RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 05/08/2018.

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: Profª.Drª. Lívia Nordi Dovigo
Co–Orientadora:Profª.Drª. 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: Profª. Drª. Lívia Nordi Dovigo

2ºExaminador: Profº. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

3ºExaminador: Profª. Drª. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

4ºExaminador: Profª. Drª. Carla Raquel Fontana Mendonça

5ºExaminador: Profº. 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 Cirus)

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, Profª. Drª. *Lívia Nordi Dovigo*.

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 Profª. Drª. *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 Profª. Drª. Lívia 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 Profª Drª. *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. Lívia 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 Profª. Drª. 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 *Lorenna 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, Hélida 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 Gonçalez 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/cm^2; 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 µM veiculada em hidrogel ácido oleico associada à dose de 18J/cm^2 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/cm^2; blue LED), C+L- (with CUR and no light) and C+L+ (with both CUR and light; PDI). Data were analyzed descriptvely 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 microrganisms (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 18J/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	*Streptococcus mutans*
16.	Ca	*Candida albicans*
17.	Lc	*Lactobacillus casei*
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.	$\overline{x}$	Média
38.	dp	Desvio Padrão
39.	$IC_{95\%}$	Intervalo de Confiança
40.	*p*	Valor de probabilidade
41.	η^2_p	*Effect Size*

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 conduzidas [128], 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 publicados [14]. 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 biofimes [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, consequentemente, a análise de dados em uma abordagem multinível, pode permitir a incorporação da variabilidade do efeito antimicrobiano entre os diferentes sujeitos que fornecerão as amostras [71].

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 corantes [64]. 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 (λ= 430±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.

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, Brecx 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, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, 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 ICGB, 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, Ruggerio 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, Stewert 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, Tegos 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, Pazinatto RB, Cesar IC, Rego MA, Mathias P, et al. Enamel susceptibility to coffee and red wine staining at different intervals elapsed from bleaching: a photoreflectance 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, Yurdaguven 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, Muhlfriedel 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. Antiplaque 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, cincoproporfirin 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.