempo de pré-irradiação utilizado para curcumina de 60 segundos, enquanto que para o azul de toluidina foi de 5 minutos. Em seguida, alíquotas das suspensões foram diluídas e cultivadas em placas de ágar sangue (48 horas, 37°C). O número de unidades formadoras de colônias foi calculado e os dados foram submetidos a *two way* ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados evidenciaram que o novo dispositivo para iluminação LED foi capaz de, quando associado aos FSs, inativar quase 100% dos micro-organismos ($p < 0,05$) para todos os protocolos testados.

Paschoal et al.¹⁰⁷ (2014) investigaram o efeito fotodinâmico de baixas concentrações de dois distintos fotossensibilizadores (FS) (curcumina: 0,075; 0,75 e 7,5 µM; azul de toluidina: 0,25; 2,5 e 25 µM) e reduzido tempo de exposição à iluminação LED (branco; 400 a 700 nm; 12 segundos; 42 J/cm²) sobre suspensões de *Streptococcus mutans* após período de pré-incubação de 60 segundos e 5 minutos para curcumina e azul de toluidina, respectivamente. Os grupos testados foram FS+L+ (terapia fotodinâmica), FS-L- (controle), FS+L- (FS presente e luz ausente) e FS-L+ (FS ausente e luz presente). Em seguida, alíquotas de cada grupo foram diluídas e cultivadas em placas de ágar sangue e o número de unidades formadoras de colônias foi calculado e transformado em log₁₀. Posteriormente, os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey considerando $\alpha = 0,05$. Os resultados mostraram que os grupos submetidos à terapia fotodinâmica antimicrobiana apresentaram uma redução na viabilidade de 5 logs, sendo esta considerada significativa ($p < 0,05$). Os autores concluíram com este estudo que a combinação de uma fonte de luz não-coerente por um curto período de tempo com baixa concentração dos FSs avaliados promoveu acentuada redução microbiana, indicando que os protocolos testados podem ser considerados eficazes para reduzir *Streptococcus mutans* in vitro.

Santin et al.¹²⁸ (2014), realizaram uma revisão sistemática da literatura sobre a eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) sobre biofilme dental cariogênico. Foram avaliados e incluídos estudos in vivo, in vitro e in situ. Artigos que não abordassem a aPDT, que não tivessem avaliado a inativação fotodinâmica sobre biofilmes cariogênicos, que tivessem utilizado micro-organismos na fase de planctônica foram excluídos. A avaliação dos artigos e extração de dados foi realizada por dois pesquisadores usando uma escala de pontos. Os autores encontraram 200 artigos, sendo

que apenas dezessete estavam inclusos no critério de elegibilidade. Grande variabilidade foi encontrada em relação às metodologias e protocolos de aplicação para aPDT. Dois artigos apresentaram resultados desfavoráveis. Os autores concluíram a existência da eficácia antimicrobiana promovida pela aPDT.

Araújo et al.¹⁵ (2014) avaliaram a susceptibilidade de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* organizados em biofilme multiespécie e em lesões de cárie ativas em dentina frente à terapia fotodinâmica (PDT). Para o desenvolvimento dos biofilmes e indução de formação de cárie em dentina, ambas as cepas foram cultivadas e padronizadas à concentração de 10^8 UFC/ mL. Os grupos testados foram: L-D- (grupo controle), L-D + (grupo da droga - CUR), L + D (grupo luz), e L + D + (grupo PDT). Para os testes, foram utilizadas cinco concentrações distintas de curcumina (0,75; 1,5; 3,0; 4,0; 5,0 g/L) associadas com dose de iluminação LED de $5,7 \text{ J/cm}^2$. Os grupos foram comparados de acordo com testes ANOVA seguido de pós - teste de Tukey, considerando $\alpha = 0,05$. Observou-se como resultado uma redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade microbiana, enquanto na fase de biofilme, após a fotossensibilização com todas as concentrações de curcumina testadas. Para que uma redução microbiana significativa ($p < 0,05$) na dentina cariada fosse alcançada, foi necessário utilizar a máxima concentração de curcumina (5,0 g/L) associada ao LED ($5,7 \text{ J/cm}^2$). Não foi evidenciada redução significativa para a L-D +, reforçando a ausência de toxicidade no escuro da droga. Ao autores concluíram que ambas as espécies foram susceptíveis a curcumina na presença de luz azul. No entanto, esses micro-organismos, dentro de lesões de cárie de dentina, foram menos afetados em comparação com a fase de biofilme devido à dificuldade de penetração da luz e difusão das drogas.

Com o número crescente de patógenos resistentes aos antibióticos em todo o mundo, há uma necessidade de se buscar estratégias capazes de inativar esses agentes patogênicos. Antimicrobianos desse tipo são especialmente necessários em odontologia, a fim de evitar a utilização de antibióticos para o tratamento de doença periodontal, infecções endodônticas ou ainda infecções orais causadas por biofilmes de bactérias ou fungos. Uma opção seria a terapia fotodinâmica antimicrobiana (APDT), sendo que o seu efeito letal se dá pela associação de luz visível a um fotossensibilizador (FS), formando espécies de oxigênio reativas, as quais culminarão na morte microbiana. Em vista disso,

Cieplik et al.³² (2014) realizaram um estudo objetivando delinear o estado atual do potencial antimicrobiano da terapia fotodinâmica antimicrobiana para inativação de biofilmes formados *in vitro*, focando principalmente nos MOs responsáveis por importantes infecções orais.

Graciano et al.⁷⁵ (2015) avaliaram o potencial do gel de quitosana (CH) como carreador para o azul de toluidina (TBO) ao tecido bucal. Para isso, géis de CH foram obtidos em diferentes concentrações e suas propriedades físico-químicas (pH e de reologia), mucoadesão, perfil de liberação *in vitro*, retenção *in vivo*, e eficácia *in vivo* pela capacidade de induzir apoptose celular foram avaliadas. Observou-se como resultado que os géis mucoadesivos à base de CH otimizaram a liberação e a aderência das formulações no local alvo. Especificamente, 4% (w/w) de gel de CH apresentaram propriedades adequadas para utilização bucal, como valor de pH, mucoadesão, comportamento pseudoplástico, liberação prolongada, permeação mínima e uma maior retenção do TBO pela mucosa. Estudos *in vivo* mostraram o potencial do gel para aumentar a retenção de TBO e induzir apoptose das células após a irradiação com laser. Esse estudo mostrou que, o gel de CH a 4% apresentou propriedades adequadas para uso pela PDT na remissão do câncer bucal. O gel tem pH apropriado para a cavidade oral e o comportamento reológico pseudoplástico, que permite deformação durante a aplicação, tornando-o mais fluido e facilitando sua disseminação. Os autores concluíram que o gel de quitosana a 4% pode ser explorado como um sistema de entrega para TBO na PDT contra câncer bucal. No entanto, mais estudos em células tumorais devem ser realizados para melhor caracterizar os sistemas propostos.

Bernegossi et al.²⁶ (2016) avaliaram sistemas líquido-cristalinos para administração bucal do composto KSL-W (Decapeptídeo) a fim de reduzir quantitativamente biofilmes orais multiespécies. Os sistemas foram caracterizados utilizando-se microscopia de luz polarizada (PLM), espalhamento de Raio – X a baixo ângulo (SAXS), reologia e bioadesão *in vitro*. PLM mostrou isotropia ou anisotropia com mesofases lamelares, confirmados pelo SAXS. Testes reológicos demonstraram que a formulação F1 exibiu comportamento newtoniano, porém a F2 não, se mostrando um sistema dependente da concentração da fase aquosa (AP). Estudos de bioadesão revelaram um aumento da bioadesividade dependente da concentração AP ($F2 = 15,50 \pm$

1,00 mN.s) sobre blocos de dentes bovinos. Os testes antimicrobianos revelaram 100% de inibição de crescimento do biofilme oral após administração de KSL-W, que foi incorporado na fase aquosa da F2, a uma concentração de 1 mg/mL. Os autores concluem que os resultados sugerem que este sistema pode servir como um veículo potencial para a administração bucal de peptídeos para ação antimicrobiana oral.

Panhóca et al.¹⁰⁴ (2016), realizaram um estudo para avaliar o potencial antimicrobiano da inativação fotodinâmica mediada por Photogem (1000 µg/L) ou CUR (1500 µg/L) associado a LED vermelho/azul (45 J/cm²) na redução de *Streptococcus mutans* (Sm) crescidos in situ. Para isso, 18 pacientes foram selecionados, moldados e um aparato palatino foi confeccionado contendo blocos de esmalte dental bovino para permitir a formação do biofilme. Os voluntários utilizaram o dispositivo por 4 dias e decorrido esse período, retornaram à Faculdade para a devolução do dispositivo. Nos biofilmes foram submetidos aos tratamentos. Diluição seriada foi realizada, seguida de plaqueamento em meio específico para crescimento de Sm. 48 horas depois, foi realizada a contagem de colônias e os resultados mostraram que, para os protocolos testados, o fotossensibilizador Photogem foi o que apresentou maior redução microbiana, no entanto, pouco pronunciada. Os autores concluem que, embora a PDI seja uma técnica promissora para uso odontológico, para inativação de biofilme de Sm formado in situ, os protocolos testados não foram eficazes, necessitando de novas investigações para melhores resultados.

2.2 Estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de resinas compostas e esmalte dental.

Gurdal et al.⁷⁶ (2002) analisaram os efeitos prejudiciais que a utilização frequente de enxaguantes bucais exerce sobre a propriedade de três materiais restauradores estéticos diferentes. A água destilada serviu como grupo controle. 72 amostras foram preparadas a partir de matrizes metálicas. As amostras pertencentes aos grupos experimentais foram armazenadas em 20 mL das soluções teste por 12h (o que simulou o tempo de 1 ano de utilização diária da solução para bochecho). Alterações sobre as propriedades de microdureza da superfície e cor dos materiais foram analisadas por meio de microdurômetro Vickers e espectrofotômetro. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) com correção de Bonferroni, considerando $\alpha=0,05$. Os resultados mostraram que não houve interação significativa entre as soluções - teste e os materiais quanto à dureza ($p> 0,05$) e quanto as alterações de cor ($p> 0,05$). Desse modo, os autores concluíram que os efeitos de enxaguatórios sobre materiais restauradores podem não ter sido replicados in vitro, sendo recomendado a avaliação de rotina dos efeitos de bochechos em materiais restauradores estéticos.

Sideridou et al.¹³⁷ (2003) analisaram as propriedades físicas de resinas a base de polidimetacrilato, e o estudo mostrou que TEGDMA parece criar uma matriz polimérica mais densa, porém mais flexível (0,74GPa) por absorver maior quantidade de água (6,33% em peso) e liberar menor quantidade de monômero que não reagiu (2,41 mcg / mm (3)) após fotopolimerização. UDMA e Bis-EMA (4) formaram redes poliméricas mais rígidas, absorvendo menos água e liberando maior quantidade de monômero que não reagiu do que TEGDMA. (4) Bis-EMA absorveu a menor quantidade de água (1,79% em peso) e liberou a maior quantidade de monômero que não reagiu (14,21 mcg / mm (3)). Bis-GMA, conduziu à formação da rede mais rígida (1,43 GPa), absorvendo água em menor escala do que a resina composta por TEGDMA, porém em maior escala do que a resina composta por UDMA e (4) bis-EMA. Copolímeros de Bis-GMA com outros monômeros foram também preparados, usando várias combinações de monômeros e razões molares. Copolímeros BIS-GMA/TEGDMA (50/50 e 70/30 em peso%) apresentaram valores significativamente mais elevados para o módulo de Young (1,83 e 1,78 GPa) do que aqueles previstos para a composição do copolímero. Os autores

concluem que a substituição gradual de TEGDMA com UDMA e/ou bis-EMA (4) na copolimerização com bis-GMA resultou em resinas mais flexíveis, com menor absorção de água e valores de solubilidade maiores, dependendo do teor de TEGDMA.

Villalta et al.¹⁵¹ (2006) analisaram os possíveis efeitos dos agentes clareadores sobre compósitos resinosos previamente expostos a soluções corantes. Para isso, quarenta e cinco amostras em forma de disco (9 x 2,5 mm) de cada uma das 2 resinas compostas foram preparadas, divididas em 3 grupos de 15 amostras cada e imersas em soluções corantes (café ou vinho tinto) e em água destilada (controle) durante 3 horas por dia ao longo de um período de 40 dias. Os 3 grupos foram, em seguida, subdivididos em 3 subgrupos (n = 5) e 3 agentes de clareamento foram aplicados à superfície das amostras ao longo de um período de 14 dias. A cor das amostras foi medida com um espectrofotômetro CIELAB após a exposição aos agentes corantes e depois do branqueamento. As diferenças de cor (ΔE (ab)*) entre as 3 medições foram calculadas. O valor ΔE (ab) * = 3.3 foi usado como um valor aceitável em avaliações visuais subjetivas. Análise de variância e análise não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) foram utilizados para analisar os dados e os resultados mostraram que após pigmentação, a resina filtek supreme (FS) apresentou maior alteração de cor do que a esthetX (EX), sendo a solução de vinho o maior pigmentante. Após o branqueamento, a cor de ambas as amostras e EX FS voltou à linha de base. Os autores concluem que o nanocompósito (FS) mudou de cor mais do que o composto microhíbrido (EX) após imersão em soluções de café ou vinho tinto. Após o clareamento, houve remoção completa do manchamento para as 2 resinas testadas.

Fontes et al.⁶⁶ (2009) avaliaram in vitro o comportamento da estabilidade de cor da resina composta nanoparticulada Filtek Z350 após imersão em diferentes meios corantes (suco de uva, café e chá mate). Para isso, 12 corpos de prova (10 mm x 1mm) foram confeccionados com o auxílio de uma matriz de silicone e divididos entre os grupos experimentais e o controle (água) (n = 3). Por meio de um espectrofotômetro digital (Vita EasyShade) leituras de ΔE (variação de cor) foram realizadas antes e 1 semana após imersão nos diferentes meios por 4 horas diárias. O ΔE foi analisado por meio do teste t de Student de medida repetida e ANOVA *one way* seguido de pós- teste de Tukey ($p < 0,05$). Depois de uma semana de imersão, houve alteração de cor

perceptível nos espécimes pertencentes ao grupo “suco de uva” ($p = 0,008$) quando comparado com o grupo controle. Os espécimes pertencentes aos grupos “café” e “chá - mate” não apresentaram alteração de cor significativa ($p > 0,05$). Desse modo, os autores concluíram que a resina composta testada foi mais susceptível a pigmentação por substâncias presentes no suco de uva do que por substâncias que compõem o café e a erva – mate.

Ameri et al.¹⁰ (2010) avaliaram o efeito do gel de clareamento caseiro Opalescent® na estabilidade de cor da resina microhíbrida Amelogen® Plus. Para isso, parâmetros $L^*a^*b^*$ foram determinados e os espécimes foram submetidos ao procedimento de clareamento com peróxido de carbamida a 15%. Os parâmetros $L^*a^*b^*$ foram medidos novamente e a alteração de cor (ΔE) nos discos de resina foi calculada. Os dados foram analisados por meio de One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ($\alpha = 0.05$). Os resultados mostraram que em todos os espécimes o valor médio de ΔE foi maior do que 3,3. Notou-se diferença significativa entre as cores A3,5, A2 e A1. A1 mostrou o mais baixo valor, sendo mais claros os compósitos submetidos ao agente clareador em comparação aos espécimes não submetidos. A maior alteração ocorreu no parâmetro vermelho-verde (a^*). Os autores concluíram que o gel de peróxido de carbamida a 15% causou uma alteração de cor clinicamente detectável em cada uma das diferentes cores (A1, A2 e A3,5) da resina Amelogen® Plus testada. A maior alteração ocorreu com a cor A3,5 e a menor foi associada à cor A1.

De Oliveira et al.⁴⁴ (2010) avaliaram o efeito do acabamento e polimento sobre a rugosidade e a dureza superficial da resina Filtek Supreme XT após imersão em diferentes soluções de flúor. Os corpos de prova ($n = 140$; 10 mm x 2 mm) foram confeccionados a partir de uma matriz bipartida, a qual também foi utilizada para padronização das medidas. Em seguida, os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em potes acrílicos contendo saliva artificial e assim permaneceram por 24 horas até as leituras de rugosidade e microdureza *Vickers* iniciais. Em seguida, os espécimes foram imersos nas soluções teste por 1 minuto por dia (solução manipulada de fluoreto de sódio a 0,05%, Fluordent Reach, Oral B e Fluorgard) durante 60 dias. Decorrido esse período, novas medidas de rugosidade e microdureza foram efetuadas. Os dados foram submetidos a ANOVA *two way* seguida de pós - teste de Tukey ($\alpha < 0,05$). Para a comparação dos

valores de rugosidade média e dureza no início e após os 60 dias de imersão, teste t de Student pareado foi utilizado. Os resultados mostraram que a rugosidade da superfície e a microdureza da resina Filtek Supreme XT foram influenciadas pelo processo de acabamento e polimento, independentemente dos meios de imersão ($p = 0,001$).

Abouassi et al.⁹ (2011) investigaram as alterações na micromorfologia e microdureza da superfície do esmalte superfície após clareamento com duas concentrações diferentes de peróxido de hidrogénio (HP) e de peróxido de carbamida (CP). Para isso, amostras de esmalte bovino foram incluídos em blocos de resina e polidos. As amostras nos grupos experimentais ($n = 10$) foram tratadas com géis clareadores contendo 10% de CP, 35% CP, 3,6% de HP, a HP e 10%, respectivamente, durante 2 h por dia ao longo de um período de 2 semanas. Os géis tinham mesma composição e pH, diferindo somente quanto à concentração de CP ou HP. A rugosidade e a morfologia da superfície do esmalte foram analisadas utilizando perfilometria a laser e MEV. Microdureza foi medida usando um teste de dureza Knoop. Os dados foram avaliados estatisticamente. As amostras no grupo “HP a 10%” apresentaram maior rugosidade após clareamento em comparação com o grupo de controle (ΔRa , $p = 0,01$). Clareamento com CP a 35% mostrou apenas uma tendência para aumentar rugosidade (ΔRa , $p = 0,06$). Aplicação de CP a 10% ou HP a 3,6% não influenciou significativamente os valores de Ra. A microdureza da superfície do esmalte foi significativamente maior após a aplicação de HP a 10% em comparação com os grupos controle ($\Delta Mic = 8$ KHN, $p = 0,0002$) e 35% de CP ($\Delta Mic = 20$ KHN, $p = 0,01$). Os autores concluem que a aplicação de CP e HP mostrou pequenas diferenças quantitativas e qualitativas. Além disso, a influência do clareamento sobre a morfologia e a dureza da superfície do esmalte dependeu da concentração da substância ativa.

Ribeiro et al.¹²¹ (2011) avaliaram a microdureza superficial de resinas compostas polimerizadas por diferentes fontes de luz. Para isso, foram selecionadas três resinas compostas microhíbridas e uma nanoparticulada, as quais foram submetidas à polimerização utilizando-se um aparelho de luz halógena com duas ponteiras, uma de vidro semi-orientada e outra de acrílico pintada e também um dispositivo à base de LED. Os corpos-de-prova (cp) obtidos a partir de uma matriz circular de alumínio, após receberem a resina composta, foram fotopolimerizados por 40 segundos e em seguida

armazenados a seco por 24 horas. Decorrido esse período, procedeu-se ao ensaio de microdureza superficial Vickers, realizando-se quatro aferições na superfície de topo (dureza 1) e na superfície de base (dureza 2). Utilizou-se a análise de variância que foi complementada pelo teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas de médias, ao nível de significância de 5%. Os resultados evidenciaram que as menores médias de dureza na superfície dos cps foram obtidas com a resina Opallis submetida ao UltraLume 2 (Ultradent®, South Jordan, USA). As médias maiores referem-se ao compósito Vit-l-escence™ polimerizado com o Led UltraLume 2 e luz halógena Ultralux PCP (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil), seguidas da resina Filtek™ Z350 submetida ao UltraLume 2. Quanto à base, a menor média de dureza também foi da resina composta Opallis, sob ação do LED UltraLume 2 e a maior da Vit-l-escence™, seguida pela Amelogen® Plus quando polimerizada pelo Ultralux com a ponta semi-orientada. Os autores concluíram que o aparelho LED permitiu polimerização e consequentes valores de microdureza equivalentes ao dos aparelhos halógenos convencionais, para três dos quatro compósitos avaliados.

Malkondu et al.⁹⁰ (2011) avaliaram o efeito do peróxido de carbamida de um sistema de clareamento caseiro (Opalescence PF) e do peróxido de hidrogênio contido em um sistema de clareamento em consultório (Treswhite Supreme) sobre a microdureza de duas resinas compostas (Filtek Supreme XT e Premise), porcelana reforçada por leucita (Empress Esthetic), porcelana pura (Empress 2), e porcelana feldspática (Matchmaker MC). Vinte corpos de prova (10 mm x 2 mm) de cada material foram confeccionados com o auxílio de uma matriz metálica e polidos (lixa de papel de carboneto de silício e pasta de alumina). Na sequência, cada tipo de material avaliado foi dividido em 2 grupos (gel clareador caseiro; gel clareador de consultório) e medidas de microdureza *Vickers* (3 indentações por espécime; resinas: carga de 0,2 kg por 30 segundos; porcelanas: 1 kg de carga por 15 segundos) foram realizadas previamente ao clareamento (conforme especificações do fabricante) e imediatamente após. Os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney U e pelo teste de Wilcoxon. De acordo com os autores, o gel clareador da marca Opalescence PF diminuiu significativamente a dureza de todos os materiais avaliados ($p < 0,005$) exceto da resina Filtek Supreme XT, onde foi observado um aumento significativo de sua dureza ($p < 0,028$). Para o gel da marca Treswhite

Supreme, houve redução da dureza somente para a resina Premise ($p < 0,022$). Portanto, os autores concluíram que géis clareadores de uso caseiro que contém altas concentrações de peróxido de carbamida podem afetar a dureza de materiais restauradores.

Mendes et al.⁹⁵ (2012) investigaram o efeito de dois géis utilizados para clareamento dental (10% HP - Rembrandt Whitening Pen, Oral B, São Paulo, SP, Brazil ; 35% HP- Whiteness HP Maxx, FGM) sobre a estabilidade de cor e rugosidade superficial de dois tipos de materiais resinosos (TPH3, nanohíbrido; Z350, nanoparticulado). Dez espécimes de cada resina foram confeccionados (21 mm x 2 mm) com auxílio de uma matriz metálica e polidos (Sof - Lex Discs – 3M ESPE). Na sequência, foram envelhecidos e mantidos por 7 dias em solução de café. Decorrido esse período, os espécimes foram submetidos aos diferentes tipos de clareamento conforme especificações do fabricante e depois de finalizados os clareamentos, foram novamente polidos (Sof - Lex Discs – 3M ESPE). As leituras de rugosidade (Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan) e de cor (Lambda 35 UV/VIS; Perkin Elmer Instruments, Oak Ridge, TN, USA) foram efetuadas após a confecção dos espécimes, após processo de envelhecimento, após imersão em café, após clareamento e após repolimento. Para verificação da variação de cor (ΔE), os dados foram calculados utilizando os valores de ΔL^* , Δa^* e Δb^* . A análise dos dados foi realizada por meio de ANOVA seguida de pós – teste de Tukey considerando 5% de significância e o resultado mostrou que, para a variável rugosidade, o único fator significativo após clareamento com o gel “Whiteness HP Maxx” foi o polimento ($p < 0,05$). Para o gel Rembrandt não foram encontradas diferenças. Para a variável estabilidade de cor, as análises indicaram que a resina nanohíbrida (TPH3) apresentou maior pigmentação, sendo que os géis clareadores não foram capazes de clarear nenhuma resina durante os tempos avaliados. Além disso, os autores observaram que o polimento realizado sobre a superfície da resina TPH3 se mostrou capaz de devolver sua cor original, porém isso não foi observado para a resina nanoparticulada (Z350). No entanto, a rugosidade aumentada após a realização dos clareamento não foi reduzida quando da realização do polimento. Os autores concluíram que, uma vez que não tenha sido possível reverter a rugosidade dos compósitos para os valores iniciais, é possível que uma degradação mais extensa e irreversível tenha ocorrido.

AlQahtani MQ ⁹ (2013), investigaram o efeito de um agente clareador caseiro a base de peróxido de carbamida a 10% (Opalescence PF 10% Carbamide Peroxide, Ultradent Products Inc, South Jordan, UT, USA) sobre a microdureza de quatro diferentes resinas compostas (Filtek Z250 – microhíbrida; Filtek Z350 – nanoparticulada; Filtek P90 – baixa contração de polimerização; Valux Plus – híbrida). Para isso, 30 corpos de prova (10 mm x 2 mm) de cada resina foram confeccionados com auxílio de uma matriz de borracha. Na sequência, foram polidos (Sof-Lex, 3M ESPE) e divididos igualmente em 3 grupos (Controle: imersão em saliva artificial por 14 dias; Grupo A: tratamento com peróxido de carbamida a 10% por 14 dias; Grupo B: tratamento com peróxido de carbamida por 14 dias seguido de imersão em saliva artificial pelo mesmo período de tempo). Previamente aos tratamentos, os espécimes foram mantidos por 24 horas em água destilada. Finalizados os tratamentos, as medidas de microdureza *Vickers* foram realizadas (300g de carga por 15 segundos), os dados analisados (*one-way* ANOVA com pós - teste de Tukey HSD de comparações múltiplas; $\alpha = 0,05$) e os resultados mostraram que houve redução significativa ($p < 0,001$) da microdureza dos espécimes de todas as resinas avaliadas pertencentes aos grupos A e B quando comparado com os pertencentes ao grupo controle. Desse modo, os autores concluíram que o peróxido de carbamida a 10% apresentou efeito deletério sobre a microdureza das 4 resinas avaliadas.

Durner et al. ⁵⁵ (2014) analisaram a influência do tempo de fotopolimerização, do envelhecimento dos corpos de prova e da técnica de clareamento (clareamento caseiro x de consultório) sobre resinas compostas nano híbridas. Para isso, espécimes ($n = 5$) de três resinas nanohíbridas (Venus (®) Diamond, Tetric EvoCeram (®) e Filtek TM Supreme XTE) foram fotopolimerizadas por 5, 10, 20 e 40 segundos. O grau de conversão (GC) foi medido em tempo real por meio de espectroscopia de infravermelho (FTIR). As amostras foram branqueadas, imediatamente ou posteriormente ao processo de envelhecimento (1,5 ou 6 meses em água destilada a 37 ° C), com Opalescence (®) PC15% durante 6 horas (simulação de clareamento caseiro) ou PH35%, durante 0,5 h (simulação de clareamento de consultório). Na sequência, as amostras foram incubadas em etanol/água (3:1) a 37° C durante 7 dias. Os eluatos foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Espécimes não clareados foram utilizados como controles. Os resultados mostraram que o clareamento aumenta a quantidade de

substâncias após eluição, sendo maior quando da realização do envelhecimento ou dependendo da concentração do gel clareador. O Composto 2-metacrilato de hidroxietilo foi encontrado em grande quantidade na resina Tetric EvoCeram (®) após tempo de irradiação de 5s e clareamento com 15% de PC) como produto de destruição. O composto dietoxydimethylsilano foi encontrado em todos os eluatos a partir de amostras branqueadas, mas não nos grupos controle. Esta substância pode ter se formado por oxidação do composto 3-metacriloxi-propiltrimetoxisilano, indicando que a ligação entre as partículas de carga e a matriz orgânica pode ter se enfraquecido após o branqueamento. Assim, os autores concluem que géis clareadores podem alterar as propriedades físicas dos compósitos à base de resina, especialmente para baixos tempos de fotopolimerização e restaurações recém-realizadas.

Pirollo et al.¹¹¹ (2014) investigaram a influência que bebidas com corantes podem ter sobre a estabilidade de cor de esmalte dental bovino clareado, considerando o tempo decorrido após o clareamento. Para isso, 60 incisivos bovinos, divididos em 10 grupos, foram clareados com peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Max, FGM, Joinville, SC, Brazil). As leituras de cor foram realizadas antes do clareamento e após, sendo utilizado para a leitura um espectrofotômetro (Spectro Shade MICRO) que utiliza o sistema CIE-Lab. Após o clareamento, os dentes foram expostos durante 5 minutos ao café e refrigerante a base de cola em diferentes períodos de tempo a saber: 10 minutos após, 1, 24, 48 e 72 horas após clareamento. As variações de cor (ΔE) e de luminosidade (ΔL) foram obtidas a partir das abcoordenadas CIE-Lab e utilizando um aparato para fixar espectrofotômetro e elemento dental com a finalidade de padronizar as leituras. Os dados foram submetidos a *two way* - ANOVA seguida de pós – teste de Tukey HSD ($p < 0,05$). Os autores observaram diferenças significativas entre os grupos tanto para os valores de ΔE quanto para os de ΔL ($p < 0,001$). Todos as amostras apresentaram redução dos valores de ΔL (brilho). Os valores mais acentuados de ΔE foram observados para os dentes manchados com refrigerantes a base de cola nos tempos de 10 minutos e 1 horas após clareamento. Os autores concluíram que a exposição ao café após clareamento dental promove menores alterações de cor do que quando em contato com refrigerantes a base de cola independentemente do tempo “pós – clareamento”.

Um estudo realizado por Parreiras et al.¹⁰⁵ (2014) investigou a permeabilidade, a microdureza, e possíveis alterações minerais em esmalte após clareamento de consultório ativado por LED/LASER (470 nm; 200 mW) Whitening Lase Light Plus, DMC Odontológica, São Carlos, SP, Brasil). Para isso, 51 prés- molares foram divididos em três grupos (clareamento sem luz; clareamento ativado com luz; controle) e submetidos a clareamento com peróxido de hidrogênio 35% (Whiteness HP Maxx, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, os dentes foram corados com solução de sulfato de cobre e ácido rubeânico e mantidos por 5 minutos em ambiente com vácuo para que o corante penetrasse no substrato dental. Posteriormente, as amostras foram incluídas em resina acrílica e três cortes transversais foram realizados para analisar, em microscopia, a penetração do corante no interior do esmalte. As medidas de microdureza *Knoop* (25g de carga por 5 segundos) foram realizadas previamente aos tratamentos, imediatamente após e 7 dias depois (n = 20). A avaliação da superfície mineral foi realizada em MEV (microscópio eletrônico de varredura) após a realização dos clareamentos, sendo o controle, o padrão de comparação. Os dados foram analisados (*one-way* ANOVA e teste de Tukey para comparações múltiplas; $\alpha = 0,05$) e os resultados mostraram que tanto para a variável “permeabilidade do esmalte” quanto para a variável “alteração mineral da superfície” não foram encontradas diferenças significativas em relação aos respectivos grupos controles, no entanto, para a variável microdureza, houve uma redução significativa da dureza ($p < 0,001$) após clareamento para os dois grupos. Desse modo, os autores concluíram que a realização de clareamento de consultório ativado por luz pode promover alterações significativas no esmalte quando comparado ao clareamento sem a fotoativação.

de Andrade et al.⁴² (2015) realizaram um estudo para investigar o efeito de soluções corantes sobre a microdureza superficial e a estabilidade de cor de resinas compostas nanoparticuladas (Filtek Supreme XT; 3MESPE, St Paul, MN, USA-FS) após serem submetidas a procedimentos de clareamento (Whiteness perfect a 10%; Whiteness perfect a 16%; Whiteness HP a 35% - FGM). Corpos de prova (n = 135; 10 mm x 2 mm) foram confeccionados a partir de uma matriz circular de acrílico, polidos (Sof-Lex Pop On - 3M ESPE, St Paul, MN, USA), estocados por 24 horas e aleatoriamente divididos em 3 grupos (Peróxido de carbamida a 10%; Peróxido de carbamida a 16%; Peróxido de

hidrogênio a 35%). Os procedimentos de clareamento seguiram protocolo estabelecido pelo fabricante e, 24 horas após clareadas, as amostras de cada grupo foram subdivididas em 3 subgrupos, onde cada um teve seus espécimes imersos em 200 mL de solução (café; vinho tinto; água destilada) durante 40 dias (3 horas por dia de imersão). Os procedimentos de leitura de cor foram realizados em 3 tempos distintos (antes do clareamento, imediatamente após o clareamento e após 40 dias de imersão) com auxílio de espectrofotômetro (VITA Easyshade – VITA Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany). Para microdureza *knoop* (50 g de carga por 15 segundos), os mesmos tempos de avaliação foram utilizados. Os resultados encontrados mostraram que os valores de microdureza foram significativamente inferiores nos espécimes pertencentes ao grupo “Peróxido de hidrogênio a 35%” ($p < 0,0001$). Além disso, os espécimes que foram expostos à solução de vinho tinto e café apresentaram diminuição da microdureza quando comparados ao grupo controle, sendo que o tipo de clareamento a que eles haviam sido expostos não foi significativo. Para a variável cor, os autores observaram que os espécimes pertencentes ao grupo “Peróxido de hidrogênio a 35%” se mostraram mais claros ($p < 0,05$) do que os pertencentes aos outros grupos de tratamento. Os autores concluíram que independentemente do tipo de clareamento realizado, os espécimes foram escurecendo com o passar dos dias de imersão nas soluções corante.

Pitacas et al.¹¹² (2015) investigaram os efeitos do clareamento dental sobre a superfície de dois tipos de resinas compostas (Tetric EvoCeram® - nanohíbrida; Filtek Supreme XT® - nanoparticulada), por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, 9 corpos de prova (10 mm x 2 mm) de cada resina foram confeccionados a partir de uma matriz de silicone circular, armazenados em água destilada (37°C; 24 horas), polidos (OptiDisc®, Kerr, Orange, MN, USA) e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (peróxido de carbamida (CP) a 10%; CP a 22%; grupo controle). Os espécimes pertencentes aos grupos clareamento foram expostos ao seu respectivo gel por 6 h diárias durante 14 dias. Os espécimes dos grupos controles ficaram expostos somente à água destilada. Finalizados os procedimentos de clareamento, os espécimes foram mantidos em água destilada por 14 dias e, na sequência, observados ao MEV. Os resultados da análise ao MEV das resinas expostas aos géis de peróxido de carbamida revelaram alterações superficiais como fendas e porosidade, demonstrando que existiu separação

entre a matriz orgânica da resina e o conteúdo inorgânico, independentemente da concentração utilizada. As imagens mostraram que as alterações encontradas foram mais pronunciadas na resina nanohíbrida. Os autores concluíram que independentemente da concentração do gel, agentes clareadores à base de peróxido de carbamida induzem o surgimento de alterações superficiais nas resinas testadas.

Donassollo et al.⁵⁰ (2016) publicaram um estudo que objetivou avaliar *in vitro* e *in situ* os efeitos de dois tipos de clareamento dental sobre a microdureza *knoop* superficial de esmalte dental humano. Para isso, 60 blocos de esmalte foram confeccionados a partir de terceiros molares recém-extraídos, polidos e divididos em quatro grupos a saber: peróxido de hidrogênio a 10% (HP); tiras de clareamento contendo peróxido de hidrogênio a 10% (WS) para a condição *in vitro* e os mesmos tipos de clareamento para a condição *in situ*. Para a condição *in vitro*, os espécimes foram submetidos ao clareamento durante 14 dias, 1 hora por dia; para a condição *in situ*, 6 voluntários utilizaram por 14 dias dispositivos intra-orais contendo 3 blocos de esmalte, sendo que o aparelho era removido 1 hora por dia para realização de clareamento sobre os blocos de esmalte. As leituras de microdureza (50 g de carga por 10 segundos) foram realizadas antes e depois de finalizado o procedimento de clareamento. Os resultados mostraram (ANOVA com pós – teste de Tukey) que na condição *in situ* não houve redução significativa da microdureza ($p > 0,05$), enquanto que na condição *in vitro*, a redução da dureza foi significativa ($p < 0,05$). Além disso, em relação aos agentes de clareamento utilizados, os resultados da condição *in situ* não mostraram diferença entre HP e WS, enquanto que WS, para a condição *in vitro*, promoveu redução nos valores de dureza. Desse modo, os autores concluíram que não houve efeito deletério sobre o esmalte produzido por qualquer um dos protocolos de clareamento utilizados no modelo *in situ*. A redução de dureza só foi observada *in vitro*.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da PDI mediada pela CUR em diferentes formulações para eliminação de biofilme formado por micro-organismos bucais e os possíveis efeitos que essa terapia pode promover sobre propriedades superficiais de materiais restauradores e esmalte dental bovino.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a eficácia antimicrobiana da PDI utilizando diferentes formulações e concentrações de CUR em modelo in vitro de biofilme dental, de modo a definir o protocolo com maior potencial antimicrobiano.

3.2.2 Avaliar o efeito que protocolo de PDI previamente definido pode possuir sobre a estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de diferentes resinas compostas e esmalte dental.

3.2.3 Avaliar a eficácia antimicrobiana do protocolo previamente definido sobre biofilmes formados in situ em superfície dental de diferentes indivíduos – Estudo piloto.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para atender aos três objetivos específicos descritos, foi proposta a realização de três estudos consecutivos. Para facilitar o entendimento das etapas metodológicas, cada estudo será descrito separadamente nas subseções a seguir.

4.1 Estudo 1 - Efeito Fotodinâmico da Curcumina em Diferentes Formulações Sobre Biofilmes Formados In Vitro

4.1.1 Delineamento experimental

Trata-se de estudo experimental laboratorial. Para cada micro-organismo investigado (*Streptococcus mutans*; *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*), a variável dependente avaliada foi o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Para avaliação das UFC/mL, as variáveis independentes consideradas foram o tipo de formulação em 4 níveis (DMSO, Eumulgin, Quitosana e Ácido Oleico) e o tratamento antimicrobiano em quatro níveis (C-L-: CUR e luz ausentes; C-L+: CUR ausente e luz presente; C+L-: CUR presente e luz ausente; C+L+: CUR e luz presentes).

As contagens de colônias das três espécies foram realizadas por um pesquisador devidamente calibrado.

4.1.2 Formulações de curcumina e aparelho de iluminação

Os fotossensibilizadores utilizados neste estudo foram formulações de CUR (Figura 1) veiculadas em três diferentes sistemas de hidrogel (Eumulgin, Ácido Oleico e Quitosana) e em quatro concentrações distintas (20, 40, 60 e 80 μ M). As formulações em hidrogel foram preparadas e fornecidas pela equipe do Prof. Dr. Marlus Chorilli (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP). A formulação denominada nesse estudo como sendo veiculada em Ácido oleico é um sistema composto

por 40% de ácido oleico (fase oleosa), 40% procetyl (tensoativo) e 20% de dispersão de Carbopol (fase aquosa) 940 0,5% ²⁶. Já as formulações denominadas como sendo veiculadas em Quitosana e em Eumulgin são sistemas compostos por quitosana 2,5% (fase aquosa) + poloxamer 17% (copolímero que possui em sua composição uma porção hidrofóbica e duas porções hidrofílicas – fase oleosa) ^{26, 75, 136} e 40% Eumulgin + 50% óleo de copaíba + 10% água, respectivamente. A CUR diluída em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 80 µM foi utilizada para comparação, e foi preparada solubilizando-se o pó de CUR em DMSO com posterior diluição em solução salina até a obtenção da concentração desejada de forma a manter o DMSO a 10%. A fonte de luz utilizada foi um equipamento com lâmpadas LED (diodo emissor de luz) com emissão de luz predominantemente em 455 nm ± 10, que permitiu a iluminação de todos os orifícios de uma mesma placa de maneira uniforme e simultânea, com potência em 22 mW/cm². A dose de luz avaliada foi de 18 J/cm², que corresponde a 14 minutos de iluminação.

Figura 1- Embalagem comercial do fotossensibilizador Curcumina (Sigma – Aldrich).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

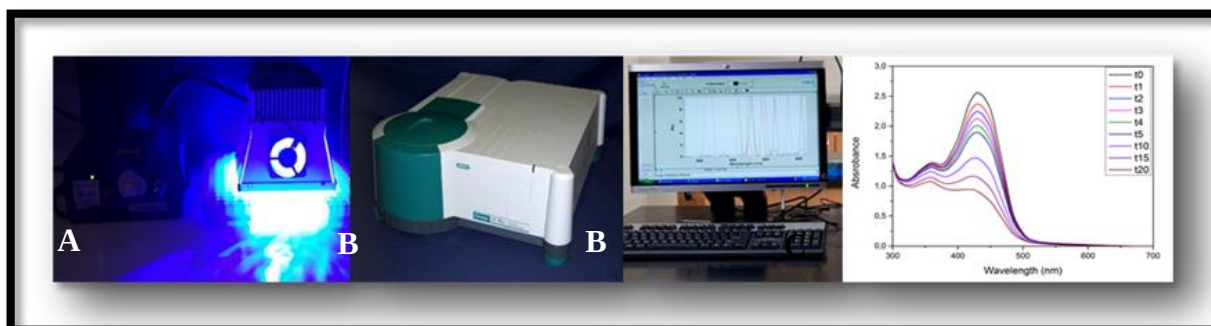
4.1.3 Avaliação das características ópticas das formulações de curcumina – taxa de fotodegradação

A avaliação das características ópticas foi necessária para nortear a formulação em hidrogel mais adequada para os testes microbiológicos.

As características ópticas das formulações de CUR (Eumulgin, Ácido Oleico e Quitosana) foram investigadas em função do tempo de iluminação utilizado. As formulações de CUR, em todas as concentrações (20, 40, 60 e 80 μM), foram preparadas e iluminadas durante um total de 30 minutos por um equipamento de LED azul (455 nm $\pm$ 10) denominado “Biotable” (Figura 2A), o qual foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC – USP). O espectro de absorção foi obtido usando-se um espectrofotômetro *multiscanner* (Cary 50 Bio, Varian – Figura 2B) e as medidas foram realizadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos (1,32; 2,64; 3,96; 5,28; 6,6; 13,2; 19,8; 26,4; 33,0; 39,6 J/cm², respectivamente). As absorbâncias das formulações, para cada concentração, foram representadas graficamente em função do comprimento de onda (Figura 2C). Subsequentemente, o comprimento de onda de 425 nm foi utilizado para a análise temporal da fotodegradação da CUR. Dessa forma foi possível calcular a taxa de fotodegradação de cada formulação de CUR.

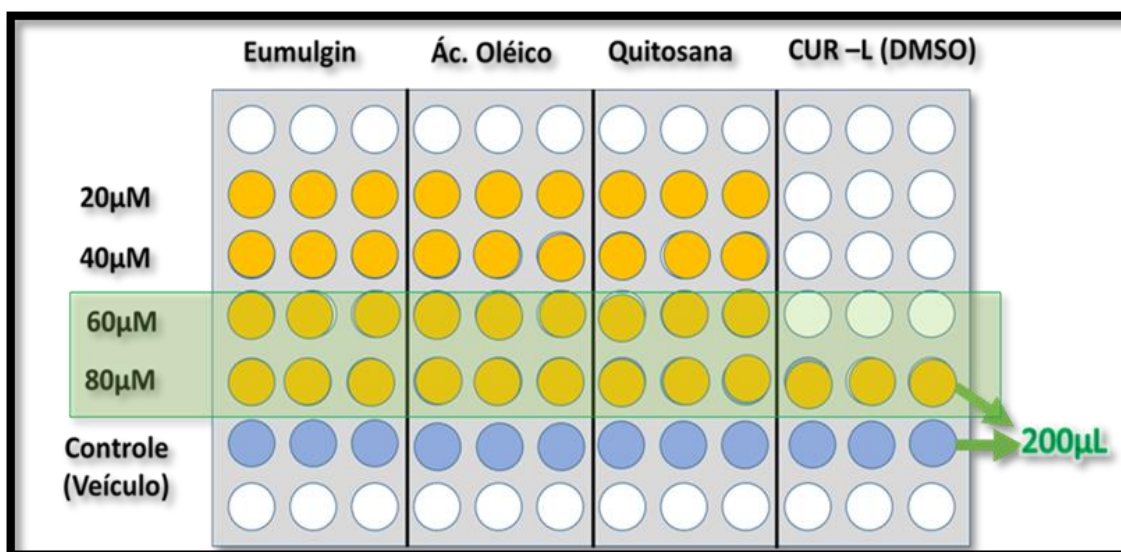
Para esta etapa, foram aliqüotados 200 μL de cada formulação e concentração nos orifícios de uma placa de 96 poços. Em seguida as amostras foram iluminadas e imediatamente inseridas no equipamento para análise da fotodegradação em função do tempo de iluminação. Esta etapa foi realizada em triplicata, em 2 ocasiões distintas para todas as concentrações (n=6). Os resultados preliminares indicaram que as concentrações de 20 μM e 40 μM degradaram rapidamente em todas as formulações, não permitindo uma análise detalhada. Assim, as concentrações utilizadas para os ensaios finais de fotodegradação foram 60 μM e 80 μM para todas as formulações de hidrogel avaliadas (n=9). A CUR líquida, veiculada em DMSO, serviu como parâmetro para os testes de fotodegradação realizados para a seleção das formulações e concentrações de CUR hidrogel que foram utilizadas no Estudo I (Figura 3).

Figura 2 - A – Equipamento LED (Biotable); B - UV- Visible Spectrophotometer (Cary 50 Bio, Varian); C – Curvas de decaimento.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 3 – Imagem ilustrativa das formulações e concentrações testadas para análise da taxa de fotodegradação e decisão de qual formulação hidrogel seria utilizada no Estudo I.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.4 Etapa microbiológica

4.1.4.1 Adequação da metodologia

Cepas de referência das espécies de *Streptococcus mutans* (Sm; UA 159 ATCC 700610), *Lactobacillus casei* (Lc; ATCC 4646) e *Candida albicans* (Ca; ATCC 90028) foram utilizadas para formação de biofilme mono - espécie.

Inicialmente, realizou-se a reativação dos micro-organismos (MOs) e confecção dos repiques, sendo que para isso, culturas individuais de cada espécie foram descongeladas e uma alíquota de 100 µL da cultura pura de cada MO foi plaqueada individualmente em placas de Petri contendo meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco) a 37°C por 48 horas, em estufa de CO₂. Decorrido o período de incubação, foi realizada a análise dos MOs em microscópio óptico para se constatar a pureza dos mesmos e iniciou-se a etapa de congelamento para criação de banco de estoque de congelados, os quais permaneceram assim até o momento de sua utilização.

A calibração estatística para contagem de colônias microbianas foi realizada previamente ao início dos experimentos. Para isso, após descongelamento dos micro-organismos, alíquotas das suspensões de cada MO foram diluídas serialmente, plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura (MRS – Man Rogosa Sharpe (Difco); Mitis Salivarius (Difco)) e incubadas (37°C/48 horas) para permitir o crescimento das colônias. Decorrido o período de incubação, as placas contendo meio de cultura MRS foram colocadas sobre um fundo preto e as placas contendo Mitis foram colocadas sobre fundo branco para prosseguir com as tomadas fotográficas realizadas com uma câmera digital de forma padronizada (Figura 4). Após treinamento dos examinadores, o número de colônias foi determinado por meio de imagens digitais para permitir que as colônias de uma mesma placa fossem contabilizadas mais de uma vez. O tamanho amostral adotado foi de 20 amostras (n=20). A contagem das colônias foi realizada utilizando-se o software Adobe Photoshop por dois examinadores (E1; E2) cegos em relação à amostra aferida, e em dois momentos distintos (intervalo de 24 horas). A reprodutibilidade intra e inter-examinadores foi avaliada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI) para

os meios de cultura, ágar Mitis e MRS. O pesquisador responsável pela contagem de colônias fúngicas havia sido previamente calibrado devido em estudo prévio ($CCI \geq 0,993$).

Figura 4 – Tomada fotográfica das placas de Petri e posterior contagem das colônias.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Estabelecida a calibração, previamente à realização dos testes microbiológicos, deu-se prosseguimento à etapa microbiológica com a realização da curva de crescimento de Sm e de Lc para padronização da concentração celular. Para avaliação das curvas de crescimento, as cepas foram descongeladas e cultivadas individualmente em placas de Petri contendo BHI ágar sob condições de microaerofilia por 48 horas à 37° C. Em seguida, 10 colônias de cada MO foram individualmente e aleatoriamente inoculadas em tubos contendo caldo BHI glicosado, os quais foram incubados em estufa de CO₂ à 37 °C por 18 horas (pré-inóculo - PI). Posteriormente, alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para novos tubos contendo BHI glicosado estéril (inóculo - I), os quais foram incubados por 12 horas (CO₂; 37°C). A cada hora, foram realizadas leituras de densidade óptica (DO) a 600 nm. Tanto para a cepa de Sm quanto para Lc, o experimento foi realizado em triplicata, no entanto, para Sm foram realizadas quatro ocasiões independentes (n=12),

sendo que a partir da segunda ocasião também foi realizado o plaqueamento das amostras para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Já para a cepa de Lc, foram feitas quatro ocasiões independentes para analisar o padrão de crescimento no tempo de 12 horas (n=12) e uma ocasião para avaliar o comportamento do MO para o tempo de 10 horas até 22 horas de crescimento (n=3). Com os parâmetros das curvas de crescimento e com os resultados da análise de fotodegradação finalizada, foi possível dar continuidade ao Estudo I com a avaliação da PDI sobre os biofilmes.

4.1.4.2 *Formação dos biofilmes*

Para a reativação das cepas de Lc, 10 colônias foram inoculadas em tubo *falcon* contendo 10 mL (PI) de BHI caldo glicosado, gentilmente agitado em vórtex e incubado em estufa de CO₂ por 18 horas (Dia “Zero”). Após, 500 µL foram removidos do PI e inseridos em novo tubo *falcon* contendo 9,5 mL de BHI caldo glicosado (I) e deixados em estufa de CO₂ por mais 9 horas (Dia “1”). O mesmo se fez para as cepas de Sm, no entanto, o tempo de I foi de 3 horas e 30 minutos. Em seguida, procedimentos de centrifugação (4000 rpm por 5 minutos; 3 vezes) e lavagem com tampão fosfato salino (PBS; 2 vezes) foram realizados e os MOs foram ressuspensos em solução salina estéril (SSE) para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro (Biospectro) (DO: 0,15; 600 nm) e verificação da concentração celular (10⁸ células/mL). Posteriormente, 100 µL de cada MO foram pipetados individualmente em cada orifício da placa de 96 poços e estas colocadas em jarra de microaerofilia em agitador orbital (70 rpm; 37°C) por 1 hora e 30 minutos para promover a adesão celular.

Decorrido o período de adesão, as placas de 96 poços foram removidas do agitador orbital e lavagens (PBS; 2 vezes) foram realizadas para remover as células que não se aderiram ao fundo do orifício da placa. Em seguida, foram inseridos 150 µL de meio de cultura líquido (BHI glicosado) em cada poço da placa, a qual foi novamente levada ao agitador orbital (70 rpm; 37°C; 48 horas) para crescimento do biofilme. Após 24 horas de crescimento em agitador orbital, realizou-se a troca do meio de cultura por meio fresco (Dia “2”) com posterior recolocação das placas de 96 poços no agitador orbital até que as 48 horas fossem atingidas.

Para a reativação de Ca uma alçada do MO foi semeada em tubos *Falcon* contendo 5 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute médium; Sigma Aldrich), os quais foram incubados a 37°C por 13 horas. Após a incubação, foi possível verificar o crescimento microbiológico por meio da turvação do meio de cultura. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 4000 rpm, durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células (sedimentado) foram lavadas com 5 mL de PBS. Os passos de centrifugação foram repetidos mais duas vezes, sendo intercalada uma lavagem. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em SSE até que a concentração celular no interior do tubo de ensaio fosse equivalente a 10^7 células/mL (Turbidímetro = 1,0).

Finalizado o período para formação dos biofilmes, as placas foram removidas do agitador e os protocolos fotodinâmicos foram aplicados para avaliação da eficácia antimicrobiana.

4.1.4.3 *Tratamento fotodinâmico*

A susceptibilidade dos MOs à PDI foi avaliada por meio da exposição do biofilme às diferentes formulações de CUR (hidrogel e líquida). Inicialmente, havia sido proposta a utilização de CUR líquida a 80 μ M e 3 formulações de CUR hidrogel em 4 concentrações distintas (20, 40, 60 e 80 μ M), no entanto, após adequação de metodologia e análise dos resultados das taxas de fotodegradação das formulações de CUR hidrogel (Tabela 1), decidiu-se por utilizar CUR líquida a 80 μ M, e 2 formulações de CUR hidrogel ambas também a 80 μ M (quitosana e ácido oleico). Como já especificado, o equipamento LED utilizado foi a “Biotable”, a qual foi ajustada para emitir energia luminosa a uma intensidade constante de 22 mW/cm².

Para cada cepa foram avaliadas as condições experimentais denominadas de C+L+, C+L-, C-L+ e C-L-. Dessa forma, foram avaliadas 12 condições experimentais para cada MO, totalizando 36 condições experimentais executadas. Após fase de adesão e crescimento de biofilme, as placas de 96 orifícios foram tiradas do agitador e lavadas com 150 μ L de PBS por 3 vezes para remover o meio de cultura e para que, na sequência, as

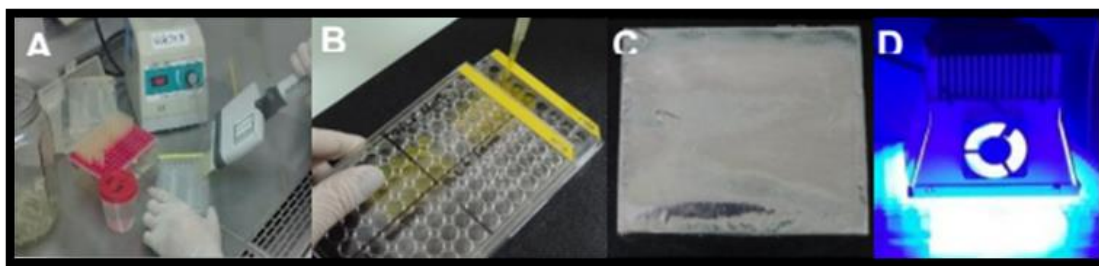
soluções teste fossem inseridas (Dia “3”). Todos os procedimentos estão descritos a seguir.

• **C+L+**

Foram pipetados 200 µL de cada solução teste nos poços contendo o biofilme e deixados repousando em ambiente livre de iluminação por 5 minutos para permitir a fossensibilização das amostras (tempo de pré – irradiação; PIT). Após esse período, a placa foi colocada sob o aparelho de iluminação LED e este foi acionado de modo que todos os orifícios foram iluminados uniformes e simultaneamente por 14 minutos - (Figura 5). O tempo pelo qual a placa foi iluminada esteve de acordo com a dose de luz avaliada (18,0 J/cm²) e foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{Dose (J/ cm}^2\text{)} = \text{Intensidade (W/ cm}^2\text{)} \times \text{Tempo (segundos)} \quad (1)$$

Figura 5 – Lavagem dos biofilmes (A), inserção do fotossensibilizador (B), incubação no escuro (C) e iluminação com Biotable (D).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

• **C+L-**

Esse grupo foi avaliado para que se verificasse a existência ou não de efeitos tóxicos após a aplicação das diferentes formulações de CUR sobre os biofilmes. Para isso, amostras sensibilizadas com as formulações de CUR (Líquida, Hidrogel Quitosana e Microemulsão Ácido Oleico) não foram iluminadas com o LED. Em cada orifício das placas que continha o biofilme, foram aliqüotados 200 µL da solução teste e, em seguida,

as placas foram deixadas em repouso, livres de iluminação por 19 minutos (tempo equivalente ao período de incubação no escuro somado ao tempo utilizado para a máxima dose de luz aplicada nas amostras C+L+).

• **C-L+**

De forma semelhante à condição anterior, este grupo objetivou avaliar se a aplicação de luz na ausência da CUR poderia apresentar efeitos tóxicos para os biofilmes dos MOs avaliados. Assim, os biofilmes alocados nos grupos sem fotossensibilização foram tratados com alíquotas de 200 µL dos veículos utilizados para o preparo da CUR (CUR líquida – 180 µL de SSE + 20 µL de DMSO; CUR em Ácido Oleico – 200 µL do sistema denominado microemulsão Ácido Oleico; CUR hidrogel Quitosana – 200 µL do sistema denominado hidrogel Quitosana) e em seguida, foram expostos à luz de acordo com a dose definida. A placa foi deixada em repouso e livre de iluminação por 5 minutos, sendo em seguida colocada sob o aparelho LED para ser iluminada na dose de luz proposta (18 J/cm²).

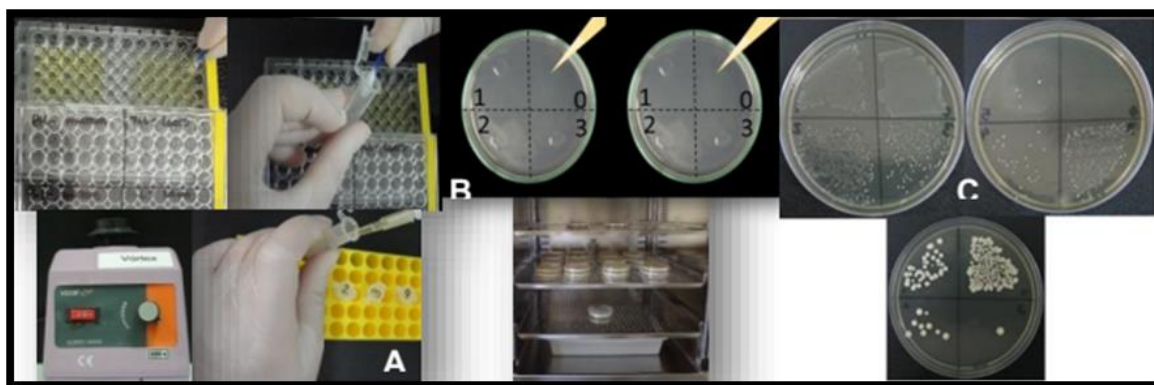
• **C-L-**

Neste grupo experimental, foram incluídas amostras que não foram submetidas aos procedimentos de PDI. Portanto, para isso, os biofilmes alocados neste grupo, de forma semelhante ao grupo C-L+, foram tratados com alíquotas de 200 µL dos veículos utilizados para o preparo das diferentes formulações de CUR. Em seguida, a placa foi deixada em repouso e livre de iluminação pelo período de 19 minutos (tempo equivalente ao período de incubação no escuro somado ao tempo utilizado para a máxima dose de luz aplicada nas amostras C+L+).

É importante salientar que as condições experimentais descritas acima foram realizadas para todos os MOs e para cada uma das formulações individualmente. Para todas as condições e formulações avaliadas, o biofilme contido em cada poço da placa de 96 orifícios foi removido primeiramente retirando-se todo o conteúdo do poço com o auxílio de uma micropipeta e pipetando-o em um *ependorf* contendo 1000 µL de SSE.

Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril, foram realizados movimentos circulares por 30 segundos para remover totalmente o conteúdo do poço. O *swab* foi colocado dentro do *eppendorf*, o qual foi agitado em vórtex por 1 minuto para o desprendimento das células para a SSE. Em seguida, para todas as condições testadas, deu-se início à diluição decimal seriada, onde, para biofilmes formados pela cepa de Ca, diluiu-se de 10^{-1} até 10^{-3} e para Lc e Sm, de 10^{-1} até 10^{-4} . Depois, alíquotas de 25 μ L foram semeadas, em duplicata, em placas de *Petri* contendo meio de cultura SDA (ágar sabouraud dextrose; Acumedia) para Ca e BHI para Sm e Lc. Posteriormente, para Ca, as placas foram incubadas em estufa por 48 horas a 37°C e para Sm e Lc, as placas de *Petri* foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por 48 horas para permitir o crescimento das unidades formadoras de colônia. Decorrido o período de incubação, a quantificação das células viáveis após os tratamentos foi efetuada pela realização da contagem das UFC/mL com o auxílio do software Adobe Photoshop após realização das fotografias (Figura 6).

Figura 6 – Remoção dos biofilmes e diluição decimal seriada (A), plaqueamento em duplicata e incubação (B), unidades formadoras de colônia por mL (C).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.5 Delineamento estatístico

Os valores de UFC/mL foram transformados em logaritmo de base 10 ($\log_{10}$) e a análise estatística descritiva foi realizada. O pressuposto de normalidade foi avaliado grupo a grupo (Shapiro-Wilk e medidas de forma) tendo sido atendido. O teste de Levene constatou heterocedasticidade. A significância do efeito dos fatores ‘Grupo de tratamento’ e ‘Formulação’ sobre os valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ foi avaliada por meio de Análise de Variância a dois fatores independentes e, quando necessário, o pós-teste de Games-Howell foi utilizado para comparação de médias grupo a grupo. O nível de significância adotado foi de 5%.

4.2 Estudo 2 - Efeito Fotodinâmico com Curcumina na Estabilidade de Cor, Microdureza e Rugosidade Superficial de Materiais Restauradores e Esmalte dental.

4.2.1 Delineamento experimental

Trata-se de estudo experimental duplo-cego, apresentando cegamento tanto o pesquisador responsável pelas medidas quanto o estatístico. Para análise do efeito sobre o material restaurador, as variáveis dependentes consideradas foram estabilidade de cor (ΔE), rugosidade superficial (Ra em μm) e microdureza *Vickers* (Kgf). Como variáveis independentes foram o tipo de resina composta em 3 níveis (a. TPH *spectrum*, Dentsply; b. Amelogen®Plus, Ultradent®, South Jordan, USA; c. Z350 Filtek™ Supreme Ultra Universal Restorative, 3M ESPE), tratamento antimicrobiano em 3 níveis (a. CN: controle negativo- somente saliva artificial; b. AcO: controle positivo- veículo da formulação em ácido oleico; c. PDI: Inativação Fotodinâmica, C+L+) e tempo de avaliação (estabilidade de cor - 9 níveis: imediatamente, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 30 dias, 60 dias após o tratamento; rugosidade superficial e microdureza – 2 níveis: antes e 60 dias após o tratamento), sendo a imersão em saliva artificial nas primeiras 24 horas considerada como *baseline*. Para análise do efeito sobre a superfície de esmalte dental bovino, as variáveis dependentes consideradas foram estabilidade de cor, rugosidade superficial e microdureza *Knoop*, e as variáveis independentes foram os mesmos tratamentos e tempos de avaliação.

As leituras de cor, rugosidade e microdureza para todos os tipos de resina foram realizadas por um pesquisador devidamente calibrado. Do mesmo modo, para os corpos de prova em esmalte, todas as leituras foram efetuadas após calibração do pesquisador. Atestada a calibração, o estudo piloto foi conduzido, de forma independente para cada uma das variáveis: estabilidade de cor, dureza e rugosidade, para determinação do tamanho da amostra a ser adotada no experimento definitivo. O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se o software GPower, considerando $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$, e verificou-se que o tamanho amostral mínimo para as leituras foi de 20 amostras por grupo

para os três tipos de resina composta e, para os corpos de prova em esmalte, o tamanho amostral foi de 30 por grupo.

4.2.2 Materiais utilizados para confecção dos corpos-de-prova

Foram utilizadas três diferentes resinas compostas (TPH *spectrum* (Dentsply); Amelogen®Plus (Ultradent®, South Jordan, USA); Z350 Filtek™ Supreme Ultra Universal Restorative (3M ESPE), todos na cor A2 em virtude de ser a cor mais utilizada na rotina clínica e como forma de padronização da cor inicial embora tenham existido diferenças de matizes entre as marcas (Figuras 7 e 8).

✓ TPH *spectrum* (Dentsply) (TPH), um material restaurador microhíbrido de alta definição, alto polimento e performance total com consistência esculpível e baixa pegajosidade o qual, devido às partículas incorporadas em sua matriz, possui menor contração de polimerização e uma lisura superficial bastante satisfatória, de modo que possibilita seu uso tanto em restaurações estéticas anteriores quanto em dentes posteriores ^{114, 130, 139}.

✓ Amelogen®Plus (Ultradent®, South Jordan, USA) (AML), um material restaurador do tipo microhíbrido, o qual, por possuir partículas inorgânicas de baixo peso molecular, apresenta bom polimento superficial ^{121, 139}.

✓ Filtek™ Supreme Ultra Universal Restorative (3M ESPE) (Z350), compósito composto de nanopartículas e nanoclusters, o que reduz o espaço intersticial entre as partículas, aumentando a quantidade de carga e ocasionando em um material mais duro e resistente ao desgaste. Tal resina composta pode ser usada tanto em dentes anteriores como em restaurações de dentes posteriores ^{109, 126}.

As especificações dos materiais restauradores utilizados encontram-se na Figura 7 localizada na página seguinte.

Figura 7- Especificações quanto à composição das resinas utilizadas no estudo a partir de seus respectivos perfis técnicos.

		Composição		Cor	Fabricante
	Conteúdo orgânico	Partículas de carga	Outros componentes		
AML	Bis-GMA	Partícula não especificada de tamanho médio 0,7µm.	Não especificado	A2	Ultradent Products Inc. - South Jordan, UT (EUA)
TPH	BisGMA Uretano modificada	Vidro de bário silanizado, boro silicato de alumínio e sílica pirolítica silanizada. Tamanho médio: 1,30µm.	Canforoquinona como fotoiniciador, EDAB, Hidroxitolueno Butilado, corantes minerais	A2	DENTSPLY Ind. e Com. Ltda. - Rua Alice Hervê, 86 - Petrópolis, RJ
Z350	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA e Bis-EMA	Sílica, zircônia, cluster de zircônica/sílica	Não especificado	A2	3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, USA

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 8- Z350 Filtek™ Supreme Ultra Universal Restorative, Amelogen®Plus, TPH spectrum.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

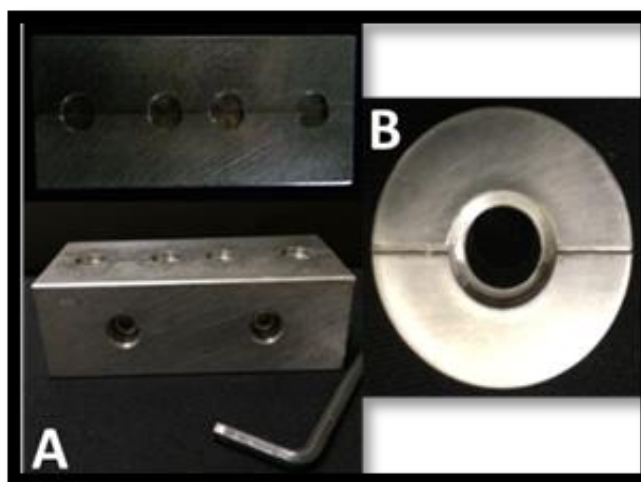
Adicionalmente, corpos de prova em esmalte dental bovino foram confeccionados a partir de dentes de boi ^{129, 167}. A utilização de dentes de origem animal foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Anexo A).

4.2.3 Confeção dos corpos de prova

Os corpos de prova (cps) de resina composta foram confeccionados a partir de uma matriz de aço hemiseccionada (Figura 9) com quatro orifícios circulares de 10 mm

de diâmetro e 2 mm de espessura sendo o material restaurador acomodado no seu interior em um único incremento (Figura 10 A1 e A2).

Figura 9- Matriz metálica hemiseccionada com quatro orifícios circulares de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (A); matriz metálica circular com o mesmo diâmetro e espessura (B).

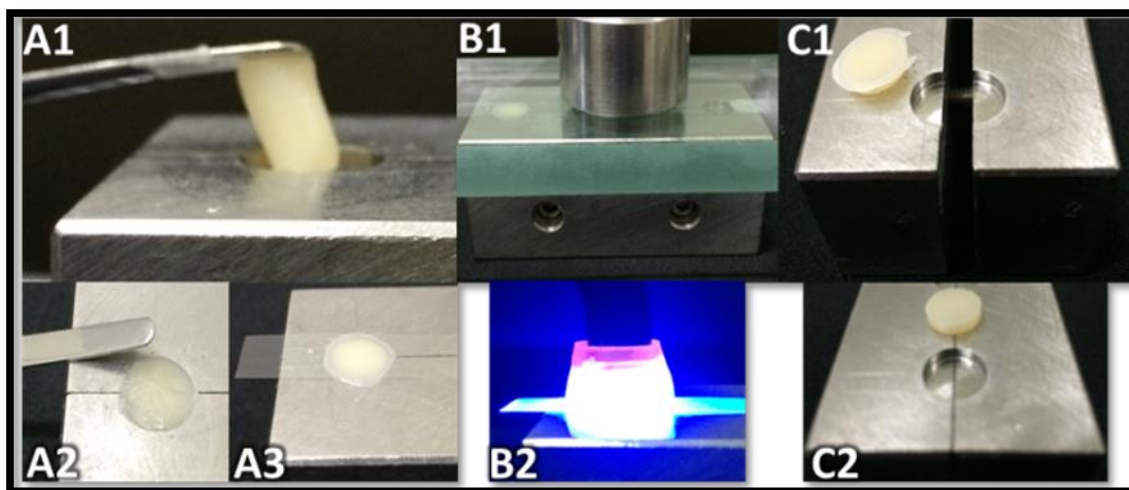


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Em seguida, sobre a sua superfície foi colocada uma matriz de poliéster e uma placa de vidro (Figura 10 A1, A2 e A3) ⁴⁴. Um peso de 1kg foi aplicado por 30 segundos para permitir o escoamento do excesso do material e deixar a superfície lisa e padronizada (Figura 10 B1) ⁴⁴. Decorrido os 30 segundos, o peso e a placa de vidro foram removidos e a fotopolimerização (Figura 10 B2) individual de cada cp foi realizada por 40 segundos, com um aparelho LED (Gnatus – OptilightMax; densidade de potência de 1500 mW/cm²) – Figura 10 ⁴⁴.

Finalizada a polimerização, tanto a tira de poliéster quanto os espécimes foram removidos da matriz metálica e, em seguida, o excesso escoado de resina composta foi removido com auxílio de uma lâmina de bisturi do tipo 15C (Figura 10 C). É necessário informar que o aparelho LED utilizado teve sua potência aferida e comprovada no LAT (Laboratório de Apoio Tecnológico) do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP previamente à confecção dos espécimes. Adicionalmente, um anel de borracha foi posicionado na ponta da fibra ótica para a padronização da distância da fotopolimerização de forma a minimizar erros sistemáticos.

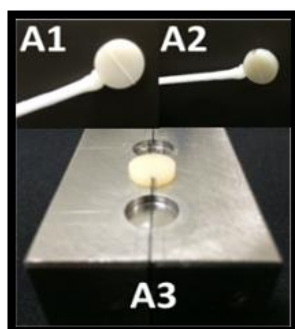
Figura 10- Inserção (A1 e A2), posicionamento da tira matriz de poliéster (A3); placa de vidro com peso de 1 kg sobre os orifícios (B1) e fotopolimerização (B2); espécime apresentando bordas com excesso de material (C1) e após a remoção do excesso com lâmina de bisturi (C2).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Por se tratar de uma matriz metálica bipartida, a parte de baixo do espécime, após fotopolimerização, intencionalmente apresentou uma ranhura, a qual foi útil para diferenciarmos o lado a ser polido, bem como para posicionarmos o cp nas outras matrizes para realização das leituras de microdureza, rugosidade e cor, permitindo que as medidas fossem efetuadas sempre na mesma posição. Adicionalmente, para facilitar esse processo, a ranhura foi evidenciada com grafite conforme ilustrado a seguir (Figura 11).

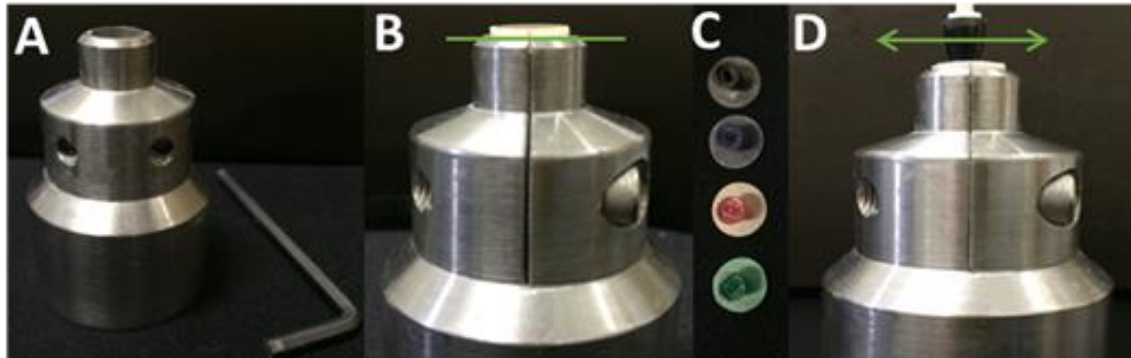
Figura 11- Ranhura na porção inferior do cp (A1) e evidenciação da mesma para facilitar medidas (A2 e A3).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Depois de confeccionados, os corpos de prova foram separados de acordo com a resina composta utilizada e armazenados em recipientes escuros devidamente identificados e livres de umidade. Na sequência, os procedimentos de acabamento e polimento foram realizados utilizando uma matriz de aço hemiseccionada com regulagem central de altura de sua base (confeccionada somente para a fase de acabamento e polimento dos corpos de prova em resina), micromotor de baixa-rotação (18000 G) e discos de óxido de alumínio com diâmetro de 12 mm para acabamento e polimento (Super-Snap singles, Shofu Dental Corp. Kyoto, Japão), conforme detalhado em seguida⁴⁴. A altura da base da matriz de aço bipartida, onde o espécime em resina ficou posicionado para esta etapa, foi estabelecida e padronizada com auxílio de uma sonda milimetrada de periodontia. Como o espécime possui 2 mm de espessura, estabeleceu-se que 1 mm ficaria abaixo do limite da matriz e 1 mm ficaria acima do nível do limite, facilitando o polimento e permitindo assim que toda a área da superfície do cp fosse polida ao mesmo tempo sem qualquer interferência da matriz de aço – Figura 12. A ranhura formada no verso do cp no momento da confecção do mesmo serviu como guia para seu posicionamento na matriz bem como para o acabamento e polimento, os quais foram realizados perpendiculares a esta demarcação, conforme Figura 12. Uma vez posicionado, seguiu-se com a sequência de acabamento e polimento, onde, primeiramente umedeceu-se o espécime com gaze embebida em água destilada e iniciou-se a sequência de discos respeitando a orientação da mais alta granulação para a mais baixa (preto, roxo, rosa, verde) - Figura 12. Cada disco foi utilizado por 15 segundos e, entre uma granulação e outra, os espécimes foram lavados por 5 segundos com jato de ar-água.

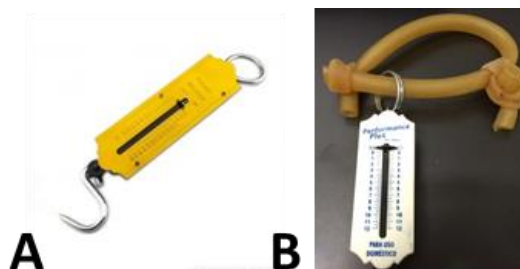
Figura 12- Matriz de aço bipartida com regulagem central de altura (A), posicionamento do espécime (B), sequência de discos (C) e orientação do procedimento de acabamento e polimento (D).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para padronizar o procedimento de acabamento e polimento, uma pressão de 2 kg foi exercida sobre cada espécime e, para isso, um elástico de garrote foi amarrado ao pulso do operador e preso a uma balança tipo peixeiro portátil (Figura 13). Depois de polidos, os cp foram armazenados novamente nos mesmos recipientes escuros devidamente identificados e livres de umidade até o momento de sua aleatorização.

Figura 13- Balança tipo peixeiro portátil com gancho para padronização da pressão exercida sobre o cp para fase de acabamento e polimento (A) e balança associada ao garrote para padronização do acabamento e polimento dos espécimes (B).



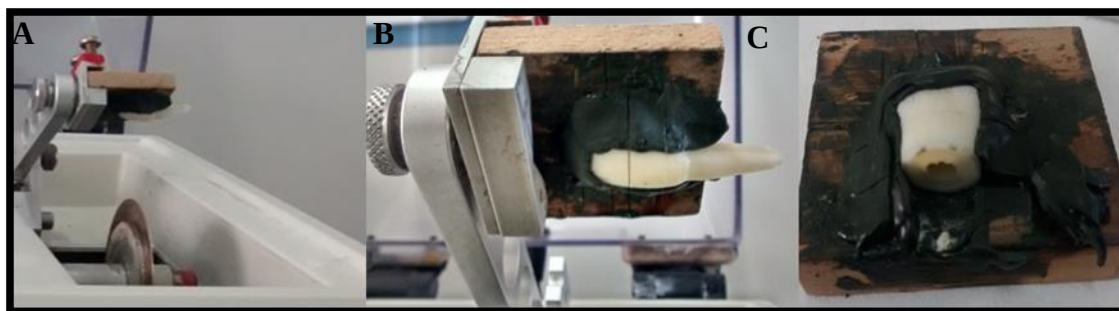
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP- FOAr, trezentos dentes bovinos foram adquiridos. Em seguida, os dentes foram mantidos em água corrente por 5 horas e armazenados por 15 dias em geladeira dentro de recipientes de vidro contendo solução de

timol a 0,2%. Após esse período, com auxílio de cureta periodontal tipo “Mccall”, os dentes passaram por raspagem e alisamento corono-radicular para remoção de cálculos e remanescentes periodontais. Na sequência, o conteúdo orgânico pulpar radicular foi aspirado por meio de cânula aspiradora de endodontia e os dentes foram colocados em nova solução de timol a 0,2% e deixados por mais 15 dias em geladeira com o objetivo de diminuir a proliferação de bactérias e fungos e, conseqüentemente, o odor. Em seguida, a etapa de limpeza e polimento dos dentes foi iniciada e, para isso, pasta de pedra pomes associada a escova tipo “Robinson” acoplada em micromotor (contra-ângulo) de baixa rotação foram utilizados. Os dentes foram retirados do timol e tiveram a umidade removida com gaze. Em seguida, foram fixados fortemente em aparato de madeira por meio de godiva aquecida e o conjunto dente-aparato de madeira (Cdam) foi posicionado na máquina de corte (IsoMet 1000) para se iniciarem os cortes. Esse procedimento foi feito um a um com o objetivo de não promover o ressecamento da estrutura dental e conseqüentemente evitar a criação de trincas no esmalte durante o corte.

A realização do primeiro corte (velocidade= 250 G; posição 0 mm) teve a finalidade de separar a porção radicular da porção coronária (Figura 14). Em seguida, mantendo-se a mesma velocidade de rotação do disco e sem remover a porção radicular previamente seccionada, o dispositivo de madeira foi reposicionado para a posição 7,3 mm e o segundo corte foi realizado individualizando o terço médio da porção coronária do dente, conforme Figura 14. Após isso, o Cdam foi removido da máquina de corte e a raiz descartada em um frasco de vidro contendo nova solução de timol.

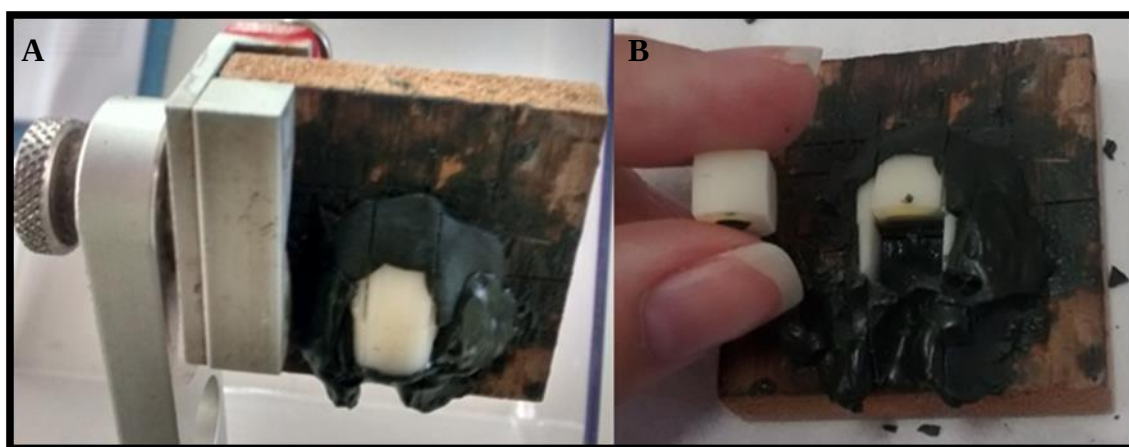
Figura 14- Posicionamento do conjunto na máquina de corte e primeiro corte (A), realização do segundo corte, individualizando o terço médio da coroa (B) e porção coronária após remoção da porção radicular previamente seccionada (C).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Em seguida, uma pequena quantidade de godiva aquecida foi inserida na região onde anteriormente estava a raiz para que a porção remanescente do dente ficasse bem presa ao aparato de madeira (Figura 15A) e pudesse dar prosseguimento à confecção do bloco de esmalte. Na sequência, o Cdam foi reposicionado na máquina de corte e, com os mesmos parâmetros usados para o primeiro e o segundo corte, o terceiro e o quarto foram realizados, resultando em dois blocos de esmalte. O terço cervical da coroa dental foi descartado e a porção referente aos terços médio e incisal, com dimensões de 7mm x 7mm (Figura 15B), foi armazenada em novo recipiente contendo timol.

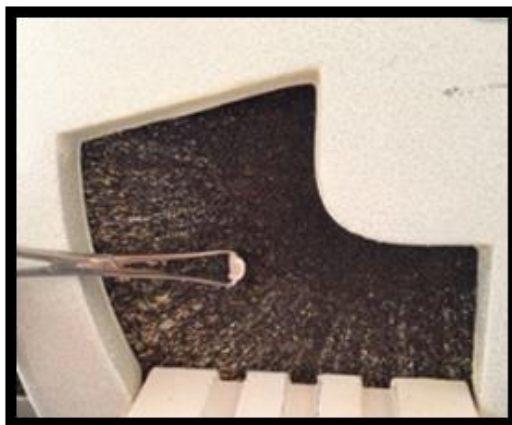
Figura 15- Reposicionamento do conjunto na máquina de corte (A) e individualização do bloco de esmalte a ser utilizado. (B).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Como a máquina de corte não possibilita estabelecer a espessura desejada (2 mm), uma vez confeccionados os blocos de esmalte, estes foram desgastados por meio de uma máquina recortadora de gesso. Para isso, após remoção da umidade por meio de gaze, a espessura foi delimitada com auxílio de um especímetro, uma lapiseira e uma régua. Em seguida, o bloco de esmalte foi pinçado com uma pinça tipo Allis e desgastado por meio do recortador de gesso sob refrigeração com água até o limite desejado. (Figura 16)

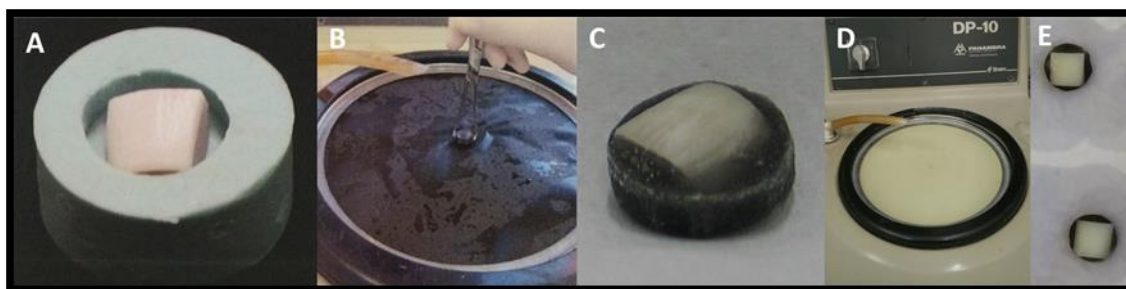
Figura 16- Desgaste dentinário utilizando recortador de gesso e pinça tipo Allis.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Depois de confeccionados os blocos de esmalte, estes foram incluídos em resina acrílica cor 67 pigmentada com corante preto Xadrez (LanXess; Bayer) para obtenção da cor cinza claro com o auxílio de uma matriz de silicona circular (Figura 17A e 17B). Após a inclusão dos cps em resina acrílica, um disco de 10 mm de diâmetro e aproximadamente 3 mm de espessura foi obtido, o qual, em seguida foi polido (lixa d'água de granulação 400) e teve a superfície que continha a face vestibular do bloco de esmalte e seu verso aplainados por meio de lixas d'água de granulação crescente e sequencial (400, 600 e 1200) posicionadas em uma politriz DP 10⁴⁴ (Panambra Struers DP – 10, Panambra, São Paulo, Brasil), adquirindo a espessura desejada de 2 mm (Figura 17C, 17D e 17E).

Figura 17- Bloco de esmalte bovino posicionado na matriz de silicone (A) utilizada para inclusão em resina acrílica pigmentada com corante (B). Em seguida o cp (C) passou por polimento e aplainamento da superfície do esmalte e do verso do cp em politriz (D), resultando no cp com a espessura desejada (E).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.4 Procedimentos de leitura

4.2.4.1 Calibração estatística para as leituras de cor, microdureza e rugosidade

Finalizadas as etapas de confecção dos cps, para os espécimes em esmalte, foi necessária a realização de calibração estatística dos pesquisadores para as três variáveis avaliadas. Para isso foi efetuado o estudo de reprodutibilidade, no qual o pesquisador examinou em duplicata 15 cps quanto à estabilidade de cor, rugosidade e microdureza com intervalo de uma hora entre as avaliações. A concordância intra-examinador foi estimada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (ρ)^{58, 62}. Em função do valor de ρ obtido, o grau de concordância entre os dados foi classificado segundo a proposta de Fermanian (1984)⁵⁸. Neste estudo foi considerado adequado um nível de concordância intra-examinador classificada como “Boa” (0,71 | — 0,91), ou superior⁵⁸.

4.2.4.2 Leituras dos corpos de prova previamente à PDI

Vinte e quatro horas antes das leituras “baseline” os espécimes de cada material foram aleatoriamente divididos e individualizados em potes plásticos devidamente nomeados com o tipo de superfície e com o grupo a que pertenciam (CN, AcO e PDI). Em seguida, 1000 μ L de saliva artificial foram inseridos em cada pote plástico e estes foram colocados em estufa microbiológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, conforme Figura

18. Dadas as 24 horas de imersão em saliva, os espécimes foram retirados da estufa e seus respectivos recipientes foram renumerados em ordem crescente (1 a 180 para cp em resina composta e 1 a 90 para cp em esmalte bovino) para que o pesquisador responsável pelas leituras permanecesse cego em relação aos grupos que os espécimes pertenciam.

Figura 18- Aleatorização, individualização dos espécimes, inserção de saliva artificial e colocação em estufa por 24 horas.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os procedimentos de leitura (*baseline*) foram iniciados seguindo a ordem “leitura de cor”, “leitura de microdureza” e “leitura de rugosidade”, os quais se encontram detalhados a seguir.

Para a realização da medida de cor foi utilizado o Espectrofotômetro de Colorimetria (Color guide 45/0, PCB 6807 BYK-Gardner GmbH, Geretsried, Alemanha), com comprimento de onda de 400 a 700 nm por meio de transmissão direta, com iluminação padrão D65 sobre fundo branco juntamente com o aparato auxiliar para medidas de cor (Figura 19).

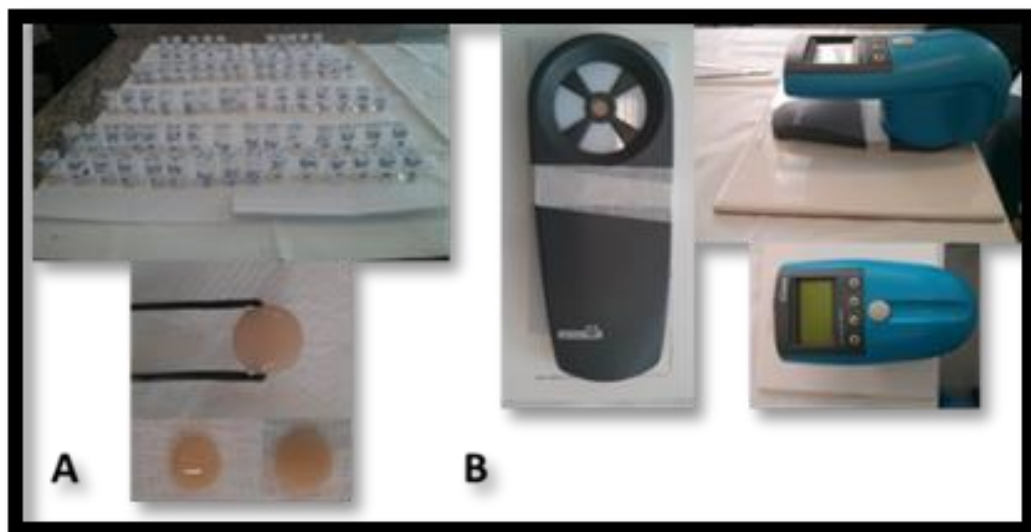
Figura 19- Em “A” - Espectrofotômetro de Colorimetria (Color guide 45/0, PCB 6807 BYK-Gardner GmbH, Geretsried, Alemanha) e em “B”, aparato auxiliar para padronização do posicionamento dos cps e realização das medidas de cor.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para que fossem efetuados os procedimentos de leitura de cor, os cps foram retirados um a um de seus potes, tiveram o excesso de umidade removido com o uso de gaze e os procedimentos de leitura se iniciaram de forma padronizada (Figura 20).

Figura 20- Em “A” – Corpos de prova imersos em saliva, removidos com pinça clínica e secos com gaze. Em “B”, espécime posicionado no aparato auxiliar para medidas de cor e medida de cor sendo realizada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após cada leitura, o espécime era devolvido ao seu respectivo pote acrílico. Todos os valores foram registrados e calculados pelo próprio aparelho, não necessitando da aplicação de fórmulas. Depois da avaliação de cor de cada amostra nos períodos determinados, o ΔE , ΔL^* , Δa^* e Δb^* foram calculados para analisar as diferenças nos valores entre o *baseline* e os períodos de leitura.

Imediatamente depois de finalizadas as leituras de cor, procederam-se as leituras da microdureza *Vickers/Knoop*, as quais foram obtidas por meio do microdurômetro digital (Buehler- Lake Bluff, Illinois, EUA), aplicando-se uma carga de 50 kgf durante 30 segundos sobre a superfície dos cps em resina composta (Figura 21A). A leitura foi realizada em três pontos distintos do cp, resultando no cálculo de uma média final para cada espécime. Para a padronização das leituras, os cps foram posicionados em uma matriz contendo uma ranhura em sua superfície coincidente à ranhura central do verso de cada cp, a fim de guiar o seu correto posicionamento (Figura 21B). Para os espécimes em resina composta, a coordenada utilizada para orientação da indentação do ponto central foi 13 direita/esquerda, sendo que a coordenada 10 orientou a posição anterior, e a 16, a posição posterior à indentação central. Diferentemente, para os cps em esmalte dental bovino, as coordenadas utilizadas para orientar os 3 pontos das indentações foram 5, 4 e 6 e a carga utilizada foi de 50 kgf por 15 segundos.

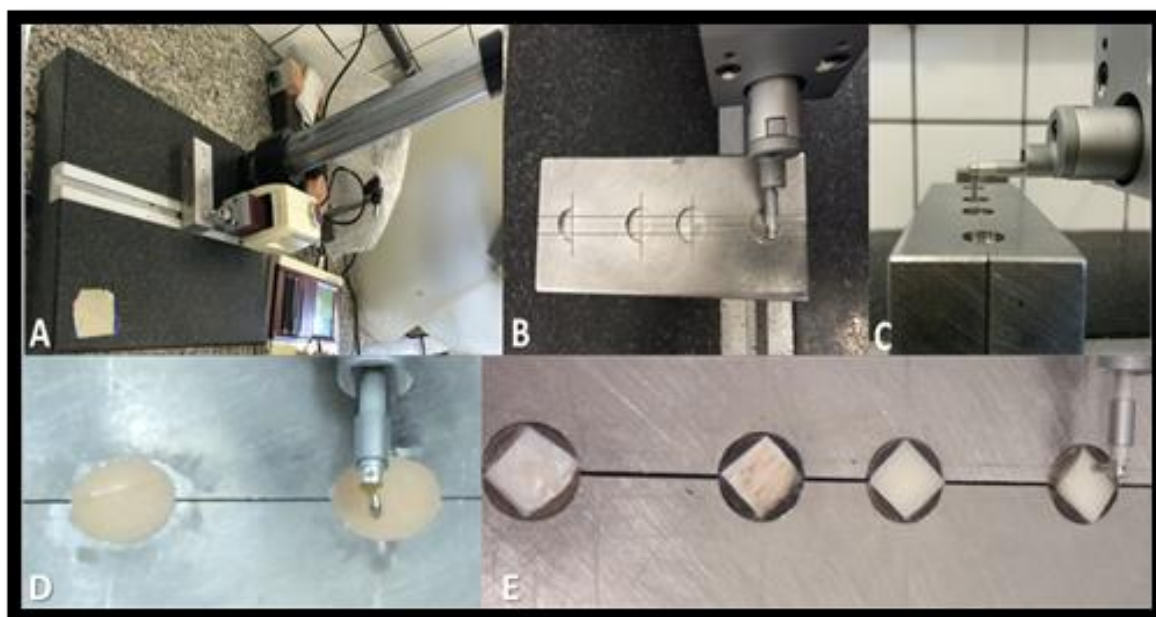
Figura 21- Em “A” – Microdurômetro. Em “B1”, dispositivo utilizado para acoplar a matriz metálica no microdurômetro e em “B2” ranhura no cp evidenciada com grafite coincidindo com a ranhura da matriz e, em seguida, espécime inserido na matriz.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Imediatamente após a realização das leituras seguiu-se com as de rugosidade. As leituras da rugosidade superficial (R_a em μm) foram obtidas por meio da passagem da ponta de diamante com raio de $5\text{ }\mu\text{m}$ do rugosímetro (Mitutoyosurf test SJ-401, Mitutoyo Corporation, Japão – Figura 22A) sobre o cp, com um comprimento de $2,5\text{ mm}$, a uma velocidade de 1 mm/s , com precisão de $0,01\text{ }\mu\text{m}$. Esse procedimento foi realizado em três locais distintos, resultando em uma média final R_a que foi calculada para cada cp. Para a padronização das leituras, foi utilizada matriz semelhante à da confecção dos corpos de prova em resina, a qual, por ser bipartida e possuir a demarcação central, serviu como guia para o posicionamento dos espécimes sempre na mesma direção, coincidindo a ranhura no verso do cp com a demarcação da matriz bipartida. Paralela a essa linha central foram demarcadas na matriz outras duas linhas, uma 2 mm acima e a outra 2 mm abaixo da demarcação central. Perpendicular às linhas e cortando virtualmente o cp ao meio, outra linha foi demarcada e a intersecção delas formou três pontos que orientaram o posicionamento da ponta de diamante do rugosímetro, padronizando a leitura (Figura 22).

Figura 22- Rugosímetro (22A), Demarcações paralelas à demarcação central da matriz bipartida e linha vertical “imaginária” perpendicular às linhas horizontais em 22B e 22C. Em “D” e “E” tem-se os corpos de prova em resina composta e em esmalte bovino, respectivamente, passando por avaliação de rugosidade superficial.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Finalizadas as leituras no rugosímetro, os potes de plástico contendo os cps juntamente com 1000 µL de saliva artificial foram levados novamente à estufa microbiológica por 24 horas à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização da PDI.

As leituras realizadas após os tratamentos seguiram exatamente a mesma metodologia relatada previamente. Adicionalmente, conforme explicitado anteriormente, as leituras de dureza e rugosidade foram realizadas 60 dias após os tratamentos. Em contrapartida, as leituras de cor, foram realizadas imediatamente, 24 horas, 48 horas, 71 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 30 dias e 60 dias após os tratamentos.

4.2.5 Aplicação do protocolo de PDI estabelecido no estudo I sobre os corpos de prova.

Após análise dos resultados obtidos para o Estudo 1, a formulação de CUR veiculada na microemulsão ácido oleico foi a selecionada para continuação dos testes propostos. Posteriormente à realização das leituras “baseline”, a PDI foi efetuada seguindo os parâmetros de iluminação previamente descritos para o Estudo I. Para isso, os potes de plástico contendo os cps imersos em saliva artificial foram divididos segundo o grupo a que pertenciam e placas de 24 poços foram devidamente demarcadas de acordo com o tipo de tratamento a ser testado (CN, AcO e PDI). Os cps foram lavados com água destilada e tiveram o excesso de umidade removido com gaze. Em seguida os tratamentos foram efetuados.

- **CN (controle negativo)**

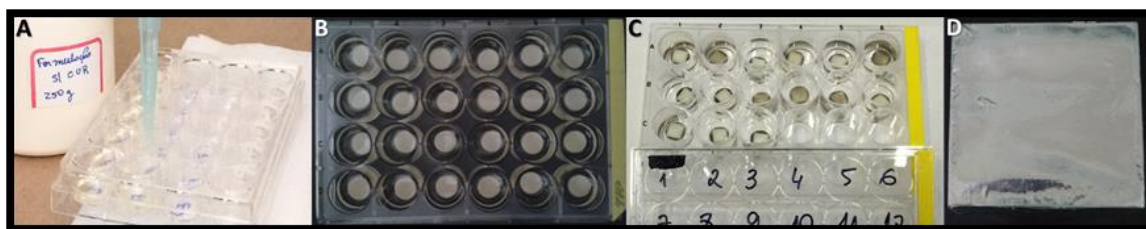
Os espécimes pertencentes a esse grupo não passaram por quaisquer tratamentos, de modo que permaneceram em seus respectivos potes de plástico contendo saliva artificial no interior de estufa microbiológica a 37°C e saíram dessa condição somente para a realização das leituras de cor, dureza e rugosidade.

- **AcO (controle positivo)**

Com o objetivo de analisar se o veículo utilizado para a confecção da formulação de CUR em ácido oleico poderia por si só promover alguma alteração sobre as superfícies

das resinas compostas e do esmalte dental, foram pipetados 500 μL da formulação controle de CUR nos poços da placa e os espécimes pertencentes a esse grupo foram imersos na formulação. Em seguida, a placa foi mantida livre de iluminação por 19 minutos (5 minutos referentes ao período de pré-incubação e 14 minutos referentes ao tempo de iluminação), conforme Figura 23.

Figura 23- “A”: Pipetagem da formulação de ácido oleico; em “B” e “C”: Imersão dos corpos de prova de resina e de esmalte, respectivamente, nos orifícios da placa e, em “D”, placa de 24 poços posicionada abaixo do aparato utilizado para bloquear a iluminação.

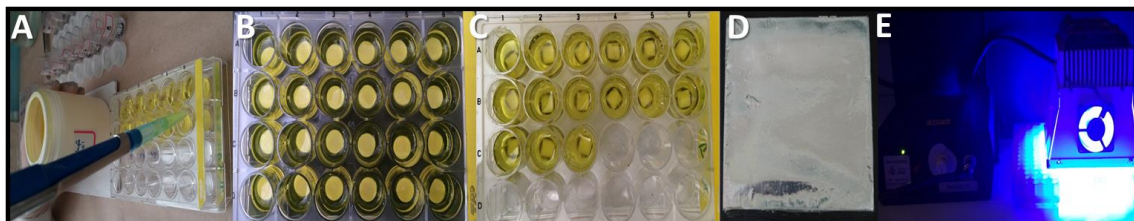


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

• PDI

Com o objetivo de verificar se a PDI poderia promover alguma alteração sobre as resinas compostas e esmalte dental, foram pipetados 500 μL da formulação de CUR veiculada em ácido oleico a 80 μM nos poços da placa de 24 orifícios e os espécimes pertencentes a esse grupo foram imersos na formulação. Em seguida, a placa foi mantida livre de iluminação por 5 minutos utilizando aparato semelhante ao descrito anteriormente para permitir a simulação da fotossensibilização das amostras e, findado os 5 minutos de pré-incubação, a placa foi levada ao dispositivo de luz LED (455 nm; potência de 22 mW/cm^2) por 14 minutos (Dose= 18J/ cm^2). (Figura 24)

Figura 24- “A”: Pipetagem da formulação de CUR veiculada em ácido oleico; em “B” e “C”: Imersão dos corpos de prova de resina e de esmalte, respectivamente, nos orifícios da placa, em “C”, placa de 24 poços posicionada abaixo do aparato utilizado para bloquear a iluminação durante pré-incubação e em “D”, iluminação da placa por 14 minutos com dispositivo de LED.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após os tratamentos, tanto para o grupo AcO quanto para o grupo PDI, os espécimes foram tirados dos poços das placas de 24 poços e lavados com água destilada para remover qualquer vestígio da formulação. Em seguida tiveram o excesso de umidade removido com gaze, foram reposicionados em seus respectivos potes plásticos contendo 1000 μL de saliva artificial e levados novamente à estufa microbiológica com temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, saindo dessa condição somente para as leituras.

É importante salientar que a saliva artificial dos potes plásticos foi trocada semanalmente e em condições assépticas.

4.2.6 Delineamento estatístico

A análise foi iniciada pela verificação e substituição de *outliers*. Verificados os pressupostos de análise, foi realizada Análise de Variância de Medidas Repetidas mista, considerando com 2 fatores independentes (tipo de material e tratamento) e 1 fator pareado (tempo). Para comparação múltipla foi utilizado o pós-teste de Sidak (variável alteração de cor e microdureza) e Games-Howell (variável rugosidade superficial). Para realização da inferência, o nível de significância adotado para tomada de decisão foi de 5%.

4.3 Estudo 3 - Eficácia da Inativação Fotodinâmica Mediada pela Curcumina Sobre Biofilmes Formados In Situ Sobre Esmalte Dental – Estudo Piloto

4.3.1 Delineamento experimental

Trata-se de estudo piloto do tipo experimental, laboratorial. As variáveis dependentes consideradas foram $\log_{10}$ UFC/mL de *S. mutans*, $\log_{10}$ UFC/mL de *L. casei*, $\log_{10}$ UFC/mL de *Candida spp* e $\log_{10}$ UFC/mL Geral (plaqueamento sobre meio de cultura inespecífico). Como variável independente foi considerado o tratamento em 2 níveis a saber: C+L+ (PDI) e C-L- (controle). Após realização dos tratamentos, a contagem de colônias foi efetuada e transformada em logaritmo de base 10.

4.3.2 Seleção dos voluntários e questões éticas

A forma de amostragem adotada não foi probabilística, sendo composta por um total de 7 alunos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sendo 3 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Após a autorização pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOAr (Anexo B), a pesquisa foi iniciada. Para a participação neste estudo, todos os indivíduos passaram por um exame clínico e anamnese, sendo selecionados aqueles que atenderam aos seguintes critérios de inclusão:

- Não apresentar sinais e/ou sintomas de doenças infecciosas na cavidade bucal;
- Apresentar saúde sistêmica (ausência de doenças crônicas);
- Não etilista;
- Não tabagista;
- Apresentar idade entre 18 e 40;
- Não estar utilizando soluções antimicrobianas ou outras soluções de bochecho há pelo menos 1 mês;
- Não ter feito uso de antibióticos nos últimos 3 meses;
- Não estar utilizando dentifrícios com ação antimicrobiana;

- Possuir fluxo salivar normal, o qual foi calculado efetuando-se a razão entre volume produzido de saliva pelo tempo de coleta (5 minutos).

Salienta-se que os voluntários foram selecionados a partir de rotina estabelecida pelo CONEP/CEP, a saber:

- Os voluntários receberam informações a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios. Adicionalmente, receberam um termo de consentimento livre e esclarecido;
- A adesão do paciente à pesquisa foi livre e voluntária;
- Ao voluntário coube a decisão de se retirar do experimento em qualquer momento do mesmo;
- A recusa da participação não implicou em prejuízos ou sanções ao voluntário;
- A colaboração na pesquisa não implicou em ônus ou ganho financeiro para o voluntário;
- Sua identidade foi mantida em sigilo.

4.3.3 Confeção dos dispositivos intrabucais

Os dispositivos intrabucais foram confeccionados seguindo a metodologia descrita por Aires^{3-4, 96} e sob a orientação do Prof. Dr. Jaime Cury que atuou como colaborador do estudo.

Para a confecção dos dispositivos, utilizando moldeira estéril, todos os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato (Hydrogum 5 - Zhermack). Os modelos foram vazados em gesso pedra e sobre eles foi feita a confecção dos dispositivos com resina acrílica autopolimerizável incolor. Trata-se de um dispositivo intrabucal semelhante a um aparelho ortodôntico móvel (Placa de *Hawley*), porém sem o arco metálico, em que orifícios são confeccionados na região palatina para o posicionamento dos blocos de esmalte dental bovino e assim permitir a formação do biofilme in situ.

Com o intuito de confeccionar os nichos (5 em cada hemiarco) que abrigaram os blocos de esmalte dental bovino (3 mm x 3 mm x 3 mm) previamente cortados de modo semelhante ao explicitado para o “Estudo 2”, blocos (4 mm x 4 mm x 4 mm) de silicone

de condensação (Zetaplus – Zhermack) foram preparados a partir de uma matriz metálica - Figura 25A. Em seguida os modelos de gesso foram isolados com Cel-Lac (SS White) e, após secagem do isolante, blocos de silicone foram colados no modelo com auxílio de super cola (Super Bonder – Loctite), respeitando um espaço entre si de pelo menos 1 mm. Posteriormente, nova camada de isolante foi aplicada sobre o modelo de gesso juntamente com os blocos de silicone e esperou-se secar. Na sequência a resina acrílica foi manipulada e vertida sobre o conjunto “modelo de gesso – blocos de silicone” durante a transição da fase pegajosa para a plástica – Figura 25B. Após remoção dos excessos na palatina dos dentes com auxílio de uma espátula odontológica nº 7, o conjunto foi levado à panela de acrilização por 20 minutos com pressão de 30 mPa. Decorrido o tempo de acrilização, a panela foi aberta e os procedimentos de acabamento (ponta Maxcut) e polimento manual com lixas d’água, borrachas e pastas de pedra-pomes e branco de espanha foram efetuados (Figura 25C).

Figura 25 – Em “A”: Matriz de aço para a confecção dos blocos de silicone (4mm x 4mm x 4mm), blocos prontos e fixados no modelo com auxílio de supercola; em “B” colocação da resina acrílica sobre o modelo e remoção dos excessos e em “C”, acrilização e acabamento e polimento do dispositivo.

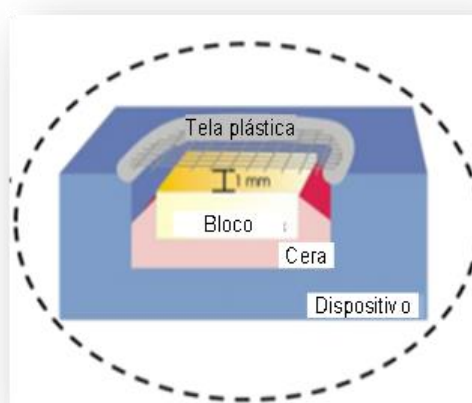


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O número de nichos confeccionados por dispositivo foi diretamente relacionado à dimensão do palato de cada voluntário, de modo que em alguns casos, o voluntário precisou usar 2 dispositivos em tempos diferentes para totalizar 10 amostras. Posteriormente, os dispositivos foram provados e, quando necessário, ajustados para maior conforto do voluntário. Em seguida, os dispositivos foram desinfetados com álcool 70°, os blocos de esmalte foram esterilizados em micro-ondas ¹⁵⁰, posicionados nos

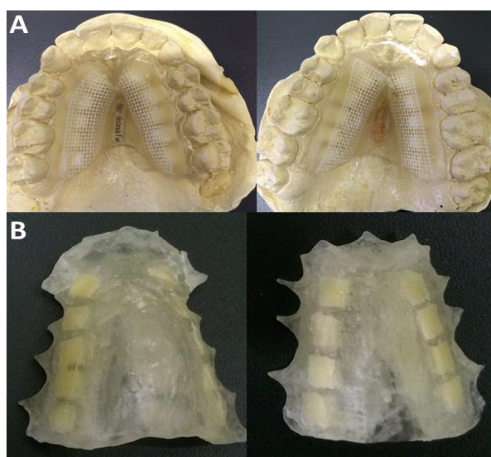
orifícios dos dispositivos e fixados com cera pegajosa (Asfer). Finalizada essa etapa, telas de nylon (1 em cada hemiarco) foram fixadas por meio de resina acrílica sobre os blocos de esmalte de modo que se estabeleceu um espaço de 1 mm entre a superfície do esmalte e a tela, permitindo a formação do biofilme nesse espaço sem qualquer perturbação mecânica^{25, 36-37}. A Figura 26 ilustra como o cp foi fixado e sua posição no dispositivo palatino e a Figura 27 representa um dispositivo pronto para uso.

Figura 26 - Figura ilustrativa mostrando a disposição que deverá ser feita para a fixação do bloco de esmalte em uma vista lateral.



Fonte: Moi, Gisele Pedroso. Análise do perfil proteômico do biofilme dental formado in situ na presença de glicose + frutose e sacarose. Tese de Doutorado, Piracicaba, SP: [s.n.], 2010⁹⁶.

Figura 27 – Dispositivo pronto para uso. Em “A” vê-se a as telas de nylon sobrepondo os blocos de esmalte fixados e em “B”, a face do dispositivo que fica em contato com o palato.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.4 Formação do biofilme *in situ* e tratamento fotodinâmico

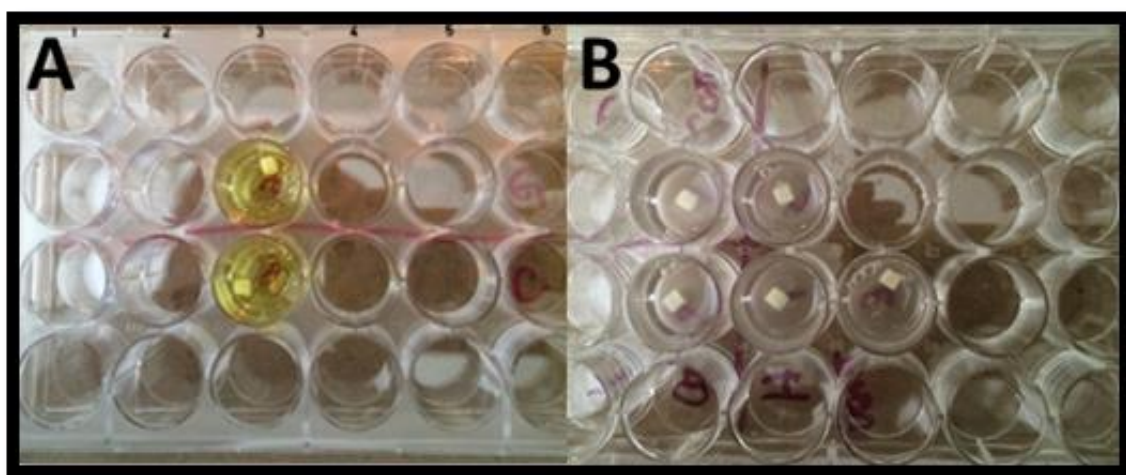
O tempo de utilização do dispositivo intrabucal palatino pelos voluntários na intenção de formar o biofilme *in situ* foi de 48 horas^{19, 47, 49}. No momento da entrega dos dispositivos aos voluntários, estes receberam instruções de utilização (Anexo C) e higiene dental, bem como um kit contendo uma escova de dentes, um dentífrico livre de triclosan (Colgate Tripla ação; Colgate), um pacote com gaze estéril e um frasco contendo sacarose a 20%. Os voluntários puderam retirá-lo da cavidade oral somente durante as refeições e para realizar a higienização bucal^{3-4, 96}. Três vezes ao dia (às 8, 12 e 21 horas), o voluntário gotejou 1 alíquota de solução de sacarose à 20% em cada bloco de esmalte para fornecer substrato ao biofilme e aguardou 5 minutos até recolocá-lo na cavidade oral. Após o período de formação do biofilme, o voluntário se apresentou à Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP/FOAr para remoção do dispositivo e finalização de sua participação no estudo.

Em seguida, os dispositivos foram alojados individualmente em béqueres estéreis e levados imediatamente até o laboratório de microbiologia. Na sequência, os blocos de esmalte foram cuidadosamente removidos dos nichos e distribuídos de forma aleatória em dois grupos: PDI (C+L+) e Controle (C-L-). Os blocos alocados no grupo PDI foram transferidos para poços de uma placa de 24 orifícios e expostos a 500 µL da formulação de CUR veiculada na microemulsão de ácido oleico (Figura 28). As amostras foram incubadas no escuro por 5 minutos e, em seguida, iluminadas com o mesmo equipamento já descrito anteriormente (18J/cm², que corresponde a 14 minutos de iluminação). As amostras do grupo controle foram submetidas a procedimentos semelhantes, no entanto, ao invés de CUR, foram expostas ao veículo utilizado na formulação e ficaram sobre a bancada, protegidas da luz, por 19 minutos.

Para a quantificação das células viáveis após os tratamentos, os blocos de esmalte foram removidos dos orifícios das placas de 24 poços e inseridos em *ependorfs* contendo 1 mL de SSE. Em seguida, os microtubos foram agitados em vórtex por 1 minuto para desprendimento das células e diluições seriadas foram efetuadas. Posteriormente, o conteúdo de cada microtubo foi semeado utilizando a técnica da gota em meios de cultura Mitis Salivarium, MRS (Man, Rogosa e Sharpe), Chromagar

Candida (específico para crescimento de espécies de *Candida*) e Müller Hinton (não específico). Após incubação a 37°C por 48 horas, o número de UFC/mL foi calculado.

Figura 28 – Blocos de esmalte após PDI em “A” e em “B”, após decorrido o tempo de 19 minutos sob proteção contra iluminação.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.5 Delineamento estatístico

Foi realizada análise descritiva dos dados e, por se tratar de estudo piloto, optou-se por não remover nenhum *outlier* para que fosse possível avaliar todos os comportamentos encontrados, bem como a variabilidade esperada no estudo definitivo. A significância do fator “Grupo de Tratamento” sobre as variáveis $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ para *S. mutans*, *L. casei*, *Candida spp* e todos os micro-organismos (Geral) foi avaliada com uma MANOVA a um fator uma vez que as quatro variáveis dependentes foram medidas numa mesma amostra e conceitualmente são correlacionadas. O pressuposto de normalidade multivariada foi verificado por meio da normalidade univariada em cada uma das variáveis dependentes com teste de Shapiro-Wilk e o pressuposto da homogeneidade de variâncias- covariâncias em cada grupo foi avaliado com o teste M de Box e por não ter sido validado, optou-se por utilizar o Traço de Pillai para o computo da estatística F. Quando a MANOVA detectou efeitos estatisticamente significativos, procedeu-se a

ANOVA para cada uma das variáveis dependentes. Considerou-se um nível de significância de 0,05.

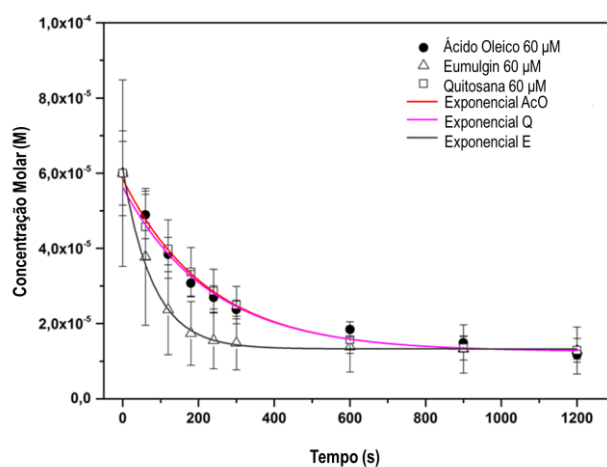
5 RESULTADO

5.1 Estudo 1 - Efeito Fotodinâmico da Curcumina em Diferentes Formulações Sobre Biofilmes Formados In Vitro

5.1.1 Fotodegradação

Os resultados obtidos confirmaram os comprimentos de onda nos quais cada fotossensibilizador possui seu sinal de absorção de luz. A partir desta análise, foi comprovada a iluminação da CUR hidrogel em comprimento de onda azul (~ 455 nm). As concentrações de 20 e 40 μM para todas as formulações apresentaram taxa de degradação muito alta, o que norteou o foco basicamente nas concentrações de 60 e 80 μM . Os espectros de cada composto e sua concentração foram colocados em um gráfico de absorbância segundo comprimento de onda o que possibilitou a análise da fotodegradação segundo o tempo de iluminação (Figuras 29 e 30). De acordo com os resultados foi possível verificar que a formulação com Eumulgin apresentou maior decaimento em relação às demais formulações, em ambas as concentrações.

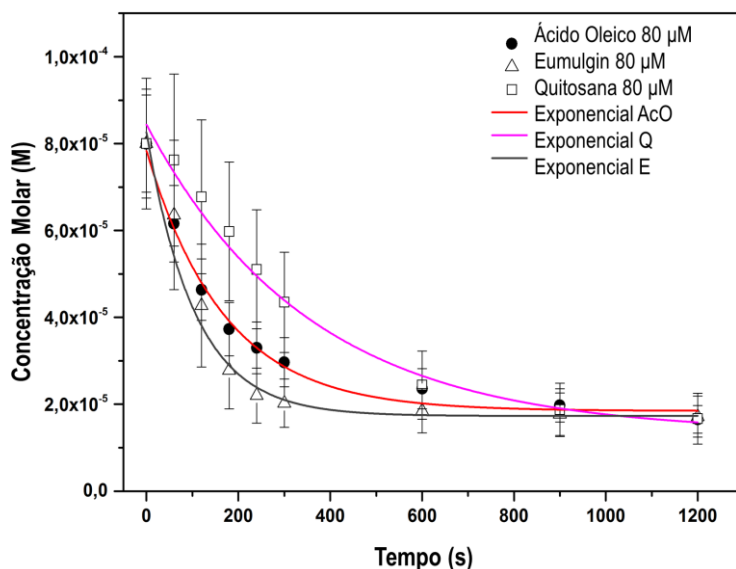
Figura 29 – Gráfico do decaimento da concentração molar em função do tempo para amostras na formulação com ácido oleico ($\bullet$), quitosana ($\square$) e eumulgin (Δ) na concentração de 60 μM de CUR.



Nota: “AcO: ácido oleico”; “Q: quitosana” e “E: eumulgin”.

Fonte: Arquivo próprio do autor.

Figura 30 – Gráfico do decaimento da concentração molar em função do tempo para amostras na formulação com ácido oleico (●), quitosana (□) e eumulgin (Δ) na concentração de 80 μM de CUR.



Nota: “AcO: ácido oleico”; “Q: quitosana” e E: eumulgin”.

Fonte: Arquivo próprio do autor.

As taxas de fotodegradação foram calculadas de acordo com a equação 2, considerando-se a concentração molar da formulação ($[C]$), a concentração molar inicial ($[C]_0$), o tempo (t) e a constante de decaimento (τ).

$$\frac{d[C](t)}{dt} = \frac{[C]_0}{\tau} \quad (2)$$

Com a análise da taxa de fotodegradação foi possível observar que todas as formulações foram completamente degradadas após 15 min de iluminação e a formulação que apresentou a menor taxa de fotodegradação foi a que possuía a Quitosana como veículo, com CUR na concentração de 80 μM (Tabela 1).

Tabela 1 Taxas de fotodegradação para as formulações avaliadas apresentadas em mol/segundos para as concentrações investigadas. O valor de R² está mostrado na tabela.

	60 µM		80 µM	
	Taxa [mol/segundos]	R ²	Taxa [mol/segundos]	R ²
Ácido Oleico	$(2,60 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	0,957	$(4,70 \pm 0,4) \times 10^{-7}$	0,975
Eumulgin	$(7,58 \pm 0,02) \times 10^{-7}$	0,991	$(7,70 \pm 0,8) \times 10^{-7}$	0,974
Quitosana	$(2,70 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	0,998	$(2,20 \pm 0,2) \times 10^{-7}$	0,989

Fonte: Elaboração própria.

Concluiu-se que, para qualquer formulação testada, o tempo máximo de iluminação deveria ser de 15 minutos, após o qual já não seria detectada CUR disponível para promover efeito fotodinâmico. Em ambas as concentrações de CUR, a formulação com Eumulgin foi a que apresentou maior taxa de fotodegradação. Por essa razão, as formulações selecionadas para os testes microbiológicos foram as que possuíam como veículo o Ácido Oleico e a Quitosana, ambas na concentração de 80 µM.

5.1.2 Calibração estatística para contagem de colônias microbianas

A variável dependente considerada foi o número de unidades formadoras de colônias por mililitro, após transformação em logaritmo de base 10. A reprodutibilidade intra e inter-examinadores foi avaliada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI) e os resultados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 Reprodutibilidade intra e inter-examinadores para contagem de colônias de *S. mutans* e *L. casei*. CCI: Coeficiente de Correlação Intraclassa; IC_{95%}: Intervalo de Confiança.

	<i>S. mutans</i>		<i>L. casei</i>	
	CCI	IC _{95%}	CCI	IC _{95%}
Intra E1	0,9936	0,9870 - 0,9969	0,9994	0,9988 - 0,9997
Intra E2	1,0000	1,0000 - 1,0000	0,9997	0,9995 - 0,9999
Inter	0,9998	0,9996 - 0,9999	0,9992	0,9983 - 0,9996

Fonte: Elaboração própria.

Os resultados da calibração mostraram que ambos os examinadores estavam aptos a realizar a contagem das colônias das cepas avaliadas, uma vez que houve concordância intra- examinador e inter examinadores, a qual foi classificada como excelente segundo Fermanian⁵⁸, indicando consistência entre as contagens.

5.1.3 Curva de Crescimento

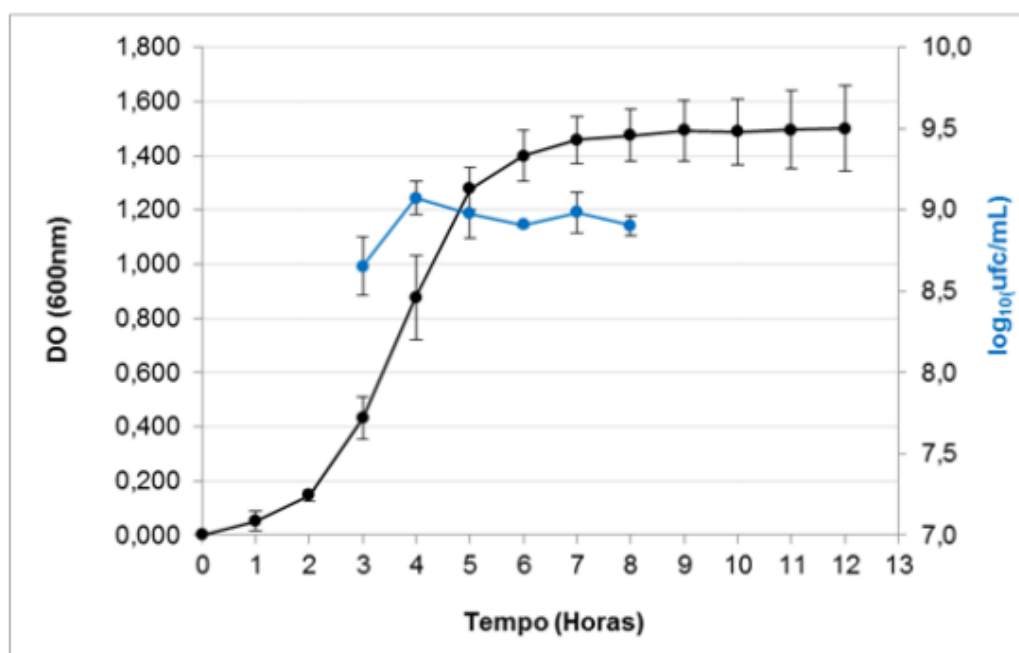
De acordo com os resultados obtidos para Sm (Tabela 3, Figura 31), a metade da fase exponencial (mid-log) foi obtida após 3,5h de incubação do inóculo (I). Nesse estágio, a Densidade Óptica (DO) média foi de $0,684 \pm 0,079$ e a UFC/mL de $2,95 \times 10^8 \pm 3,75 \times 10^7$.

Tabela 3 Média, Desvio Padrão (dp) e Coeficiente de Variação (CV%) dos valores de Densidade Óptica (DO; $\lambda=600$ nm) e ufc/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL) para 4 ocasiões da Curva de Crescimento da cepa de *S mutans* (UA 159 ATCC 700610) realizada em triplicata.

Tempo (h)	DO			ufc/mL		$\log_{10}(\text{ufc/mL})$		
	Média	dp	CV (%)	Média	dp	Média	dp	CV (%)
0	0,029	0,043	150,25					
1	0,080	0,047	59,00					
2	0,175	0,062	35,26					
3	0,460	0,095	20,69	4,79E+08	1,83E+08	8,7	0,17	2,00
4	0,907	0,153	16,88	1,23E+09	3,00E+08	9,1	0,15	1,65
5	1,307	0,088	6,73	1,11E+09	4,74E+08	9,0	0,32	3,62
6	1,429	0,060	4,22	8,13E+08	9,84E+07	8,9	0,05	0,58
7	1,487	0,057	3,85	1,01E+09	3,11E+08	9,0	0,12	1,33
8	1,504	0,051	3,38	8,18E+08	1,30E+08	8,9	0,08	0,91
9	1,521	0,065	4,30					
10	1,517	0,065	4,29					
11	1,525	0,088	5,77					
12	1,530	0,120	7,83					

Fonte: Elaboração própria.

Figura 31 – Média e Desvio padrão dos valores de Densidade Óptica (DO, $\lambda = 600\text{nm}$) e UFC/mL de 4 ocasiões realizadas em triplicatas (N = 12).



Fonte: Elaboração própria.

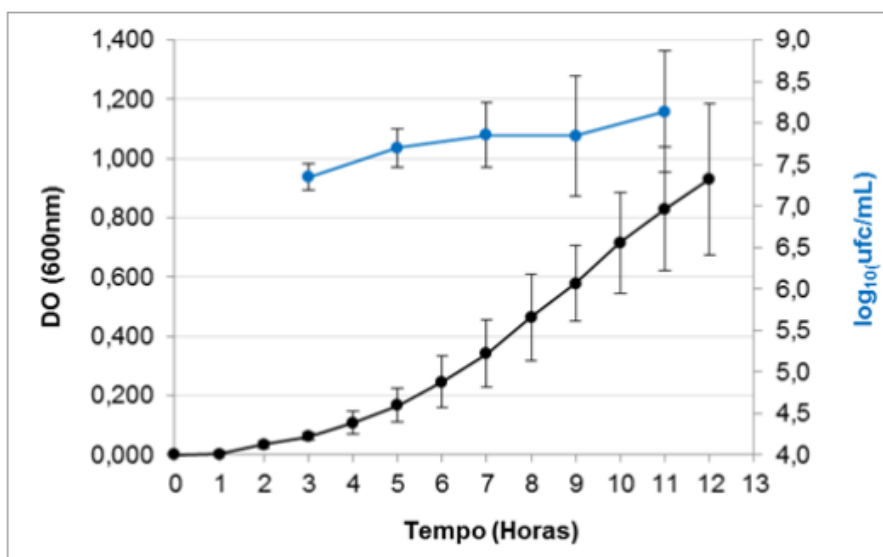
Nos resultados obtidos para Lc, (Tabela 4, Figura 32), a metade da fase exponencial (mid-log) foi obtida após 9h de incubação do I. Nesse estágio, a Densidade Óptica (DO) média foi de $0,578 \pm 0,148$ e a UFC/mL de $1,59 \times 10^8 \pm 1,86 \times 10^8$.

Tabela 4 Média, Desvio Padrão (dp) e Coeficiente de Variação (CV%) dos valores de Densidade Óptica (DO; $\lambda=600$ nm) e ufc/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL) para 4 ocasiões da Curva de Crescimento da cepa de *L casei* (ATCC 4646) realizada em triplicata.

Tempo (h)	DO			ufc/mL		$\log_{10}(\text{ufc/mL})$		
	Média	dp	CV (%)	Média	dp	Média	dp	CV (%)
0	0,000	0,000	#					
1	0,001	0,016	1731,43					
2	0,035	0,012	34,36					
3	0,061	0,020	33,32	2,55E+07	1,11E+07	7,3	0,27	3,70
4	0,107	0,039	36,24					
5	0,166	0,057	34,22	5,71E+07	3,20E+07	7,7	0,24	3,11
6	0,245	0,085	34,47					
7	0,341	0,107	31,50	1,03E+08	8,90E+07	7,9	0,42	5,32
8	0,464	0,143	30,83					
9	0,578	0,148	25,62	1,59E+08	1,86E+08	7,8	0,63	8,01
10	0,715	0,178	24,83					
11	0,830	0,203	24,43	2,76E+14	2,55E+08	8,1	0,64	7,90
12	0,930	0,232	24,99					

Fonte: Elaboração própria.

Figura 32– Média e Desvio Padrão dos valores de Densidade Óptica (DO, $\lambda = 600\text{nm}$) e UFC/mL de 4 ocasiões realizadas em triplicatas (N = 12).



Fonte: Elaboração própria.

5.1.4 Eficácia antimicrobiana das diferentes formulações: CUR livre (DMSO) e CUR incorporada nas formulações contendo Ácido Oleico e Quitosana.

Para as três espécies (Tabelas 5, 6 e 7), as análises indicaram efeito altamente significativo da formulação, do tratamento e da interação entre eles ($p < 0,0001$). Além disso, o *effect size* (η^2_p) relacionado ao fator formulação foi sempre muito superior ao dos demais fatores. O resultado das comparações múltiplas pode ser visualizado nas Figuras 33, 34 e 35 para as espécies *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, respectivamente.

Tabela 5 Sumário da ANOVA a dois fatores da cepa de *Lactobacillus casei*.

Fonte de Variação	SQ	df	QM	F	Sig.	η^2_p	π
Formulação	675,774	2	337,887	345,138	<0,0001	0,662	1
Tratamento	91,001	3	30,334	30,985	<0,0001	0,209	1
Interação	257,912	6	42,985	43,908	<0,0001	0,428	1
Erro	344,605	352	0,979				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6 Sumário da ANOVA a dois fatores da cepa de *Streptococcus mutans*.

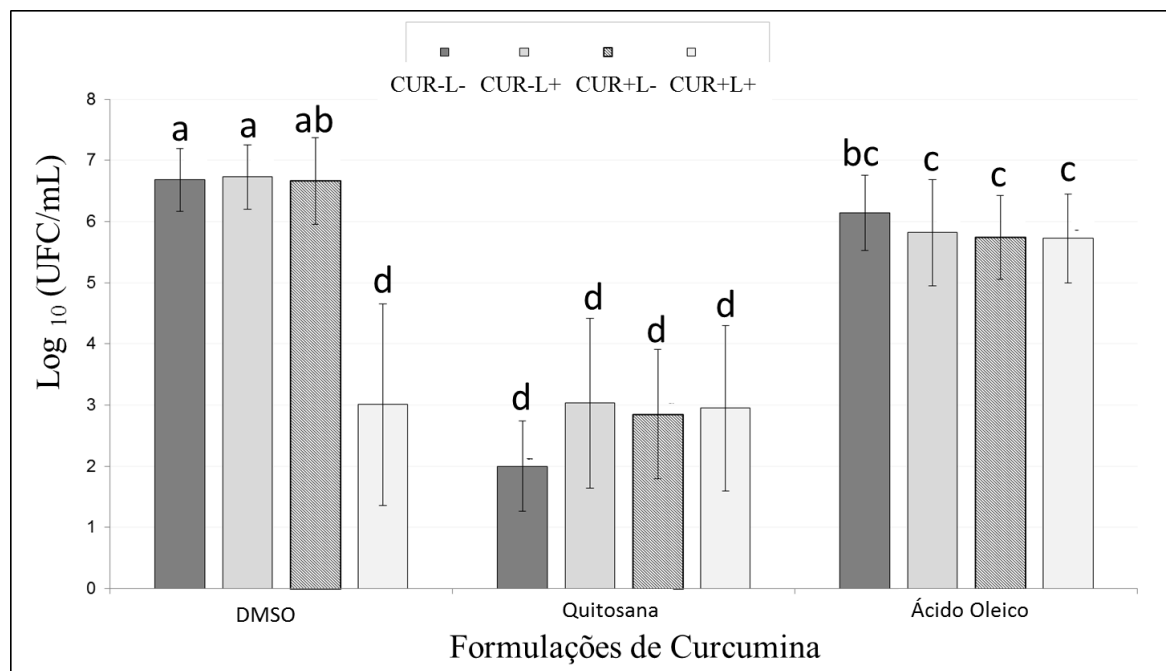
Fonte de Variação	SQ	df	QM	F	Sig.	η^2_p	π
Formulação	1006,051	2	503,025	683,972	<0,0001	0,766	1
Tratamento	190,932	3	63,644	86,538	<0,0001	0,384	1
Interação	117,602	6	19,600	26,651	<0,0001	0,277	1
Erro	306,682	417	0,735				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 Sumário da ANOVA a dois fatores da cepa de *Candida albicans*.

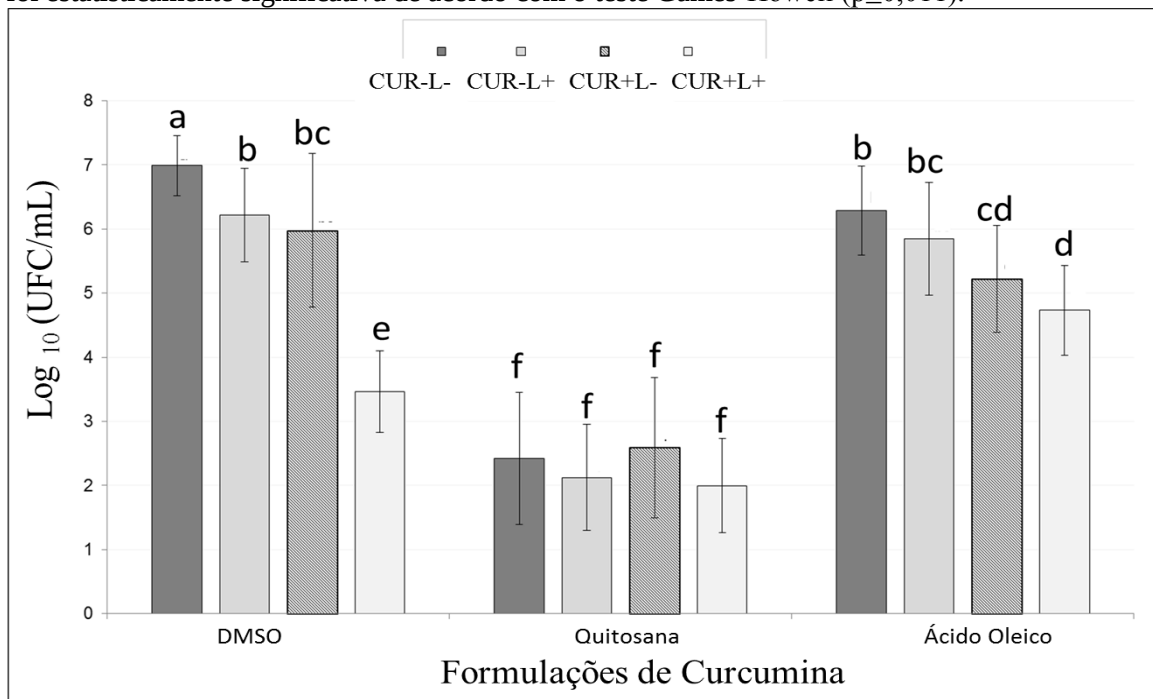
Fonte de Variação	SQ	df	QM	F	Sig.	η^2_p	π
Formulação	697,530	2	348,765	892,001	<0,0001	0,872	1
Tratamento	25,563	3	8,521	21,793	<0,0001	0,199	1
Interação	22,993	6	3,832	9,801	<0,0001	0,183	1
Erro	102,831	263	0,391				

Fonte: Elaboração própria.

Figura 33- Médias e desvios-padrão de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos após análise dos biofilmes de *Lactobacillus casei* para as três formulações testadas. Letras diferentes indicam que a diferença entre médias foi estatisticamente significativa de acordo com o teste Games-Howell ($p \leq 0,041$).

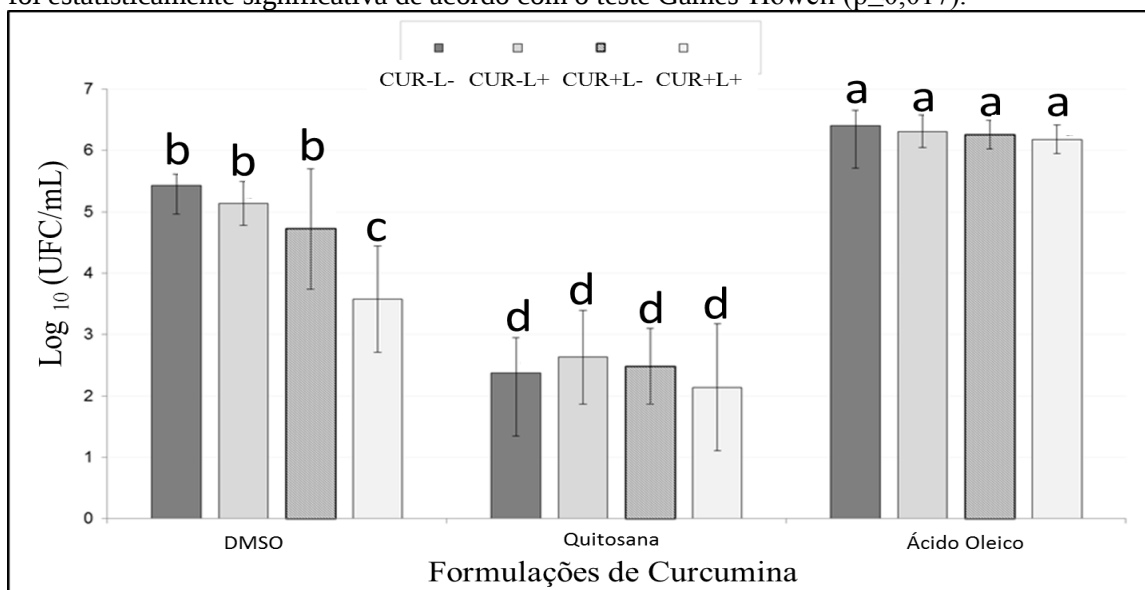
Fonte: Elaboração própria.

Figura 34- Médias e desvios-padrão de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos após análise dos biofilmes de *S. mutans* para as três formulações testadas. Letras diferentes indicam que a diferença entre médias foi estatisticamente significativa de acordo com o teste Games-Howell ($p \leq 0,011$).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 35- Médias e desvios-padrão de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos após análise dos biofilmes de *C. albicans* para as três formulações testadas. Letras diferentes indicam que a diferença entre médias foi estatisticamente significativa de acordo com o teste Games-Howell ($p \leq 0,017$).



Fonte: Elaboração própria.

Comportamentos distintos foram observados para as diferentes espécies de micro-organismos. Para *L. casei* e *C. albicans* a utilização de CUR em DMSO associada à luz LED foi a única formulação capaz de reduzir significativamente a sua viabilidade. Para *S. mutans*, a PDI promoveu efeito antimicrobiano por meio da utilização do DMSO e do Ácido Oleico nas formulações de CUR, embora o efeito nas amostras com DMSO tenha sido mais pronunciado.

Embora as formulações em hidrogel tenham apresentado pouca eficácia antimicrobiana quando comparadas à formulação de CUR veiculada em DMSO a 10%, a formulação em hidrogel de escolha para prosseguimento do estudo foi a de CUR veiculada em ácido oleico em virtude de esta ter apresentado algum efeito sobre biofilmes de *S. mutans*.

5.2 Estudo 2 - Efeito Fotodinâmico com Curcumina na Estabilidade de Cor, Microdureza e Rugosidade Superficial de Materiais Restauradores e Esmalte Dental

5.2.1 Calibração estatística para leituras de cor, microdureza e rugosidade sobre cps em esmalte dental

As variáveis dependentes consideradas foram estabilidade de cor (ΔE), microdureza knoop (kgf) e rugosidade superficial (Ra em μm). A reprodutibilidade intra examinador foi avaliada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclass (CCI) e os resultados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 Reprodutibilidade intra examinador para as variáveis estabilidade de cor, microdureza e rugosidade. CCI: Coeficiente de Correlação Intraclass; IC_{95%}: Intervalo de Confiança.

	Intra - Examinador	
	CCI	IC _{95%}
Estabilidade de cor	0,994	0,980 - 0,998
Microdureza	0,894	0,520 - 0,969
Rugosidade	0,985	0,957 - 0,995

Fonte: Elaboração própria.

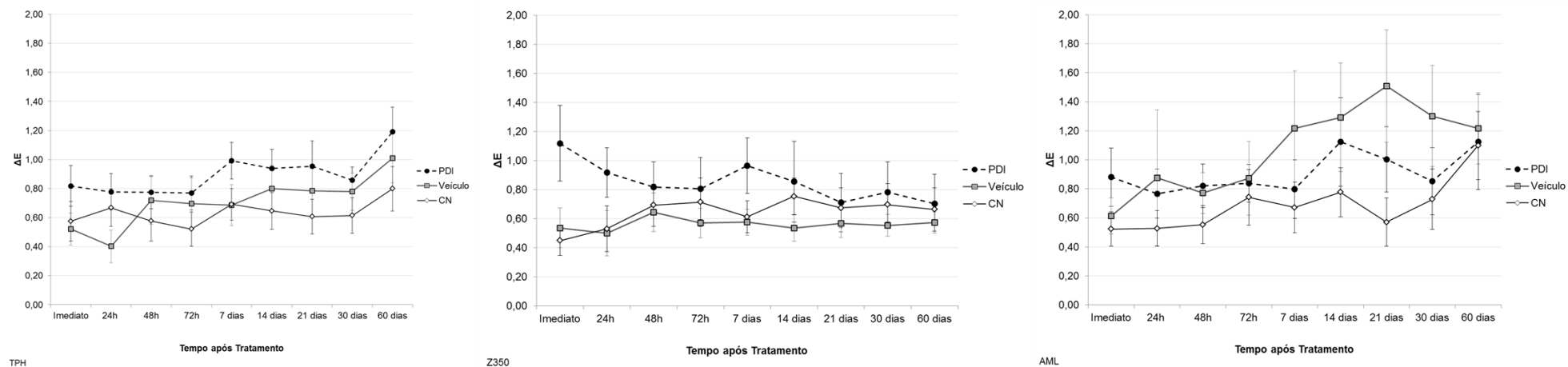
5.2.2 Avaliação da estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de resinas compostas

5.2.2.1 Estabilidade de cor

Os resultados obtidos em todos os tempos de avaliação podem ser visualizados na Figura 36. Foi possível observar que a resina TPH mostrou uma tendência a sofrer alteração de cor em função do tempo de avaliação, independente do grupo de tratamento. Tal comportamento não ocorreu para a resina Z350, a qual mostrou alteração de cor maior imediatamente após a PDI que foi diminuída aos 60 dias. Os dados da AML apresentaram grande variabilidade em todos os momentos de análise.

Para a análise de variância de medidas repetidas mista (Tabela 9) foram considerados apenas dois níveis do fator “tempo” (imediatamente e 60 dias após PDI), uma vez que a inclusão de todos os tempos dificultaria a interpretação dos achados e também em razão desses dois tempos terem sido avaliados para as demais variáveis dependentes (rugosidade e dureza).

Figura 36 - Média e intervalos de confiança (IC_{95%}) de alteração de cor (ΔE) obtidos segundo o tratamento (PDI mediada por AcO, Veículo - AcO, CN: saliva artificial) e tipo de resina composta (TPH, Z350, AML) nos diferentes tempos de avaliação.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 Sumário da ANOVA de medidas repetidas mista para análise da variação da cor entre as medidas.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	9,66	5,07	1,90	7,24	<0,001	0,04	1,00
Tempo x Resina	8,35	10,15	0,82	3,13	0,001	0,04	0,99
Tempo x Tratamento	5,63	10,15	0,56	2,11	0,021	0,03	0,91
Tempo x Resina x Tratamento	10,92	20,29	0,54	2,04	0,004	0,05	0,99
Resíduo	206,90	786,25	0,26				
Resina	15,48	2,00	7,74	8,49	<0,001	0,10	0,96
Tratamento	26,41	2,00	13,20	14,49	<0,001	0,16	1,00
Resina x Tratamento	11,39	4,00	2,85	3,12	0,017	0,07	0,81
Resíduo	141,27	155,00	0,91				

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com os resultados da ANOVA, todos os fatores tiveram efeito significativo sobre a alteração da cor das resinas, bem como todas as possíveis interações. No entanto, os valores de “ η_p^2 ” sugerem que o tratamento foi o fator que apresentou maior efeito sobre a variável resposta. A análise dos efeitos principais apontou que, de forma geral, a alteração de cor foi maior nas leituras efetuadas 60 dias após os tratamentos, sendo que a resina Z350 foi a que menos sofreu efeito e a PDI mediada por CUR a 80 μ M veiculada em ácido oleico foi o tratamento que promoveu maior efeito na cor dos espécimes (Tabela 10). No entanto, como a ANOVA apontou interações significativas, a interpretação dos achados deve ser baseada no cruzamento entre todas as variáveis.

Assim, a análise de comparações múltiplas (Figura 37), considerando a interação dos fatores, mostrou que a resina TPH não apresentou alteração de cor significativa nos grupos CN e PDI nos dois tempos avaliados. Desse modo, para essa resina, pode-se dizer que a PDI não promoveu qualquer efeito sobre a alteração de cor, no entanto, observa-se que a coloração dos cps pertencentes ao grupo controle positivo (AcO) apresentaram diferença de cor significativa entre os dois tempos analisados. Para a resina Z350, a cor imediatamente após a PDI se mostrou bastante alterada quando comparada ao grupo controle negativo (CN), porém, na leitura efetuada 60 dias após os tratamentos, os cps pertencentes ao grupo PDI apresentaram uma acentuada redução nos valores de variação de cor. Além disso, diferentemente do

encontrado para a resina TPH, o grupo AcO não apresentou diferença significativa de cor entre os 2 tempos analisados.

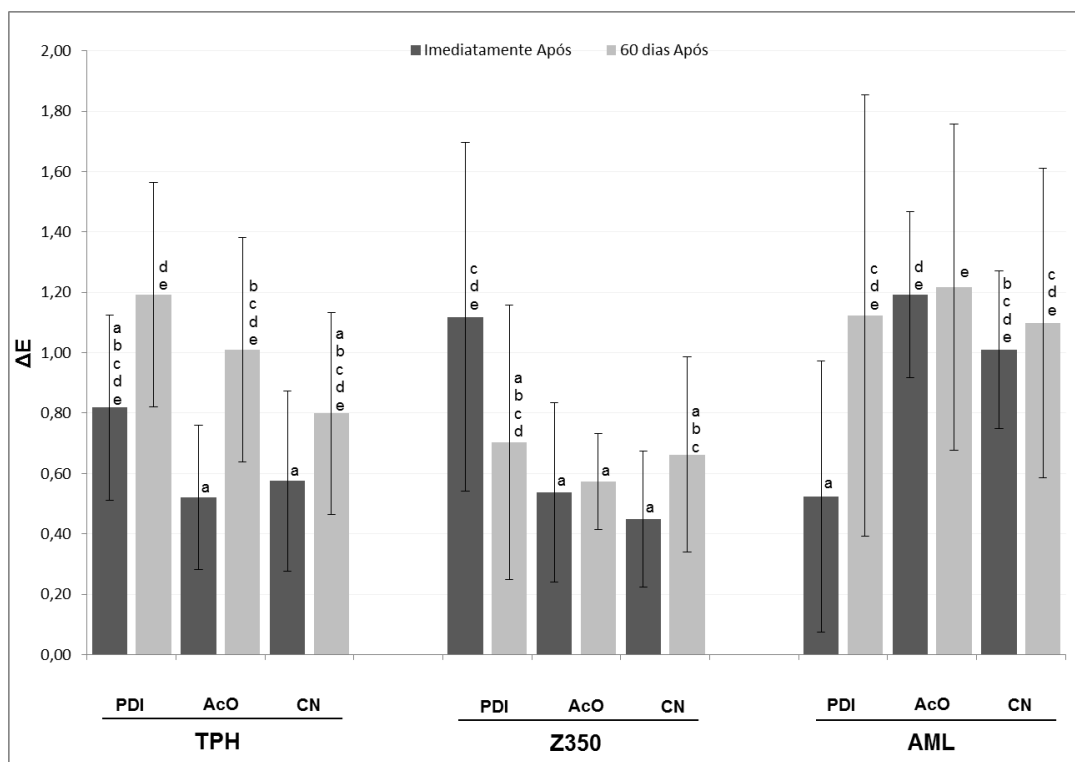
Assim, pode-se concluir que para a resina Z350, embora tenha havido manchamento, este voltou ao *baseline* após comparação com respectivo CN. Em contraste com os resultados encontrados para os outros 2 tipos de resinas avaliadas, a resina AML apresentou variação de cor mais acentuada no tempo “imediatamente após os tratamentos” nos grupos CN e AcO, não apresentando alteração significativa quando comparada com as leituras efetuadas no tempo “60 dias após tratamentos”. Por outro lado, os espécimes pertencentes ao grupo PDI apresentaram menor alteração de cor no tempo “imediatamente” e maior alteração no tempo “60 dias após”. Desse modo pode-se concluir que embora a PDI não tenha promovido manchamento significativo nos cps no tempo “imediatamente após tratamento”, no tempo 60 dias após, houve aumento da alteração de cor, porém esse manchamento foi semelhante ao encontrado no grupo CN.

Tabela 10 Análise dos efeitos principais. (Comparações múltiplas pelo teste de Sidak, $\alpha=0,05$).

Fator	Níveis	Média	IC95%	
Tempo p<0,001	Imediatamente Após	0,671	0,620	0,721
	60 dias Após	0,931	0,863	0,999
Resina p≤0,021	TPH	0,819 a	0,749	0,890
	Z350	0,674 b	0,596	0,752
	AML	0,910 a	0,832	0,988
Tratamento p<0,001	PDI	0,973 a	0,888	1,057
	Veículo	0,745 b	0,675	0,816
	CN	0,685 b	0,614	0,755

Fonte: Elaboração própria.

Figura 37 - Média e desvio-padrão dos valores de alteração de cor (ΔE) obtidos segundo o tratamento (PDI, AcO, CN) e tipo de resina composta (TPH, Z350, AML). Letras diferentes indicam diferenças entre médias estatisticamente significativas de acordo com o pós-teste de Sidak ($p \leq 0,049$).



Fonte: Elaboração própria.

5.2.2.2 *Análise da microdureza superficial*

Os resultados encontrados pela ANOVA (Tabela 11) mostraram que exceto os fatores “tempo x tratamento” e “tratamento”, todos os outros foram significativos ($p \leq 0,001$). Conforme os resultados observados, é possível dizer que, de modo geral, a resina AML apresentou dureza inferior às demais resinas, independentemente do tratamento considerado (p^2_p), tendo a maior parte de seus valores concentrados entre 45 e 60 kgf (Figura 38). Adicionalmente, nas leituras realizadas no tempo “60 dias após os tratamentos”, a dureza da resina se manteve estatisticamente igual àquelas realizadas no tempo “baseline” para todos os grupos. Do mesmo modo, embora a

resina TPH apresente uma dureza inicial maior do que a AML, não houve diferença estatisticamente significativa entre as leituras realizadas anteriormente aos tratamentos e 60 dias após para todos os grupos testados.

Somado a isso, pode-se notar que os valores de dureza encontrados para o grupo PDI e para o CN foram estatisticamente iguais, indicando que a PDI não causa efeito deletério sobre esses dois tipos de resina.

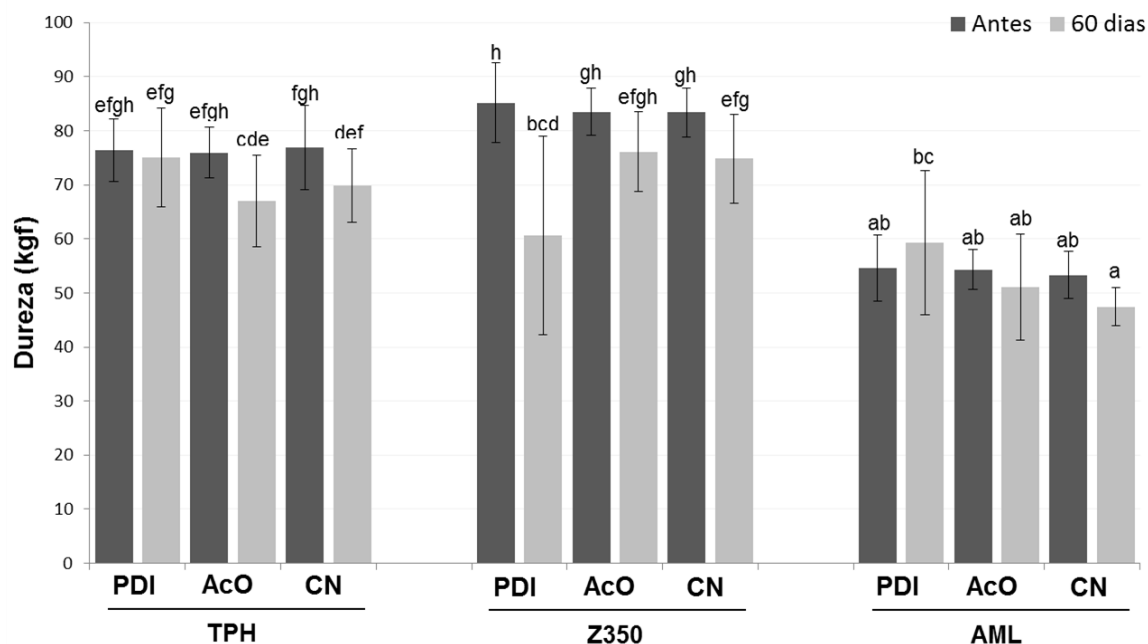
Em contrapartida, para a resina Z350, embora os valores de dureza tenham se mostrado iguais entre os três tratamentos no tempo “*baseline*”, no tempo “60 dias após tratamentos” o grupo PDI mostrou redução dessa propriedade em relação aos grupos AcO e CN, sugerindo efeito negativo relacionado à exposição à PDI.

Tabela 11 Sumário da Anova de medidas repetidas mista para análise de dureza.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	4291,11	1,00	4291,11	57,22	<0,001	0,25	1,00
Tempo x Superfície	2228,03	2,00	1114,02	14,86	<0,001	0,15	1,00
Tempo x Tratamento	6,38	2,00	3,19	0,04	0,958	0,00	0,06
Tempo x Superfície x Tratamento	2733,50	4,00	683,37	9,11	<0,001	0,18	1,00
Resíduo	12823,01	171,00	74,99				
Tratamento	49,59	2,00	24,79	0,36	0,696	0,00	0,11
Superfície	39735,92	2,00	19867,96	291,36	<0,001	0,77	1,00
Tratamento x Superfície	2347,90	4,00	586,98	8,61	<0,001	0,17	1,00
Resíduo	11660,45	171,00	68,19				

Fonte: Elaboração própria.

Figura 38 – Média e desvio-padrão dos valores de dureza *Vickers* (kgf) obtidos antes (*baseline*) e após os tratamentos (PDI, AcO, CN) segundo a resina composta (TPH, Z350, AML). Letras diferentes indicam diferenças entre médias estatisticamente significativas de acordo com o pós-teste de Sidak ($p \leq 0,038$).



Fonte: Elaboração própria.

5.2.2.3 Análise da rugosidade superficial

Após análise inferencial percebeu-se que o fator “tempo” não foi significativo nos resultados encontrados. (Tabela 12)

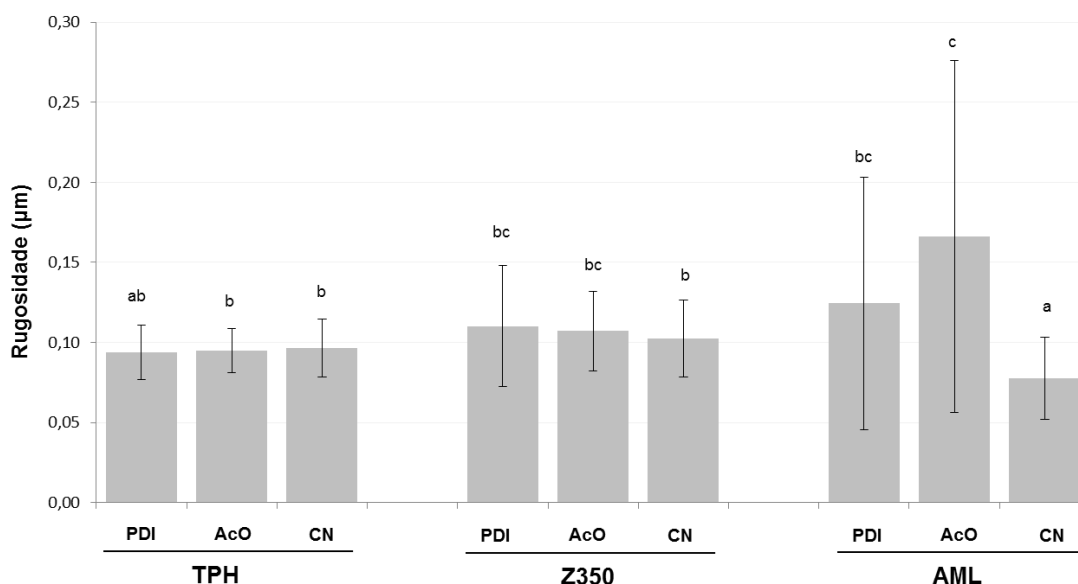
Tabela 12. Sumário da Anova de medidas repetidas mista para análise de rugosidade superficial.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	0,00	1,00	0,00	0,00	0,991	0,00	0,05
Tempo x Superfície	0,00	2,00	0,00	0,79	0,457	0,01	0,18
Tempo x Tratamento	0,00	2,00	0,00	0,93	0,396	0,01	0,21
Tempo x Superfície x Tratamento	0,01	4,00	0,00	0,54	0,703	0,01	0,18
Resíduo	0,40	171,00	0,00				
Superfície	0,05	2,00	0,02	8,08	<0,001	0,09	0,96
Tratamento	0,06	2,00	0,03	9,72	<0,001	0,10	0,98
Tratamento x Superfície	0,10	4,00	0,02	8,57	<0,001	0,17	1,00
Resíduo	0,49	171,00	0,00				

Fonte: Elaboração própria.

Em virtude do fator “tempo” não ter sido significativo, as comparações múltiplas foram realizadas de forma independente dele, não tendo sido necessário utilizar um teste para medidas repetidas. Por essa razão, optou-se pelo teste de Games-Howell, que possui correção de heterocedasticidade.

Figura 39 - Média e desvio-padrão dos valores de rugosidade (μm) obtidos segundo o tratamento (PDI, AcO, CN) e tipo de resina composta (TPH, Z350, AML). Letras diferentes indicam diferenças entre médias estatisticamente significativas de acordo com o pós-teste de Games-Howell ($p \leq 0,034$).



Fonte: Elaboração própria.

Os resultados (Figura 39) mostraram que a rugosidade das resinas TPH e Z350 não foram alteradas nos diferentes grupos, indicando que nem a PDI nem o veículo provocaram alterações deletérias na variável estudada. Adicionalmente, como os grupos CN de ambas as resinas também não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as médias, sugere-se que essas resinas possuem rugosidade semelhante.

Por outro lado, o grupo CN da resina AML apresentou rugosidade menor do que as outras resinas e, após realização dos tratamentos, a resina teve sua rugosidade

aumentada nos grupos PDI e AcO quando comparadas ao CN, sendo que os grupos PDI e AcO mostraram médias equivalentes. Desse modo, pode-se sugerir que o efeito deletério observado pode ter sido causado pelo veículo da formulação e não pelo efeito fotodinâmico propriamente dito.

5.3.1 Avaliação da estabilidade de cor, microdureza e rugosidade superficial de esmalte dental

5.3.1.1 Estabilidade de cor

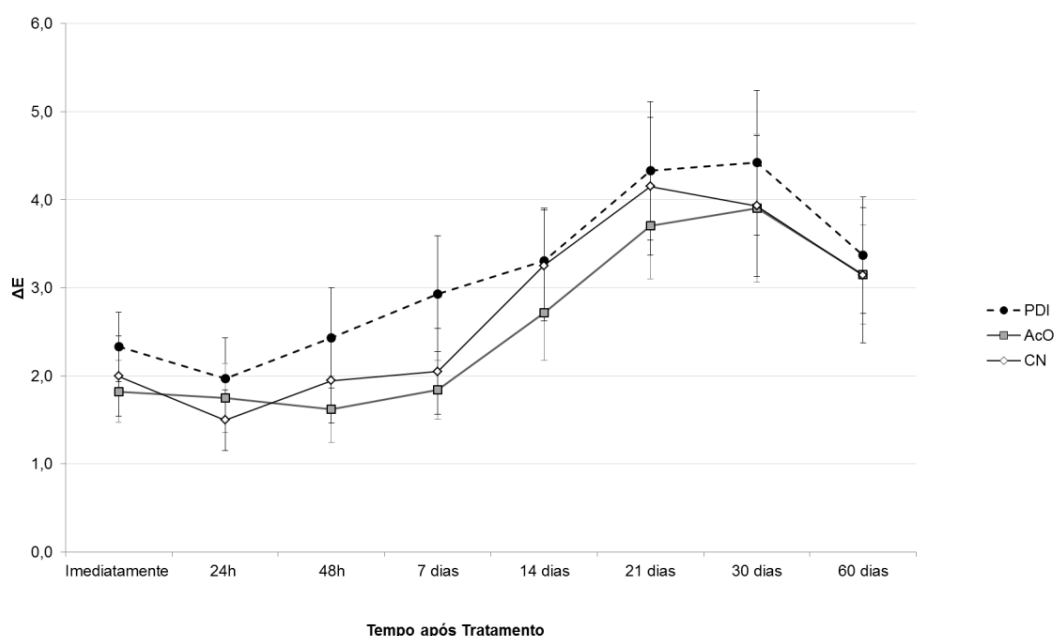
De acordo com os resultados da ANOVA, somente o fator “tempo” teve efeito significativo na alteração de cor do esmalte (Tabela 13). Independentemente do tratamento, no tempo imediatamente após, a média ($\bar{x}$) da variação de cor foi de $2,05 \pm$ desvio padrão (dp) de 1,09, enquanto que as medidas efetuadas 60 dias pós- PDI o valor da média subiu para $3,22 \pm 1,79$ (Figura 40), sugerindo que a mudança de cor ocorreu naturalmente em razão do tempo de armazenamento dos cps em saliva artificial. Análise inferencial por intervalos de confiança ($IC_{95\%}$) dos tempos avaliados também foi realizada e encontra-se na figura seguinte (Figura 40).

Tabela 13 Sumário da ANOVA de medidas repetidas mista para análise da variação da cor entre as medidas.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	60,45	1,00	60,45	32,20	<0,001	0,27	1,00
Tempo x Tratamento	0,60	2,00	0,30	0,16	0,852	0,00	0,07
Resíduo	159,55	85,00	1,88				
Tratamento	4,23	2,00	2,12	0,82	0,444	0,02	0,19
Resíduo	219,22	85,00	2,58				

Fonte: Elaboração própria.

Figura 40 - Média e intervalos de confiança (IC_{95%}) de alteração de cor (ΔE) obtidos segundo o tratamento (PDI, AcO, CN) nos diferentes tempos de avaliação sobre cps em esmalte dental bovino.



Nota: cps: corpos de provas.

Fonte: Elaboração própria

5.3.1.2 Análise da microdureza superficial

Os resultados encontrados após ANOVA de medidas repetidas mista (Tabela 14) mostraram que a dureza avaliada previamente aos tratamentos se mostrou significativamente maior que a aferida após 60 dias, independentemente dos tratamentos ($\bar{x} \pm dp$: A=190,22±62,09; 60d=141,97±58,11; $p<0,001$), indicando que houve redução de dureza com o tempo.

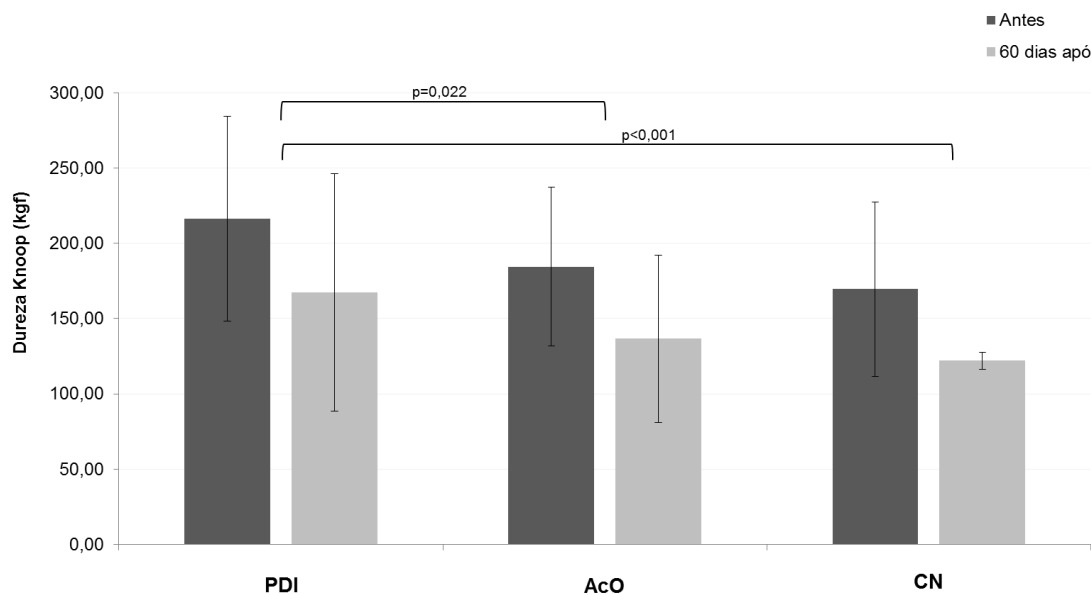
Tabela 14 Sumário da ANOVA de medidas repetidas mista para análise de dureza *Knoop* (kgf).

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	104796,59	1,00	104796,59	37,58	<0,001	0,30	1,00
Tempo x Tratamento	20,66	2,00	10,33	0,00	0,996	0,00	0,05
Resíduo	242596,49	87,00	2788,47				
Tratamento	66750,78	2,00	33375,39	8,50	<0,001	0,16	0,96
Resíduo	341573,85	87,00	3926,14				

Fonte: Elaboração própria.

Além disso, os valores de dureza do grupo PDI se mostraram significativamente superiores aos demais grupos, conforme Figura 41 abaixo.

Figura 41 - Média e desvio-padrão dos valores de dureza Knoop (kgf) obtidos em dois momentos após os tratamentos (PDI, AcO, CN). Os valores de dureza do grupo PDI se mostraram significativamente superiores aos demais grupos de acordo com o pós-teste de Sidak ($p \leq 0,022$).



Fonte: Elaboração própria.

Conforme observado nos resultados, o tempo de armazenamento dos cps em saliva artificial promoveu a diminuição da dureza superficial em todos os grupos avaliados, sugerindo que a PDI não desencadeou qualquer efeito deletério sobre a superfície do esmalte dental bovino.

5.3.1.3 *Análise da rugosidade superficial*

A variável dependente considerada foi “Rugosidade Superficial (μm)-Esmalte” e as variáveis independentes foram o tempo de avaliação em 2 níveis (antes dos tratamentos e 60 dias após os tratamentos), o tipo de tratamento efetuado em 3 níveis (PDI, CN e AcO). Após realização das medidas, os dados foram apurados e estatística descritiva foi realizada, seguida de análise de *outliers*.

Na sequência, estatística foi efetuada por meio de ANOVA de medidas repetidas mista, seguida de pós- teste de Games Howell, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 15).

Tabela 15 Sumário da ANOVA de medidas repetidas mista para análise de rugosidade superficial nos cps em esmalte dental bovino.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
Tempo	1,03	1,00	1,03	9,79	0,002	0,10	0,87
Tempo x Tratamento	0,55	2,00	0,27	2,60	0,080	0,06	0,51
Resíduo	9,17	87,00	0,11				
Tratamento	0,52	2,00	0,26	1,02	0,364	0,02	0,22
Resíduo	21,99	87,00	0,25				

Nota: cps: corpos de prova.

Fonte: Elaboração própria.

A análise verificou que somente o fator “tempo” foi significativo ($p= 0,002$). As medidas efetuadas antes dos tratamentos proporcionaram a quantificação de uma rugosidade média de $0,878 \pm 0,451$, tendo sido significativamente reduzida para $0,726 \pm 0,393$ nas medidas efetuadas 60 dias após tratamentos. Isso sugere que a PDI não possuiu efeito deletério na rugosidade do esmalte, e que a diminuição observada foi devido a um comportamento natural desse tipo de superfície.

5.3 Estudo 3 - Eficácia da Inativação Fotodinâmica Mediada pela Curcumina Sobre Biofilmes Formados In Situ Sobre Esmalte Dental – Estudo Piloto

Os valores médios, e respectivos desvios-padrão e intervalos de confiança, obtidos após quantificação de colônias para cada um dos voluntários estão mostrados na Tabela 16. A análise dos IC_{95%} possibilitou a avaliação do comportamento de cada voluntário frente a PDI. De acordo com o observado neste estudo piloto, há indicativos de que o efeito da PDI possa, de fato, ser diferente para cada indivíduo, uma vez que, por essa análise, sugere-se que a PDI não surtiu efeito para redução microbiana de nenhum MO do biofilme formado pelos voluntários “1, 4, 5 e 7”, já que os intervalos de confiança dos grupos PDI e controle se cruzaram. Para os voluntários “2 e 3”, a PDI possuiu efeito para as variáveis “log₁₀UFC/mL Geral” e “log₁₀UFC/mL de *Candida spp*”, respectivamente. O único voluntário em que a PDI apresentou efeito sobre mais de uma variável-resposta foi o “6”, onde foi possível observar redução microbiana para *S. mutans* (log₁₀UFC/mL de *S. mutans*) e MOs em geral (log₁₀UFC/mL Geral). No entanto, os dados apresentados são somente indicativos, de modo que a afirmação poderá ser de fato comprovada após conclusão do estudo e análise hierárquica.

Tabela 16 Valores médios de $\log_{10}$ UFC/mL e respectivos desvio-padrões e intervalos de confiança ($IC_{95\%}$) obtidos para cada meio de cultura em cada voluntário.

Voluntário	Estatística	<i>S. mutans</i>		<i>L. casei</i>		<i>Candida spp</i>		Todos	
		C-L-	C+L+	C-L-	C+L+	C-L-	C+L+	C-L-	C+L+
1	Média	3,41	3,40	3,35	3,68	-	-	3,73	3,68
	Desvio-padrão	0,30	0,36	0,23	0,33	-	-	0,35	0,31
	$IC_{95\%}$	3,03	2,96	3,07	3,27	-	-	3,29	3,30
		3,78	3,85	3,63	4,09	-	-	4,17	4,06
2	Média	3,65	3,11	3,40	3,29	1,94	1,38	4,61	3,42
	Desvio-padrão	0,21	0,36	0,24	0,06	0,99	1,13	0,17	0,37
	$IC_{95\%}$	3,39	2,66	3,10	3,22	0,71	-0,02	4,39	2,95
		3,90	3,56	3,69	3,36	3,16	2,78	4,83	3,88
3	Média	2,91	3,20	2,79	2,69	1,14	-	3,97	3,25
	Desvio-padrão	0,37	0,46	0,27	0,34	0,94	-	0,64	0,07
	$IC_{95\%}$	2,45	2,63	2,45	2,27	-0,02	-	3,17	3,17
		3,37	3,78	3,14	3,11	2,31	-	4,77	3,34
4	Média	3,94	3,79	3,12	3,12	1,54	0,34	3,98	3,23
	Desvio-padrão	0,11	0,07	0,26	0,11	0,78	0,68	0,64	0,08
	$IC_{95\%}$	3,80	3,70	2,79	2,97	0,57	-0,51	3,18	3,13
		4,07	3,87	3,44	3,26	2,51	1,19	4,78	3,33
5	Média	3,86	2,98	3,25	2,86	2,70	2,61	4,27	3,43
	Desvio-padrão	0,40	0,40	0,07	0,26	0,17	0,12	0,48	0,31
	$IC_{95\%}$	3,36	2,48	3,17	2,53	2,49	2,46	3,68	3,04
		4,37	3,48	3,34	3,19	2,90	2,75	4,86	3,81
6	Média	3,97	3,03	3,17	3,17	2,11	1,80	3,41	2,43
	Desvio-padrão	0,30	0,26	0,22	0,13	0,29	0,19	0,34	0,27
	$IC_{95\%}$	3,60	2,71	2,90	3,00	1,76	1,57	2,98	2,09
		4,34	3,35	3,44	3,34	2,47	2,04	3,83	2,77
7	Média	3,49	3,30	3,12	2,93	2,88	2,81	4,23	4,00
	Desvio-padrão	0,19	0,42	0,17	0,20	0,50	0,24	0,09	0,64
	$IC_{95\%}$	3,19	2,64	2,85	2,62	2,09	2,43	4,08	2,98
		3,80	3,97	3,39	3,24	3,68	3,19	4,38	5,02

Fonte: Elaboração própria.

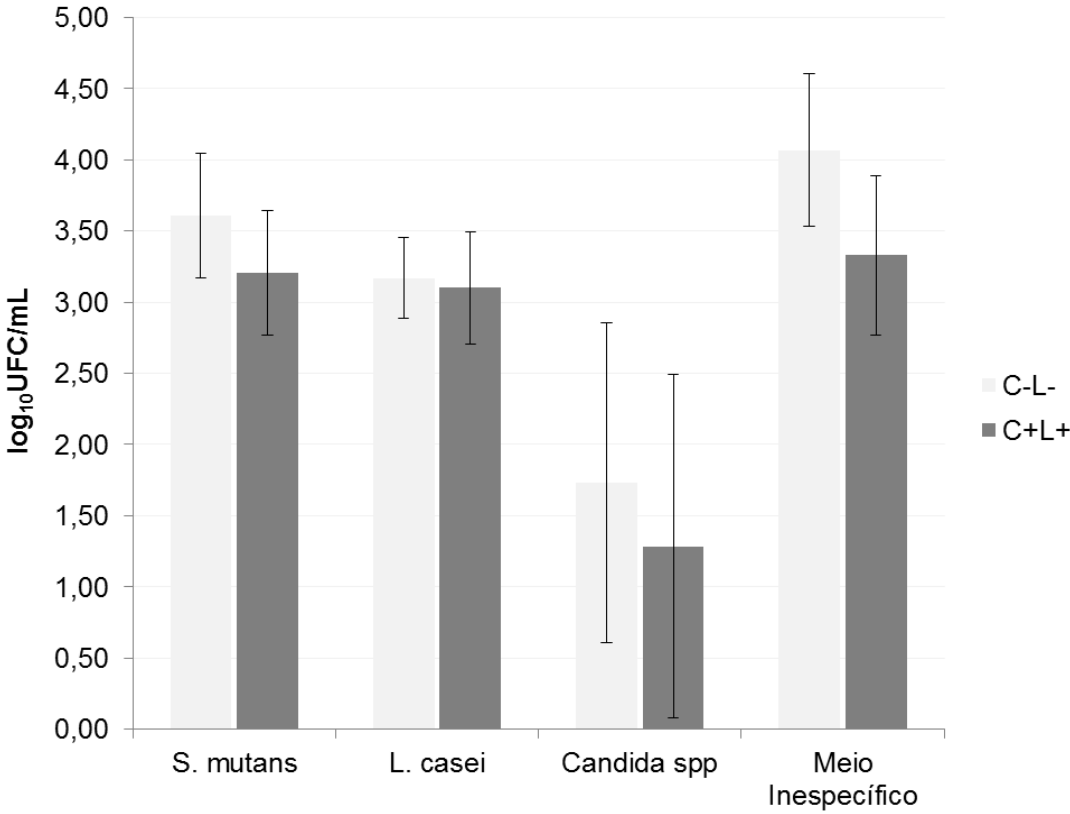
Na sequência, a estatística inferencial foi efetuada por meio de análise de variância multivariada a um fator (MANOVA), seguida de ANOVA a um fator, considerando nível de significância de 5% (Tabela 17). A MANOVA revelou que o fator Grupo de Tratamento teve um efeito de elevada dimensão e altamente significativo, sobre a viabilidade microbiana (Traço de Pillai = 0,453; $F_{(4; 73)}=15,127$; $p<0,0001$; $\eta^2_p=0,453$; Potência (π)=1,000). A ANOVA univariada de cada uma das variáveis dependentes mostrou que (Tabela 17) que houve efeito significativo do tratamento sobre a viabilidade de Sm e dos micro-organismos crescidos no meio inespecífico. A Figura 42 mostra que nesses casos, a PDI reduziu a viabilidade dos micro-organismos em relação as amostras controle.

Tabela 17 Sumário da ANOVA a um fator para análise dos valores de $\log_{10}$ (UFC/ml) para cada variável dependente.

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p	η_p^2	π
<i>S. mutans</i>	4,20	1,00	4,20	21,43	<0,001	0,22	1,00
<i>L. casei</i>	0,23	1,00	0,23	2,10	0,151	0,03	0,30
<i>Candida</i> spp	3,14	1,00	3,14	2,35	0,130	0,03	0,33
Meio Inespecífico	10,99	1,00	10,99	38,59	<0,001	0,34	1,00
Resíduo	14,88	76,00	0,20				
TOTAL	924,63	78,00					

Fonte: Elaboração própria.

Figura 42- Valores médios de $\log_{10}$ UFC/mL e respectivos desvio-padrões segundo os tratamentos (C-L- e C+L+).



Fonte: Elaboração própria.

Assim conclui-se que houve redução não significativa para *Candida* spp e *L. casei*, enquanto que a redução foi significativa para *S. mutans* e MOs em geral (cresceram no meio inespecífico).

6 DISCUSSÃO

A placa dentária é composta por diferentes tipos de MOs, como *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, sendo encontrada naturalmente nos dentes e sobre estruturas protéticas. Sua relação com o surgimento de lesões de cárie é clara pelo fato de favorecer a proliferação microbiana e proporcionar o aumento da produção dos ácidos responsáveis pela desmineralização do esmalte dental¹⁶. Desse modo, facilita a atuação de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus*, ambas consideradas os micro-organismos mais cariogênicos do biofilme dental em virtude da sua capacidade de utilizar os carboidratos advindos da dieta para se desenvolverem, bem como por serem acidogênicos e acidúricos^{16, 108}. Por isso, agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados com o intuito de prevenir a instalação e/ou progressão da lesão cariosa. Nesse cenário, a PDI tem sido o objeto de inúmeras investigações que buscam a redução microbiana de espécies encontradas na cavidade bucal.

Diversas investigações relatam a eficácia antimicrobiana da PDI mediada pela CUR^{13, 15-17, 53-54, 91, 98, 106-108, 123}, composto extraído do rizoma da *Curcuma Longa* que possui inúmeras propriedades bioativas, dentre elas, a ação antimicrobiana in vitro principalmente contra patógenos presentes na cavidade oral^{15-17, 52-54}. Apesar de sua instabilidade, não proporciona efeitos colaterais e interações medicamentosas^{17, 52}, sendo bastante aceita entre os pesquisadores da área. Não obstante, a CUR é um composto que apresenta baixa solubilidade em água, sendo o solvente orgânico como o DMSO, até o presente momento, o seu principal solvente. Contudo, em virtude de sua citotoxicidade, como por exemplo a possibilidade de causar injúrias na estrutura das membranas e paredes celulares, o DMSO não se torna um bom veículo para aplicações in vivo^{11, 29}.

A primeira etapa desse estudo investigou o efeito fotodinâmico da CUR veiculada em 3 diferentes formulações (hidrogel Quitosana, hidrogel Ácido oleico e DMSO a 10%) sobre biofilmes mono-espécie de *C. albicans*, *L. casei* e *S. mutans* formados in vitro. De acordo com os resultados obtidos, para as três espécies microbianas avaliadas, o tipo de formulação utilizado, o tipo de tratamento aplicado e

a interação entre esses dois fatores se mostraram altamente significativos ($p < 0,0001$), no entanto, o efeito (*effect size*) que o tipo de formulação utilizado exerceu sobre os diferentes micro-organismos sempre foi maior em comparação ao efeito do tipo de tratamento, sugerindo que a formulação foi a principal responsável pelas diferenças encontradas.

A CUR diluída em DMSO (10%) foi a única formulação capaz de reduzir significativamente a viabilidade dos três micro-organismos avaliados, quando comparado ao grupo controle. Em média, a redução atingida foi de 1,85log; 3,53log e 3,67log para *Ca*, *Sm* e *Lc*, respectivamente. Nossos achados corroboram diversos relatos recentes de literatura que também apontam a eficácia fotodinâmica das preparações de CUR em DMSO sobre diferentes espécies microbianas^{13, 53-54, 106, 108}. No entanto, os resultados para *C. albicans* foram menos pronunciados do que aqueles mostrados por Dovigo et al.⁵³, os quais obtiveram 80% de redução do metabolismo dos biofilmes de *Ca* utilizando uma concentração de CUR quatro vezes menor do que a testada na presente investigação. Provavelmente esse achado esteja relacionado ao fato de que concentrações maiores de CUR apresentam matizes mais acentuados, dificultando a penetração da energia luminosa e, portanto, reduzindo a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio⁵⁴. Além disso, o tempo de pré-irradiação de apenas 5 minutos pode ter favorecido o menor efeito sobre os biofilmes, como já reportado por Andrade et al.¹³ (2013). Quanto maior o tempo de contato do FS com o biofilme, maior a penetração no interior das camadas celulares, abrangendo maior quantidade de células e consequentemente, promovendo maior morte microbiana.

A utilização do sistema contendo ácido oleico como veículo para o preparo da CUR foi eficaz somente contra os biofilmes de *Sm*, causando uma redução de aproximadamente 1,55 log₁₀ em comparação aos biofilmes controle. O ácido oleico é um ácido graxo insaturado muito utilizado no preparo de produtos dermatológicos como sabonetes, cremes e emulsões cosméticas por possuir propriedades emolientes, sendo capaz de auxiliar na reposição da oleosidade perdida por peles ressecadas²⁶. Essa característica só é possível devido à grande cadeia lipofílica existente em sua estrutura, classificando-o como um composto de baixa afinidade com a água²⁶. Desse

modo, por ser mais compatível com moléculas hidrofóbicas poderia ser um bom veículo para a CUR ²⁶. Até o presente momento não existem relatos da inativação fotodinâmica mediada por CUR carregada em ácido oleico, não sendo possível realizar comparações dos nossos achados com outros estudos. A diferença de comportamento apresentada pelas diferentes espécies perante a terapia pode ser explicada em virtude da capacidade que as espécies de *Lactobacillus* possuem de se aderirem umas às outras envolvendo a formação de uma estrutura cristalina responsável pela hidrofobicidade da superfície, adaptando-se facilmente a mudanças ambientais ¹⁵. De modo geral, *Sm*, na forma planctônica ^{16, 106-108} e organizados em biofilme ¹⁵, parece ser susceptível à PDI mediada pela CUR em diferentes formulações. Araújo et al. em 2014 ¹⁵, avaliaram o efeito da PDI mediada por uma mistura de curcumina e curcuminóides (MCUR) sobre biofilmes multiespécies (*Sm* e *Lc*) e lesões cariosas em dentina, observando que a eficácia antimicrobiana foi diretamente proporcional à concentração utilizada da droga (MCUR em N- Dimetil – D-Glucamina diluída em água destilada) quando a dose de luz empregada foi 5,7 J/cm², chegando a atingir 100% de redução da viabilidade dos MOs. Nossos resultados também mostraram discreto efeito dessa formulação de CUR, sem iluminação, sobre *Sm*, o que não foi observado para as demais espécies. Bernegossi et al. ²⁶ relatou inativação completa de biofilme multiespécie após ter usado formulação contendo esse copolímero orgânico, sugerindo que possa realmente possuir efeito na ausência de luz. Assim, parece que a formulação contendo ácido oleico possui afinidade aumentada para inibição do *Sm* o que precisa ser melhor investigado a fim de compreender os mecanismos que levaram a esse resultado.

Adicionalmente, para todos os veículos testados em *C. albicans* e *L. casei*, os grupos em que se avaliou a ação isolada da CUR (C+L-) e da luz (C-L+) não apresentaram diferença estatística com relação aos respectivos controles.

Diferentemente das demais espécies, a aplicação isolada da CUR, tanto em DMSO como em Ácido oleico, mostrou discreta toxicidade para o *Sm*. Para as outras espécies avaliadas, a ação isolada da CUR e da luz não suscitou em qualquer diferença estatisticamente significativa em comparação aos respectivos controles, resultado que está em acordo com outros estudos ^{15-16, 106-108}.

Nenhum efeito antimicrobiano foi encontrado para a formulação de CUR veiculada em quitosana para todos os tratamentos efetuados e para todas as espécies avaliadas quando comparado ao controle positivo. Os achados encontrados para as formulações em hidrogel quitosana foram bastante distintos dos observados por Graciano et al.⁷⁵, o qual, embora tenha avaliado a eficácia da terapia fotodinâmica mediada por azul de toluidina em gel de quitosana sobre tecido tumoral in vivo, observou aumento no número de apoptoses após a terapia fotodinâmica quando comparado com o respectivo controle, embora tenha utilizado concentração diferente. Essa diferença encontrada pode estar relacionada ao fato de que a presente investigação objetivou avaliar a eficácia antimicrobiana da PDI sobre MOs organizados em biofilme, enquanto que Graciano et al.⁷⁵ avaliaram a terapia sobre células eucariontes, e é sabido que a inativação microbiana sobre biofilmes é muito mais complexa e difícil de ser atingida principalmente pela própria configuração física dos biofilmes¹³. Além disso, por se tratar de uma formulação com boa bioadesividade à superfície²⁶, pode-se sugerir que a formulação tenha permanecido superficialmente ao biofilme, não penetrando profundamente no seu interior, diminuindo assim a sua ação. Shrestha e Kishen¹³⁶ também avaliaram o efeito antimicrobiano da quitosana sobre *Enterococcus faecalis* na forma planctônica e verificaram completa inativação celular, diferentemente do observado no presente estudo.

Embora a espécie de *Sm* tenha sido susceptível à PDI mediada pela formulação de CUR em sistema contendo ácido oleico, foi nítido o maior potencial antimicrobiano da CUR em DMSO. É possível que a pronunciada diferença encontrada entre a eficácia da inativação fotodinâmica das formulações de quitosana e ácido oleico com as formulações que utilizaram o DMSO a 10% como diluente esteja relacionada à dificuldade de penetração no interior do biofilme microbiano¹³ por parte das formulações em hidrogel, as quais são consideravelmente mais viscosas do que as formulações líquidas²⁶. Além disso, outro fator que poderia ter sido responsável pela baixa ação antimicrobiana da PDI mediada pelas formulações em hidrogel seria a velocidade de liberação do fármaco, diminuindo assim, a quantidade da droga no interior das células e consequentemente, reduzindo a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio¹⁴¹. Assim, os resultados encontrados no estudo 1

confirmam que os efeitos fototóxicos da CUR podem ser altamente dependentes do tipo de preparação utilizada para solubilização, de modo que isso poderia explicar os distintos efeitos antimicrobianos encontrados nesta investigação.

Apesar da CUR em DMSO a 10% ter se mostrado a formulação mais eficaz no estudo 1, ela foi incluída somente para comparação com as outras formulações pois esta não atende os requisitos de um FS seguro e compatível para utilização intrabucal quando nessa concentração. Assim, a formulação em ácido oleico foi selecionada para a execução dos estudos subsequentes.

Resinas compostas são materiais restauradores utilizados para restaurações de elementos dentais posteriormente à remoção do tecido careado. As resinas são constituídas basicamente por matriz orgânica que envolve uma matriz inorgânica, sendo que a primeira pode ser composta por diferentes tipos de monômeros resinosos como BisGMA (Bisfenol-A glicidil metacrilato), UDMA (Uretano dimetacrilato) ou TEDGMA (Trietileno glicol dimetacrilato), dentre outros. A matriz inorgânica é formada por partículas de carga como quartzo, sílica, bário, estrôncio, dentre outros ⁶⁶. De acordo com a dimensão da partícula de carga utilizada, a resina será classificada em macroparticulada (partículas com dimensão entre 15 a 100 μm), microparticulada (partículas de dimensão entre 0,01 a 0,06 μm), híbrida (partículas entre 0,6 e 3,0 μm), microhíbrida (partículas entre 0,4 e 2,0 μm), nanoparticulada (partículas entre 5 e 70 nm) ou nanohíbrida (partículas entre 0,04 e 3,0 μm) ^{121, 130}. Essas partículas dispersas na matriz orgânica são as responsáveis por conferir às resinas características como resistência ao manchamento, maior ou menor dureza e rugosidade superficial ⁴⁴.

O presente estudo investigou os possíveis efeitos que a PDI poderia causar sobre materiais restauradores resinosos. Uma vez que a etapa de acabamento e polimento foi padronizada para todos os corpos de prova confeccionados, é possível concluir que as alterações de cor encontradas na presente investigação foram originadas ou pelas próprias características do material avaliado ou pelos tratamentos efetuados ⁴⁴. Os resultados encontrados para a resina microhíbrida TPH mostraram que, independentemente do tempo avaliado, os valores de ΔE foram estatisticamente iguais, indicando que a PDI não promoveu qualquer efeito negativo sobre a superfície da resina. O baixo índice de manchamento também foi observado em estudos que

avaliaram a estabilidade de cor de resinas do tipo microhíbridas após imersão em soluções corantes como café, refrigerantes a base de cola e chá ¹⁵¹. Além disso, é possível que os compostos presentes no sistema de hidrogel ácido oleico apresentaram baixa afinidade com a matriz orgânica da resina, não ocorrendo a dissolução do material e consequentemente não havendo a formação de *gaps* que poderiam prender as moléculas corantes por entre as partículas de carga. Diferentemente, os resultados obtidos para os cps confeccionados em resina microhíbrida AML indicaram que no tempo “imediatamente após os tratamentos” os espécimes pertencentes ao grupo CN apresentaram alteração significativa do ΔE quando comparado com os pertencentes ao grupo PDI. No entanto, decorridos os 60 dias dos tratamentos, o grupo PDI apresentou um aumento considerável do ΔE , atingindo a média encontrada nos grupos CN e AcO e se mostrando estatisticamente igual a eles. Esse ocorrido pode indicar que algum componente da formulação de CUR veiculada em hidrogel ácido oleico evitou a pigmentação dos espécimes pertencentes ao grupo PDI imediatamente após o tratamento, podendo ter sido por adsorção à superfície dos cps ou ainda por alguma interação química que com o passar do tempo foi perdendo sua força e permitiu que os espécimes apresentassem um aumento do ΔE . Por outro lado, também foi observada grande variabilidade em todos os grupos da resina AML e, portanto, seus resultados devem ser vistos com cautela. No momento da confecção dos cps, notou-se que este material apresentava consistência mais pegajosa, o que facilitou a formação de bolhas, as quais eram visíveis a olho nu. Embora os cps que apresentaram bolhas visíveis tenham sido descartados, é possível que no momento do polimento pequenas bolhas presentes no interior dos cps tenham sido evidenciadas facilitando a penetração da formulação e influenciando diretamente na alteração da cor. Em virtude de ambas as resinas TPH e AML serem microhíbridas, era esperado que o mesmo comportamento apresentado pelos espécimes confeccionados em resina TPH fosse encontrado naqueles confeccionados em AML. Assim, é possível que a distinção apresentada entre os respectivos resultados esteja, de fato, relacionada às características individuais de cada resina composta e a maior variabilidade nas leituras da AML, uma vez que há relatos de ambos os comportamentos para as resinas microhíbridas avaliadas ^{10, 44, 66, 95,}

A única resina composta que apresentou ΔE maior no tempo “imediatamente após a PDI” quando comparado com o respectivo CN foi a Z350, no entanto, decorridos os 60 dias pós-tratamentos, o ΔE diminuiu, de modo que a alteração de cor encontrada se manteve estatisticamente igual ao seu CN. Uma vez que os corantes podem manchar a resina tanto por absorção quanto por adsorção^{76, 137,151}, esse resultado sugere que a alteração de cor tenha ocorrido superficialmente à resina e que o período em que os espécimes do grupo PDI permaneceram em saliva artificial pode ter feito com que os resíduos de CUR se desprendessem da superfície dos cps, indicando que a coloração não seja permanente⁹⁵. Esse achado para a resina Z350 também foi encontrado por outros autores que avaliaram a estabilidade de cor^{42, 95}, sugerindo que a Z350 seja mais susceptível à pigmentação imediata do que a TPH. Provavelmente a aparente “resistência” que a TPH apresenta quanto a alteração de cor quando comparada com a Z350 esteja relacionada com a composição, distribuição e dispersão das partículas de carga na matriz orgânica, permitindo que uma maior área da matriz orgânica fique exposta a ação de corantes^{42, 76, 95, 137, 151}.

A dureza superficial das resinas compostas está intimamente relacionada com o tipo de matriz orgânica e partículas de carga presentes em sua composição, meios de imersão e método de polimento⁴⁴. Assim, a menor resistência oferecida pela resina à penetração do diamante durante os testes de microdureza poderia ser um indicativo indireto de menor resistência ao desgaste oriundo dos esforços mastigatórios a que seria submetida na cavidade oral. Esse estudo verificou que a PDI não promoveu efeito deletério sobre as resinas TPH e AML, uma vez que para todos os grupos avaliados, a dureza não se alterou no tempo “60 dias após”. Em contrapartida, para a resina Z350, os espécimes pertencentes ao grupo PDI apresentaram uma redução significativa da dureza no tempo “60 dias após” quando comparado ao controle, sugerindo que a PDI mediada por CUR veiculada em hidrogel ácido oleico tenha promovido um efeito negativo sobre essa propriedade. Embora algumas pesquisas que avaliaram a dureza de resinas após exposição à agentes clareadores tenham concluído que não houve diferença significativa entre a dureza nos grupos controle e experimental para Z350^{9, 42, 112}, há quem diga que os radicais livres produzidos durante o procedimento clareador podem afetar negativamente a interface matriz

orgânica-partículas de carga, promovendo a formação de gaps por ruptura da ligação química entre eles, o que contribuiria para a redução da dureza do material ⁵⁵. Em vista de que a aplicação da terapia fotodinâmica também promove a formação de radicais livres, é possível sugerir que os radicais livres formados se comportem da mesma maneira que aqueles formados durante o procedimento de clareamento dental. Em virtude da grande variedade de protocolos utilizados para clareamento, torna-se difícil se realizar uma comparação entre os efeitos que o procedimento de clareamento promove sobre a dureza de materiais resinosos daqueles proporcionados pela PDI. Entretanto, uma vez que a longevidade das restaurações resinosas é diretamente dependente das propriedades estéticas, físicas e biológicas das resinas ^{9, 42, 55, 112}, deve-se considerar que a diminuição dos valores de dureza observada nos cps pertencentes ao grupo PDI da resina Z350 poderá ser um fator limitante do uso da Inativação Fotodinâmica, mediada por CUR veiculada no sistema denominado hidrogel ácido oleico, em sítios da cavidade oral que estejam próximos de elementos dentais restaurados com Z350.

De acordo com os resultados, foi possível verificar que os valores de rugosidade das resinas TPH e Z350 não foram alterados independentemente do grupo a que pertenciam, indicando que nem a PDI nem o sistema utilizado para veicular a CUR (AcO) foram capazes de promover qualquer alteração relacionada a variável rugosidade superficial. Adicionalmente, embora as resinas TPH e Z350 possuam diferenças em sua composição (Figura 7), foi possível dizer que a rugosidade superficial encontrada para ambas se mostrou semelhante. Esse resultado também foi relatado por pesquisadores que avaliaram rugosidade superficial de resinas microhíbridas e nanoparticuladas e verificaram que devido às características das partículas de carga existentes na Z350, suas propriedades mecânicas teriam ficado tão satisfatórias quanto as encontradas em resinas híbridas e microhíbridas ^{9, 112, 137}. Em contrapartida, os espécimes confeccionados a partir da resina AML e pertencentes aos grupos PDI e AcO tiveram a rugosidade superficial significativamente semelhante entre si e aumentada quando comparados com aqueles pertencentes ao CN (Figura 39). Desse modo é possível sugerir que o efeito encontrado tenha ocorrido por algum dos componentes existentes no sistema hidrogel ácido oleico, que pode ter sido capaz de

alterar a dispersão das partículas na matriz resinosa, levando ao aumento significativo da rugosidade superficial⁹. Mais estudos seriam necessários para melhor analisar esse comportamento.

Em contraste com os resultados encontrados para os cps de resina, os confeccionados por esmalte dental bovino não apresentaram comportamento que sugerisse uma possível influência da PDI sobre a alteração de cor e sim uma influência natural do tempo de armazenamento em saliva artificial, uma vez que, ao final dos tempos avaliados, a alteração de cor foi igual para todos os grupos. Sendo assim, há o indicativo de que as mudanças de cor encontradas ocorreriam naturalmente, independentemente dos tratamentos realizados. De forma diferente, estudos que avaliaram a estabilidade de cor de cps em esmalte dental após imersão em soluções corantes observaram uma alteração de cor estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle, indicando que o corante, de fato, foi um fator determinante para a variação de cor encontrada¹¹¹. Do mesmo modo que o observado para as alterações de cor sobre cps confeccionados a partir de esmalte dental bovino, o fator “tratamento” não apresentou influência sobre suas propriedades mecânicas de rugosidade, sendo o fator “tempo” o responsável pela diminuição desses valores na medida realizada 60 dias após a realização dos tratamentos. Os resultados encontrados para os cps em esmalte dental bovino diferenciam-se daqueles obtidos em estudos que avaliaram as propriedades mecânicas do esmalte após clareamento dental, em que se vê uma redução da microdureza, sendo recuperada após, pelo menos, 1 semana de imersão em saliva artificial^{1, 50, 105}.

Os resultados encontrados na presente investigação permitem concluir que a PDI parece não ter potencial de promover alterações estéticas e mecânicas na superfície do esmalte, podendo ser aplicada com segurança na prática clínica. Entretanto, os resultados obtidos para as resinas compostas após avaliação de alteração de cor, rugosidade e dureza mostram que algum efeito deletério pode ocorrer dependendo do tipo de material restaurador, sendo importante que mais investigações sejam conduzidas com diferentes formulações e, talvez, com CUR em menores concentrações para que os achados sejam confirmados. Assim, a utilização da PDI

para descontaminação de sítios específicos em esmalte pode ser mais segura do que a descontaminação geral que pode envolver o contato com materiais restauradores.

Uma vez concluídas as etapas iniciais que indicaram a formulação em Ácido Oleico como possível veículo para preparo da CUR, a terceira parte dessa pesquisa foi iniciada por meio da avaliação do efeito antimicrobiano da PDI em biofilmes formados *in situ* sobre o esmalte dental.

A placa dentária é reconhecidamente um sistema microbiano complexo e multiespécie, no entanto são substancialmente poucos os estudos que investigam a eficácia da PDI sobre MOs organizados nesses biofilmes^{13, 15, 52-54}. Adicionalmente, grande parte dessas investigações limita-se em descrever uma única espécie^{13, 52-54, 91}, sendo raras as pesquisas sobre biofilmes formados por duas espécies¹⁵ ou ainda sobre biofilmes multiespécies^{104, 147}. Esse fato se torna relevante, uma vez que quase todas as bactérias existentes na natureza crescem em comunidades, onde os MOs funcionam organizadamente como uma sociedade, apresentando características distintas daquelas encontradas em células em suspensão, como por exemplo, maior resistência a ação de antimicrobianos^{32, 92, 104}.

Nossos resultados mostraram que a PDI mediada pela CUR carregada pelo sistema denominado hidrogel ácido oleico manteve seu efeito apenas sobre o *Sm*, fato que já havia sido verificado no estudo *in vitro*, sugerindo que *Sm* seja, realmente, mais susceptível à essa terapia do que os outros MOs presentes no biofilme multiespécie. Esses resultados, corroboram outras investigações que avaliaram a PDI mediada por CUR sobre cepas de *Sm*, como Paschoal et al.^{106, 108} em que chegou a atingir total inativação (0,75 mM de CUR + 24 J/cm²)¹⁰⁶ e uma redução de 71,07% da viabilidade (4 mM de CUR + 72 J/cm²)¹⁰⁸ dos MOs quando em forma planctônica. Do mesmo modo, Araujo et al.¹⁶ conseguiram completa inativação de *Sm* também em suspensão após utilizar CUR a 1,5 g/L associada com dose de 5,7 J/cm². Esses resultados, embora sobre cepas de *Sm* dispersos em suspensões, indicam a susceptibilidade da espécie à inativação fotodinâmica mediada pela CUR. A menor redução da viabilidade de *Sm* encontrada na presente investigação pode ter ocorrido por termos avaliado a PDI sobre biofilmes, os quais comprovadamente reduzem a ação fotodinâmica por

dificultarem a penetração/difusão dos fármacos no interior do biofilme, diminuindo a ação sobre as células localizadas mais profundamente na estrutura^{32,92, 104, 147}. Além disso, a reduzida eficácia da PDI sobre biofilmes pode estar relacionada ao fato de que, quando organizados desse modo, os MOs desenvolvem alterações gênicas e fenotípicas que influenciam negativamente na ação de terapias antimicrobianas quando comparadas com células em sua forma planctônica^{32, 147}.

Os efeitos pouco pronunciados encontrados neste estudo corroboram aqueles observados por Panhoca et al.¹⁰⁴ após verificar a eficácia da PDI (PIT de 5 min; 45J/cm²; LED azul) mediada por dois diferentes fotossensibilizadores (CUR a 1500 µg/ml e Photogem a 1000 µg/ml, ambos solubilizados em água destilada) sobre biofilme de Sm formado in situ (7 dias). Em sua investigação, Panhoca et al.¹⁰⁴ observaram que ambos os fármacos quando associados à luz, com comprimento de onda específico para cada uma, promoveram redução significativa da viabilidade de Sm. Não obstante, o protocolo que utilizou o Photogem como fotossensibilizador proporcionou uma porcentagem de redução de 18%, enquanto que para CUR, uma porcentagem de redução de 15% foi observada. Em contrapartida, Teixeira et al.¹⁴⁷ observaram que a PDI reduziu significativamente a viabilidade microbiana (azul de toluidina a 100 µg/ml; PIT de 5 min; 55 J/cm²; LED vermelho) ($p < 0,01$) dos biofilmes monoespécies formados in vitro, enquanto que os biofilmes formados in situ não mostraram susceptibilidade quando comparado ao grupo controle. Provavelmente as diferenças relacionadas à eficácia da PDI entre os resultados observados para os biofilmes formados in vitro daqueles que cresceram in situ podem ser explicadas pelo fato de que, biofilmes formados naturalmente na cavidade oral consistem de centenas de bactérias e fungos organizados de forma complexa em uma matriz orgânica de pelo menos 1 mm de espessura, enquanto que biofilmes reproduzidos em laboratório muito dificilmente chegarão a tamanha complexidade. Sendo assim, o caminho que o fotossensibilizador precisa percorrer para atingir as células localizadas nas camadas mais profundas do biofilme é muito mais longo e difícil^{32, 128, 147}.

Além do efeito observado para as cepas de Sm, houve redução de crescimento de MOs plaqueados no meio inespecífico, indicando que outros MOs, que não aqueles avaliados em meios específicos, podem também ter sofrido efeito da PDI. A literatura

relata que em uma pequena amostra de placa dentária, é possível encontrar de 12 até 27 espécies de MOs como, por exemplo, *Actinomyces* spp, *Haemophilus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Veillonella* spp e *Neisseria* ⁹². Dessa forma, é possível que outras espécies bacterianas tenham sido susceptíveis a terapia aplicada, o que precisa ser melhor avaliado em estudos futuros. Recentemente, Santin et al. ¹²⁸ realizaram uma revisão sistemática da literatura sobre inativação fotodinâmica e placa dentária, chegando à conclusão de que a grande maioria das investigações avaliam a PDI sobre MOs em sua forma planctônica e os poucos estudos que avaliam a eficácia da PDI sobre MOs organizados em biofilme, o fazem sobre biofilmes in vitro, sendo poucos os relatos do uso da PDI sobre biofilmes multiespécies formados in situ. No entanto, os autores reforçam a necessidade de se atentar para a elaboração de um bom delineamento experimental que contemple fatos importantes como número amostral, aleatorização das amostras e cegamento dos envolvidos na pesquisa.

É importante destacar a grande variabilidade encontrada de UFC/mL para a variável “log₁₀UFC/mL de *Candida* spp”, o que certamente influenciou na decisão da análise estatística realizada. Alguns indivíduos não apresentaram espécies de *Candida* no biofilme formado influenciando na variabilidade dos resultados. Ainda quanto ao efeito da PDI, os dados obtidos sugerem diferenças relacionadas aos indivíduos, indicando que a eficácia da terapia pode estar diretamente associada à flora microbiana de cada um, bem como ao pH da saliva, ao fluxo salivar e tipo de dieta, os quais acarretam maior ou menor prevalência de determinadas espécies microbianas ^{92, 128}. Além disso, a flora bucal também poderá sofrer alterações quando da presença de lesão de cárie ativa, a qual dependendo de sua localização poderá apresentar maior predominância de alguns patógenos e menor de outros ⁹². Esse viés poderá ser solucionado quando a amostra estiver completa, uma vez que de acordo com a literatura, grande é a susceptibilidade de *Candida* spp frente a PDI ^{13, 53-54}. Em contrapartida, para as cepas de Lc, a diferença entre os grupos controle e experimental foi muito pequena, sendo possível que ela realmente não exista. Assim, esperamos obter conclusões mais definitivas após a utilização de uma amostra maior, permitindo uma abordagem hierárquica por meio da qual poderemos inferir se o efeito da PDI é igual ou diferente entre os indivíduos voluntários.

7 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Embora a eficácia da PDI mediada pela CUR para redução de biofilmes formados *in vitro* tenha sido comprovada, esta encontra-se diretamente relacionada ao tipo de veículo usado para a solubilização do fotossensibilizador. Adicionalmente, dentre as formulações testadas, a veiculada no sistema denominado hidrogel ácido oleico se mostrou promissora para inativação de cepas de *Streptococcus mutans*.
2. Nos estudos *in vitro* sobre corpos de prova confeccionados em resinas compostas e esmalte dental bovino, a formulação de CUR veiculada no sistema denominado hidrogel ácido oleico indica não possuir qualquer potencial deletério sobre as propriedades de dureza, rugosidade e cor da superfície de esmalte dental bovino, podendo, portanto, ser aplicada sobre ela com segurança. Em contrapartida, os resultados mostraram que, dependendo do tipo de resina, é possível haver algum efeito deletério frente ao uso da PDI mediada por CUR veiculada no sistema hidrogel ácido oleico, de modo que seu uso sobre superfícies de restaurações deve ser indicado mais criteriosamente.
3. Os resultados encontrados no estudo piloto *in situ* mostraram que as espécies que cresceram em meio de cultura inespecífico e a espécie de *Streptococcus mutans* parecem ser susceptíveis à PDI mediada por CUR veiculada no sistema hidrogel ácido oleico. Além disso, os dados sugerem que a eficácia da PDI sobre biofilme multiespécie seja diretamente relacionado às particularidades de cada indivíduo, o que precisa ser mais bem elucidado em estudos futuros.

REFERÊNCIAS ¹

1. Abouassi T, Wolkewitz M and Hahn P. Effect of carbamide peroxide and hydrogen peroxide on enamel surface: an in vitro study. Clin Oral Invest. 2011; 15 (5): 673–80.
2. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41 (1):40-59.
3. Aires CP, Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. Caries Res. 2008; 42 (5): 380 – 6.
4. Aires CP. Efeito da concentração de sacarose no biofilme dental formado in situ no desenvolvimento da cárie [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2004.
5. Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chem Biol Interact. 2008; 174 (1): 27 - 37.
6. Al Maghlouth A, Al Youself Y, Al Bagieh N. Qualitative and quantitative analysis of bacterial aerosols. J Contemp Dent Pract. 2004; 5 (4): 91 - 100.
7. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus spp.*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella spp.* in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. J Med Microbiol. 2007; 56 (5): 681 – 7.
8. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. Future Oncol. 2010; 6 (6): 929-40.
9. AlQahtani MQ. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the microhardness of four types of direct resin based restorative materials. Oper Dent. 2013; 38 (3): 316-23.

¹ * De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

10. Ameri H, Chasteen JE, Ghavamnasiri M, Torkzadeh M. Effect of a bleaching agent on the color stability of a microhybrid composite resin. *Rev Clín Pesq Odontol.* 2010; 6 (3): 215-21.
11. Anchordoguy TJ, Carpenter JF, Crowe JH, Crowe LM. Temperature-dependent perturbation of phospholipid bilayers by dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1104 (1): 117–22.
12. Anderson GG, O’Toole GA. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 85-105.
13. Andrade MC, Ribeiro APD, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013; 58 (2): 200-10.
14. Announcement: Reducing our irreproducibility. *Nature.* 2013; 496(7446): 398.
15. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014; 29 (2): 629–35.
16. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Las Surg.* 2012; 30 (7): 393–9.
17. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30 (2): 96 – 101.
18. Attia ML, Aguiar FH, Mathias P, Ambrosano GM, Fontes CM, Liporoni PC. The effect of coffee solution on tooth color during home bleaching applications. *Am J Dent.* 2009; 22 (3): 175-9.
19. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110 (1):48-53.
20. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (2): 147–52.

21. Bailey SJ, Swift EJJr. Effects of home bleaching products on composite resins. *Quintessence Int.* 1992; 23 (7): 489–94.
22. Balasubramanian K. Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J Agric Food Chem.* 2006; 54 (10): 3512-20.
23. Barbieri GM, Mota EG, Rodrigues - Junior Jr SA, Burnett Jr LH. Effect of whitening dentifrices on the surface roughness of commercial composites. *J Esthet Restor Dent.* 2011; 23 (5): 338–46.
24. Becker AB, Costa SXS, Rastelli ANS, Andrade MF, Bagnato VS, Bier CAS. Influência dos agentes clareadores na microdureza de resina composta nanoparticulada. *RGO.* 2009; 57 (1): 27-31.
25. Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res.* 1993; 27 (4): 280– 4.
26. Bernegossi J, Calixto GMF, Sanches PRS, Fontana CR, Cilli EM, Garrido SS et al. Peptide KSL-W-loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative treatment for multispecies oral biofilm. *Molecules.* 2016; 21 (1): E 37.
27. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of photofrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48 (6): 2000–6.
28. Brundish DE, Love WG. Photodynamic therapy comes of age. *IDrugs.* 2000; 3 (12): 1487-508.
29. Bruzell EM, Morisbak E, Tonnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4 (7): 523–30.
30. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol.* 1994; 59 (3): 295-302.
31. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2013; 48 (6): 696-705.

32. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 12 (5): 405.
33. Colussi VC, Nicola EMD, Nicola JH. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. *Rev Assoc Med Bras.* 1996; 42 (4): 229-36.
34. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284 (5418):1318-22.
35. Cullen DR, Nelson JA, Sandrik JL. Peroxide bleaches: effect on tensile strength of composite resins. *J Prosthet Dent.* 1993; 69 (3): 247-9.
36. Cury JA, Rebello MAB, Del BelCury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31 (5): 356-60.
37. Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTV, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000; 34 (6): 491-7.
38. da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbert FLCV. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers Med Sci.* 2014; 30 (7):1867-72.
39. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chignell CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem. Photobiol.* 1994; 59 (3): 290-4.
40. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol.* 1989; 151 (2): 183-5.
41. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2 (2): 114-22.
42. de Andrade ICG, Basting RT, Rodrigues JA, do Amaral FLB, Turssi CP, França FMG. Microhardness and color monitoring of nanofilled resin composite after bleaching and staining. *Eur J Dent.* 2014; 8 (2): 160-5.
43. De Carvalho Junior OB. Avaliação in vitro da dureza superficial, da contração de polimerização e da rugosidade de 29 resinas compostas [Tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

44. de Oliveira ALBM, Garcia PPNS, dos Santos PA, Campos JADB. Surface roughness and hardness of a composite resin: influence of finishing and polishing and immersion methods. *Mat Res.* 2010; 13 (3): 409-15.
45. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials.* 2009; 30 (18): 3158-66.
46. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72 (4): 2837-48.
47. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115 (6): 459-67.
48. Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24 (1): 69-75.
49. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology.* 2009; 155 (7): 2116-26.
50. Donassollo SH, Fabris C, Gagliola M, Kerber I, Caetano V, Carboni V, Salas MMS, Donassollo TA, Demarco FF. In situ and in vitro effects of two bleaching treatments on human enamel hardness. *Braz Dental J.* 2016; 27 (1): 56-9.
51. Dougherty TJ. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *J Clin Laser Med Surg.* 1996; 14 (5): 219-21.
52. Dovigo LN, Carmello JC, Costa CAS, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51 (3): 243-51.
53. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of Curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43 (9): 927-34.
54. 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; 87 (4): 895-903.

55. Durner J, Obermaier J, Ilie N. Investigation of different bleaching conditions on the amount of elutable substances from nano-hybrid composites. *Dent Mater.* 2014; 30 (2): 192–9.
56. Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9 (3): 365-9.
57. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103 (11): 1545-57.
58. Fermanian J. Measuring agreement between 2 observers: a quantitative case. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 1984; 32 (6): 408-13.
59. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006; 22 (3): 211–22.
60. Ferraz da Silva JM, Maranha da Rocha D, Kimpara ET, Uemura ES. Resinas compostas: estágio atual e perspectivas. *Rev Odonto.* 2008; 16 (32): 98-104.
61. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod.* 2008; 34 (6): 728-34.
62. Fisher RA. Intraclass correlations on the analysis of variance. In: Fisher RA. *Statistical methods for research workers.* 14th ed. Edinburg: Oliver and Boyd; 1970. p. 213-49.
63. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc.* 1960; 61: 9-19.
64. Florez FLE. PDT em micro-organismos cariogênicos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.
65. Fontana CR, Abernathy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009; 44 (6): 751–9.
66. Fontes ST, Fernández MR, de Moura CM, Meireles SS. Color stability of a nanofill composite: effect of different immersion media. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17 (5): 388-91.

67. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2007; 39 (10): 782–7.
68. Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, Ainsworth AJ, Patrick C, Martin MS, et al. Mupirocin and chlorhexidine resistance in *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57 (1): 559-68.
69. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005; 13 (1): 34-40.
70. George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci*. 2009; 8 (6):788–95.
71. Gilthorpe MS, Maddick IH, Petrie A. Introduction to multilevel modeling in dental research. *Comm Dent Health*. 2000; 17 (4): 222-6.
72. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E. Undesirable and adverse effects of tooth whitening products: a review. *Clin Oral Investig*. 2010; 14 (1): 1–10.
73. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145 (4): 477-89.
74. Goulart RC, Bolean M, de Paiva-Paulino T, Thedei G, Souza SLS, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28 (Suppl 1): S53-60.
75. Graciano TB, Coutinho TS, Cressoni CB, Freitas CP, Pierre MBR, Pereira SAL, et al. Using chitosan gels as a toluidine blue O delivery system for photodynamic therapy of buccal cancer: In vitro and in vivo studies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015; 12 (1): 98-107.
76. Gurdal P, Akdeniz BG, Hakan Sen B. The effects of mouthrinses on microhardness and colour stability of aesthetic restorative materials. *J Oral Rehabil*. 2002; 29 (9): 895-901.
77. Haas R, Dorbudak O, Mensdorff-pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensibilization and soft laser. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 1997; 8 (4): 249-54.

78. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003; 37 (5): 339–44.
79. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55 (1): 145-57.
80. Jori G, Clara Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38 (5): 468-81.
81. Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, et al. Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods.* 2010; 81 (2): 166-74.
82. Junqueira HC, Severino D, Dias LG, Gugliotti M, Baptista MS. Modulation of the methylene blue photochemical properties based on the adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys Chem Chem Phys.* 2002; 4 (11): 2320-8.
83. Kato TI, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegós GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57 (1): 445-51.
84. Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil.* 2003; 30 (8): 790–5.
85. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4 (7): 503-9.
86. Leite DPV, Paolillo FR, Parmesano TN, Fontana CR and Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32 (11): 627-32.
87. Leites ACBR, Pinto MB, Souza ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita.* 2006; 25 (2): 135-48.

88. Liporoni PC, Souto CM, Pazinato RB, Cesar IC, Rego MA, Mathias P, et al. Enamel susceptibility to coffee and red wine staining at different intervals elapsed from bleaching: a photorefectance spectrophotometry analysis. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 (Suppl 2): S105-9.
89. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50 (4): 353–80.
90. Malkondu O, Yurdagüven H, Say EC, Kazazoglu E, Soyman M. Effect of bleaching on microhardness of esthetic restorative materials. *Oper Dent.* 2011; 36 (2):177-86.
91. Mang TS, Tayal DP, Baier R. Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Laser Surg Med.* 2012; 44 (7): 588–96.
92. March PD. Dental Plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (Suppl 6): 7-15.
93. Maroco J. Análise estatística com o PASW statistics: Modelos lineares hierárquicos. 6. ed. Lisboa: ReportNumber; 2012.
94. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin microbiol rev.* 1999; 12 (1): 147-79.
95. Mendes APKF, Barceleiro MO, dos Reis RSA, Bonato LL, Dias KRHC. Changes in surface roughness and color stability of two composites caused by different bleaching agents. *Braz Dent J.* 2012; 23 (6): 659–66.
96. Moi GP. Análise do perfil proteômico do biofilme dental formado in situ na presença de glicose + frutose e sacarose [Tese de Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 2010.
97. Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, et al. Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2013; 48 (5): 591-9.

98. Nagata JY, Hioka N, Kimura E, Batistela VR, Terada RSS, Graciano AX, et al. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiag Photochem Ther.* 2012; 9 (2):122-31.
99. Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Del Bel Cury AA, Cury JA. In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. *J Oral Sci.* 2007; 49 (2):147-54.
100. Omata Y, Uno S, Nakaoki Y, Tanaka T, Sano H, Yoshida S, et al. Staining of hybrid composites with coffee, oolong tea, or red wine. *Dent Mater J.* 2006; 25 (1):125-31.
101. Paes Leme AF, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Efeito da associação da aplicação de fluoreto profissional e uso de dentifrício no esmalte dental. *RGO.* 2007; 55 (1): 35-40.
102. Palmer – RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE. Rapid succession within the *Veillonella* population of a developing human oral biofilm in situ. *J Bacteriol.* 2006; 188 (11): 4117–24.
103. Palmer - RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of *Streptococci* and *Actinomyces* detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003; 185 (11): 3400–9.
104. Panhóca VH, Florez FLE, de Faria Júnior NB, Rastelli ANS, Tanomaru JMG, Kurachi C, et al. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm in situ. *J Contemp Dent Pract.* 2016; 17 (3): 184 - 91.
105. Parreiras SO, Vianna P, Kossatz S, Loguercio AD, Reis A. Effects of light activated in-office bleaching on permeability, microhardness, and mineral content of enamel. *Oper Dent.* 2014; 39 (5): 225-30.
106. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2013; 30 (2): 885–90.

107. Paschoal MA, Santos-Pinto L, Lin M and Duarte S. *Streptococcus mutans* photoinactivation by combination of short exposure of a broad-spectrum visible light and low concentrations of photosensitizers. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32 (3): 175–80.
108. Paschoal MA, Fontes CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10 (3): 313-9.
109. Perfil técnico do produto TMFiltek Z350. [Internet] Campinas, Brasil: 3M do Brasil, 2010. [acesso em 2016 out 1]. Disponível em: http://multimedia.3m.com/mws/media/656233O/perfil-tecnico-filtek-z350-xt.pdf?fn=TPP%20FiltekZ350XT_PTLow_OK.pdf.
110. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32 (5): 319-21.
111. Pirolo R, Mondelli RFL, Correr GM, Gonzaga CC, Furuse AY. Effect of coffee and a cola-based soft drink on the color stability of bleached bovine incisors considering the time elapsed after bleaching. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22 (6): 534 - 40.
112. Pitacas HMG, Cavalheiro A, Coito C, Silva A, Eira R, Lopes M. Effect of external tooth bleaching on the surface of resin composites – An in vitro study. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilo Fac.* 2015; 56 (3): 149–55.
113. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol.* 1999; 55 (2): 95–100.
114. Pontes AP, Mainieri ET, Pacheco JFM, Martins JL, Shinkai RAS, Mainieri VC. Surface roughness of microparticulated and nanoparticulated composites after finishing and polishing procedures. *RGO.* 2009; 57 (2): 179-82.
115. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol.* 2009; 10 (2): 81-95.

116. Pupo YM, Gealh C, Escobar N, Hilgenberg SP, Verde FV, Gomes OMM, et al. Efeito de agentes clareadores de uso caseiro na rugosidade superficial de resinas compostas: microhíbrida x nanohíbrida. Rev Dentística [de série na internet]. 2011 [acesso em 16 set 2016]; 10 (20): 45-9. Disponível em: www.ufsm.br/dentisticaonline.
117. Rajasekaran SA. Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. World J Gastrointest Pathophysiol. 2011; 2 (1): 1-14.
118. Rattacaso RMB, Garcia LFR, Aguilar FG, Consani S, Pires-de-Souza FCP. Bleaching agent action on color stability, surface roughness and microhardness of composites submitted to accelerated artificial aging. Eur J Dent. 2011; 5 (2): 143–9.
119. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M, et al. In vitro fungicidal photodynamic effect of hipericin on *Candida* species. Photochem Photobiol. 2012; 88 (3): 613-9.
120. Ribeiro AP, Pavarina AC, Dovigo LN, Brunetti IL, Bagnato VS, Vergani CE, et al. Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and L929 fibroblasts. Lasers Med Sci. 2013; 28 (2): 391-8.
121. Ribeiro BCL, Boaventura JMC, Gaião U, Saad JRC, Candido MSM. Efeito de fontes de luz na microdureza de resinas compostas. RGO. 2011; 59 (2): 229-36.
122. Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, et al. Plaque biofilms: The effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. Arch Oral Biol. 2006; 51 (11): 1006—14.
123. Rolim JPML, de-Melo MAS, Guedes SF, Albuquerque-Filho FB, de Souza JR, Nogueira NAP, et al. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. J Photochem Photobiol B. 2012; 106: 40-6.
124. Roncalli AG. Projeto SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de Saúde Bucal revela importante redução da cárie dentária no país. Cad Saúde Pública. 2011; 27 (1): 4-5.
125. Rosentritt M, Hahnel S, Groger G, Muhlfridel B, Burgers R, Handel G. Adhesion of *Streptococcus mutans* to various dental materials in a laminar flow chamber system. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008; 86 (1): 36–44.

126. Santezi C, Tonetto MR, Presoto CD, Jassé FF, de Oliveira OB Junior, de Andrade MF, et al. Anterior restorations in bleached teeth: difficulty establishing the color after bleaching. *J Contemp Dent Pract*. 2012; 13 (5): 735-9.
127. Santezi C. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiag Photodyn Ther*. 2016; 15: 46 – 52.
128. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, Borsatt MC and Corona SAM. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. *ScientificWorld Journal*. 2014; 2014 (824538): 1 - 9.
129. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000; 45 (5): 355-61
130. Spectrum TPH (Dentsply) [Internet] DENTSPLY. [acesso em 2016 out 1]. Disponível em: <http://www.dentsply.com.br/bulas/diretory/T/tph-spectrum.pdf>
131. Senadheera D, Cvitkovitch DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 631:178-88.
132. Severino D, Junqueira HC, Gabrielli DS, Gugliotti M, Baptista MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochem Photobiol*. 2003; 77 (5): 459-68.
133. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005; 41 (13): 1955-68.
134. Shehzad A, Khan S, Shehzad O, Lee YS. Curcumin therapeutic promises and bioavailability in colorectal cancer. *Drugs Today (Barc)*. 2010; 46 (7): 523-32.
135. Shen LH, Ji F, Zhang HY. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. *Chem Physics Letters*. 2005; 409 (4-6): 300-3.
136. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod*. 2012; 38 (9): 1275–8.
137. Sideridou I, Tserki V, Papanatasiou G. Study of water absorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2003; 24 (4): 655-65.

138. Silva Costa SX, Becker AB, de Souza Rastelli AN, de Castro Monteiro Loffredo L, de Andrade MF, Bagnato VS. Effect of four bleaching regimens on color changes and microhardness of dental nanofilled composite. *Int J Dent*. 2009; 2009 (313845): 1-7.
139. Silva MF, Davies RM, Stewart B, DeVizio W, Tonholo J, da Silva Júnior JG, et al. Effect of whitening gels on the surface roughness of restorative materials in situ. *Dent Mater*. 2006; 22 (10): 919-24.
140. Soderholm KJ, Zigan M, Ragan M, Fischlschweiger W, Bergman M. Hydrolytic degradation of dental composites. *J Dent Res*. 1984; 63 (10): 1248–54.
141. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011; 55 (1): 143-66.
142. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamics effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996; 18 (3): 253-9.
143. Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplateque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 (11): 965–74.
144. Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A. A simple approach to examine early oral microbial biofilm formation and the effects of treatments. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19 (5): 297-302.
145. Summers AN, Larson DL, Edmiston CE, Gosain AK, Denny AD, Radke L. Efficacy of preoperative decontamination of the oral cavity. *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106 (4): 895-900.
146. Tardivo JP, Giglio AD, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basics mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005; 2 (3):175-91.
147. Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LKA, Saxena D, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. *Caries Res*. 2012; 46 (6): 549–54.
148. Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education: In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches. Ed 2010. Badajoz: Formatex; 2010.

149. Van Houte J. Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res.* 1994; 73 (3): 672-81.
150. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res.* 2010; 44 (4): 349–57.
151. Villalta P, Lu H, Okte Z, Garcia-Godoy F, Powers JM. Effects of staining and bleaching on color change of dental composite resins. *J Prosthet Dent.* 2006; 95 (2):137-42.
152. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52 (9): 1040-61.
153. von Ohle C, Gieseke A, Nistico L, Decker EM, DeBeer D, Stoodley P. Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in ex vivo dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76 (7): 2326-34.
154. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42 (1): 13-28.
155. Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J, et al. Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res.* 2005; 84 (5):451-5.
156. Wattanapayungkul P, Yap AU, Chooi KW, Lee MFLA, Selamat RS, Zhou RD. The effect of home bleaching agents on the surface roughness of tooth-colored restoratives with time. *Oper Dent.* 2004; 29 (4): 398–403.
157. Wei GX, Campagns AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57 (6): 1100–9.
158. Wiegand A, Vollmer D, Foitzik M, Attin R, Attin T. Efficacy of different whitening modalities on bovine enamel and dentin. *Clin Oral Investig.* 2005; 9 (2): 91–7.
159. Wilson M, Mia N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low power laser light. *J Oral Pathol Med* 1993; 22 (8): 354–7.

160. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3 (5): 412-8.
161. Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, et al. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 1999; 50 (1): 1-7.
162. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Ant Chemother.* 2006; 57 (4): 680-4.
163. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000; 79 (1): 21-7.
164. Wu D, Holmes BN, Mitra SB, Kolb BU, Thompson WL, Johnson N. Wear resistance and mechanical properties of novel dental nanocomposites. *J Dent Res.* 2002; 81(Special Issue A): A-37.
165. Yamamoto M, Nagano T, Okura I, Arakane K, Urano Y, Matsumoto K. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, cincoproporphirin III, with low host toxicity. *Biometals.* 2003; 16 (4): 591-7.
166. Yamamoto T, Tamura Y and Yokota T. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988; 32 (6): 932-5.
167. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011; 53 (3): 273-82.
168. Zanin FR, Garcia LFR, Casemiro LA, Pires-de-Souza FCP. Effect of artificial accelerated aging on color stability and surface roughness of indirect composites. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2008; 16 (1):10-4.
169. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Den Res.* 2001; 80 (5): 1436-40.

ANEXOS

ANEXO A

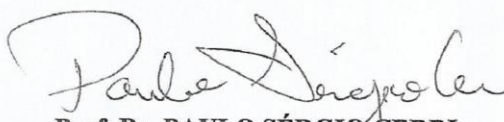


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado ***"AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES NA ESTABILIDADE DE COR, MICRODUREZA E RUGOSIDADE DE MATERIAIS RESTAURADORES RESINOSOS E SUPERFÍCIE DENTAL APÓS PDI MEDIADA POR CURCUMINA"***, protocolo nº 13/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Livia Nordi Dovigo** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 14/08/2015.

Vigência do Projeto	Julho/2016
Espécie/linhagem	Gado Nelore
Nº de animais	210 dentes
Peso/Idade	500 Kg – 5 anos
Sexo	
Origem	Mondelli Indústria de Alimentos S/A.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

ANEXO B

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia da Inativação Fotodinâmica mediada pela Curcumina sobre biofilme dental.

Pesquisador: Livia Nordi Dovigo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 20420213.9.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 491.717

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "Eficácia da Inativação Fotodinâmica mediada pela Curcumina sobre biofilme dental" constitui um projeto de pesquisa original cujos resultados poderão indicar uma nova opção de tratamento para controle do biofilme

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a eficácia da inativação fotodinâmica (PDI) mediada pela curcumina para eliminação do biofilme dental

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

s riscos estão relacionados aos procedimentos referentes a etapa de exame clínico e moldagem dos pacientes, fato este controlado por meio da utilização de EPIs e instrumental autoclavado. Os benefícios futuros da pesquisa relacionam-se a um melhor controle da microflora da cavidade bucal por meio de uma terapia que não promova efeitos colaterais como os apresentados pela clorexidina (manchamento de língua, dentes e restaurações, resistência microbiana e alteração no paladar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é de interesse para a comunidade científica com resultados que poderão contribuir para a elaboração de uma nova opção de tratamento para controle do biofilme dental. Mediante as

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 491.717

solicitações, o pesquisador responsável:

- 1) incluiu os pesquisadores colaboradores descritos no projeto de pesquisa no item "equipe de pesquisa" da Plataforma Brasil;
- 2) adequou o item "Riscos e Benefícios";
- 3) informou a procedência dos dentes bovinos dos quais serão obtidos os fragmentos de esmalte para a indução de formação do biofilme (Frigorífico Vangélio Mondelli LTDA, bovinos da raça Nelore, com cerca de 5 anos de idade e 250kg de peso limpo, tratados dentro de rígidos padrões de qualidade e rastreamento sob fiscalização do Ministério da Agricultura - SIF No1758);
- 4) Incluiu a descrição para a coleta da saliva informando que haverá descarte do material ao término da pesquisa;
- 5) Adequou o TCLE

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória são apresentados

Recomendações:

Apesar do TCLE apresnetar termos técnicos, o mesmo está adequado ao conhecimento dos participantes (estudantes de pós-graduação e professores da FOAr UNESP)

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado à execução

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto APROVADO em sessão de 10 de Dezembro de 2013.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 491.717

ARARAQUARA, 12 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Anexo 1

Título da Pesquisa

Eficácia da Inativação Fotodinâmica mediada pela Curcumina sobre biofilme dental.

Pesquisador Responsável

Livia Nordi Dovigo

Eu, _____,
Nacionalidade: _____, Estado Civil: _____, Profissão: _____,
R.G nº: _____, CIC/CPF nº: _____,

Endereço: _____,

Telefone: (____) _____, declaro que entendi claramente os objetivos e a importância desta pesquisa que me foram explicados e esclarecidos abaixo. Estou ciente de como será a minha participação na pesquisa, dos possíveis desconfortos que estarei exposto, de que não terei remuneração pela participação na mesma e que poderei desistir da minha contribuição voluntária em qualquer momento.

Objetivo da Pesquisa

Avaliar a eficácia da Terapia Fotodinâmica para inativação de micro-organismos presentes em biofilmes dentários formados in situ na superfície de esmalte bovino.

Justificativa

Considerando a existência de relação direta entre placa bacteriana e desenvolvimento de cárie dentária, a justificativa para este estudo é verificar o efeito da Terapia Fotodinâmica na diminuição quantitativa do número de micro-organismos presentes nos biofilmes dentais, na intenção de minimizar um dos fatores responsáveis pelo aparecimento das lesões de cárie.

Procedimentos

Cada um dos participantes voluntários selecionados cederá saliva não estimulada, que será coletada em tubos falcon estéreis de 50 mL no período da manhã, 2 horas após a higienização oral posterior ao desjejum por um tempo de 10 minutos, sendo que a saliva coletada nos primeiros 5 minutos será descartada, armazenando-se somente a produzida nos últimos 5 minutos da coleta. O conteúdo salivar de cada participante da pesquisa será devidamente lacrado e armazenado em geladeira até o momento de seu uso. Posteriormente, os participantes voluntários serão moldados para a confecção do dispositivo intrabucal palatino, o qual conterá discos de esmalte bovino, preparados a partir da superfície de dentes bovinos (obtidos junto ao Frigorífico Vangélio Mondelli LTDA, bovinos da raça Nelore, com cerca de 5 anos de idade e 250kg de peso limpo, tratados dentro de rígidos padrões de qualidade e rastreamento sob fiscalização do Ministério da Agricultura - SIF No1758.). Após a obtenção dos dentes, estes foram esterilizados e os blocos de esmalte confeccionados e fixados nos dispositivos intrabucais, os quais serão utilizados pelo participante por 48 horas na finalidade de formação de biofilme dentário sobre os discos de esmalte bovino. Cada participante receberá instruções escritas sobre a forma de utilização do dispositivo (períodos de uso e descanso) e sua adequada higienização. Após as 48 horas de utilização, o participante voluntário da pesquisa retornará à Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP/FOAr para devolver o dispositivo e encerrar sua participação na pesquisa.

Desconfortos e Riscos

Os possíveis riscos e desconfortos sofridos pelo participante da pesquisa se relacionam com a etapa do exame clínico, moldagem e com a utilização do dispositivo palatino. Durante a execução dos procedimentos clínicos, os participantes da pesquisa utilizarão campo estéril sobre a região do tórax e óculos de proteção de forma a evitar contato de instrumentais e do material de moldagem com a pele e região ocular. Adicionalmente, o possível desconforto promovido pelo ato da moldagem, como a náusea, será minimizado pelo posicionamento do encosto da cadeira odontológica em 90° e, no momento da

moldagem, o pesquisador tracionará a cabeça do participante para frente, de maneira que o material de moldagem escoe no sentido pósterio-anterior. Além disso, o pesquisador orientará o participante a inspirar o ar pela boca e expirar pelo nariz. Adicionalmente, existem riscos associados aos pesquisadores que se relacionam com as etapas clínicas e laboratoriais. Durante os procedimentos clínicos, os pesquisadores utilizarão equipamentos de proteção individual (EPIs: jaleco, gorro, máscara, luvas descartáveis e óculos de proteção) na intenção de evitar contaminação direta e cruzada. Finalizada a moldagem, os moldes passarão por desinfecção com solução antimicrobiana em spray de hipoclorito a 1%, e, posteriormente, uma gaze umedecida com a solução será mantida sobre o molde por 10 min para se prosseguir com a etapa laboratorial de confecção dos dispositivos. Durante a fase laboratorial, tanto no momento da confecção dos dispositivos, quanto na etapa microbiológica, os pesquisadores tomarão o cuidado de utilizarem os EPIs já descritos acima, a fim de evitar qualquer tipo de auto-contaminação. Todos os materiais manipulados no laboratório de microbiologia serão autoclavados previamente ao seu descarte, conforme normas do laboratório onde se realizará a pesquisa. De acordo com a literatura disponível, os participantes da pesquisa poderão apresentar discreta halitose durante o período experimental, o que poderá ser evitado com a utilização dos procedimentos adequados para higienização da cavidade bucal e do dispositivo. Outra possível ocorrência é o desconforto causado pela utilização de um dispositivo estranho no interior da cavidade bucal, sendo semelhante ao de um aparelho ortodôntico móvel. Por esse motivo, durante todo o período da pesquisa, o participante terá assistência imediata e integral, além de acompanhamentos para verificar as condições do aparelho e da sua saúde bucal. Não existem relatos na literatura acerca da utilização dessa metodologia acarretar em aumento na incidência de cárie nos participantes. Isso provavelmente se deve ao fato de que a solução de sacarose será aplicada de forma localizada sobre os blocos de esmalte com o dispositivo fora da cavidade bucal, não havendo contato direto da solução com os dentes ou mucosa do participante.

Forma de acompanhamento e assistência

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos participantes para ajuste do aparelho intrabucal, caso necessário, a fim de minimizar qualquer desconforto.

Garantia de esclarecimento

O participante tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa ainda que isso possa afetar a vontade do participante em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema, o participante poderá entrar em contato com os pesquisadores (Livia, Carolina) pelos telefones:

Tel: 16 – 3301-6552 (Sala Profa. Livia)

16 – 98114 3400 (Celular Carolina)

Se desejar, o participante também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara pelo telefone 16 – 3301-6432.

Formas de ressarcimento

Os voluntários não serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte e alimentação para a coleta das amostras contidas nos dispositivos.

Formas de indenização

Todos os danos previsíveis decorrentes desta pesquisa serão evitados; no entanto os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação, previsto ou não no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.

Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a privacidade do participante quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa

A decisão de fazer parte desta pesquisa é voluntária. O participante poderá escolher se quer ou não participar, assim como poderá desistir de participar a qualquer momento.

Esta pesquisa é de responsabilidade da **Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo – UNESP**. Como benefício, os participantes da pesquisa terão um auxílio indireto, já que ao participar dessa pesquisa contribuirão para o aumento no conhecimento de técnicas antimicrobianas e terão oportunidade de reforçar o conhecimento sobre autocuidado já que receberão um reforço sobre técnicas adequadas de higienização bucal.

Obrigado,

SUA ASSINATURA INDICA QUE VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DA PESQUISA COMO VOLUNTÁRIO E QUE LEU E ENTENDEU TODAS AS INFORMAÇÕES ACIMA EXPLICADAS.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Parecer número: 491.717

Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo
Pesquisador Responsável

Data: ____/____/____

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS ESCREVA PARA O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOAr-UNESP.

Endereço: Rua Humaitá, 1680 / Bairro: Centro
CEP: 14801-903 - Araraquara, SP / PABX: (16) 3301-6300

ANEXO AO TERMO DE CONSENTIMENTO – Anexo 2

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

No dia da coleta salivar e posterior moldagem para confecção do dispositivo intrabucal, o participante voluntário deverá seguir a seguinte rotina:

1 - Após tomar café da manhã e fazer sua higienização bucal habitual, deverá permanecer em jejum por 2 horas antes da coleta salivar, sendo somente permitido a ingestão de água. Antes do início do experimento, cada voluntário receberá um dentífrico, um frasco conta-gotas contendo a solução de sacarose a 20%, estojo para armazenar o dispositivo intrabucal palatino, escova dental e o dispositivo intrabucal. As instruções fornecidas a cada voluntário serão as seguintes:

INSTRUÇÕES GERAIS

- UTILIZAR APENAS O DENTÍFRICO E A ESCOVA DADOS PELO PESQUISADOR.
- NÃO UTILIZAR COLUTÓRIOS, FIO DENTAL COM FLÚOR, CLOREXIDINA.
- NÃO UTILIZAR ALIMENTOS QUE POSSAM SER FONTE DE FLÚOR COMO POR EXEMPLO CHÁ PRETO E CHÁ VERDE.

- **DURANTE A HIGIENE ORAL:**
 - O DISPOSITIVO DEVERÁ SER REMOVIDO,
 - LAVADO COM ESCOVA SEM DENTÍFRICO E RETOMADO PARA A BOCA IMEDIATAMENTE APÓS A ESCOVAÇÃO
 - VOCÊ PODE ESCOVAR TODO O APARELHO EXCETO A TELA PLÁSTICA QUE COBRE OS BLOCOS DE ESMALTE.
- **CUIDADO AO ESCOVAR:**
 - NÃO DEIXE QUE JATOS DE ÁGUA DA TORNEIRA ATINJAM DIRETAMENTE A TELA PLÁSTICA QUE COBRE OS BLOCOS DENTAIS. ISSO PODE CAUSAR PERDA DA PLACA DENTAL AÍ ACUMULADA.
 - BEBER ÁGUA DE ABASTECIMENTO DE ARARAQUARA.
- **DORMIR COM O APARELHO:**
 - O APARELHO SOMENTE PODERÁ SER REMOVIDO PARA FAZER REFEIÇÕES. TOMAR MEDICAMENTOS LÍQUIDOS E PARA REALIZAR A HIGIENIZAÇÃO BUCAL E DO DISPOSITIVO.
 - É PROIBIDO MASCAR CHICLETE E CHUPAR BALAS DURANTE O USO.
 - QUANDO REMOVÊ-LO, ARMAZENÁ-LO NO PORTA-APARELHO COM GAZE ÚMIDA, RECOBRINDO TODO DISPOSITIVO PARA NÃO RESSECAR O BIOFILME;
 - UTILIZAR 1 GOTA DA SOLUÇÃO DETERMINADA SOBRE CADA BLOCO DE ESMALTE 3 VEZES AO DIA NOS SEGUINTE HORÁRIOS: **08:00; 12:00; 21:00**
 - APÓS GOTEJAR, AGUARDAR 5 MINUTOS ANTES DE COLOCAR O APARELHO NOVAMENTE NA BOCA.

Autorizo a reprodução deste trabalho somente após 05/08/2018.

Direitos de publicação reservados ao autor.

Araraquara, 05 de outubro de 2016.

CAROLINA SANTEZI NETO