



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Priscila Borges Gobbo de Melo**

**Uso de ultrassom associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana na remoção  
de lesão cáriosa artificial em dentina**

**Araraquara**

**2020**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Priscila Borges Gobbo de Melo**

**Uso de ultrassom associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana na remoção  
de lesão cáriosa artificial em dentina**

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

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli.

**Araraquara**

**2020**

Melo, Priscila Borges Gobbo de

Uso de ultrassom associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana na remoção de lesão cáriosa artificial em dentina / Priscila Borges Gobbo de Melo. -- Araraquara: [s.n.], 2020 92 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –  
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia  
Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

1. Terapia por ultrassom 2. Fotoquimioterapia 3. Cárie dentária 4. Streptococcus mutans I. Título

**Priscila Borges Gobbo de Melo**

**Uso de ultrassom associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana na remoção  
de lesão cariosa artificial em dentina**

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Dentística Restauradora**

**Presidente e orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli

**2º Examinador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Abi Rached Dantas

**3º Examinador:** Prof. Dr. Adilson Cesar de Abreu Bernardi

Araraquara, 04 de agosto de 2020.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Priscila Borges Gobbo de Melo**

**NASCIMENTO:** 23 de abril de 1992 – Sacramento – Minas Gerais

**FILIAÇÃO:** Vania Silveira Borges Gobbo e Melo  
Jairo Gobbo de Melo

**2014 a 2017** Curso de graduação pela Universidade de Araraquara (UNIARA)

**2015 a 2017** Iniciação científica pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**2018 a 2020** Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração em Dentística Restauradora, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

### *Dedico este trabalho:*

Primeiramente a **Deus** por me dar o dom da vida, me abençoar com uma família incrível e colocar pessoas que deixam a caminhada da vida mais leve. Por me guiar, abençoar e me capacitar para que seja possível vencer cada novo desafio, permitindo transformar sonhos em realidade.

À minha mãe, **Vanía**, que além de me gerar durante 9 meses em seu ventre, me proporcionou a melhor educação. Foi minha mestra e me ensinou a enfrentar as dificuldades com a cabeça erguida e nunca desistir. É a pessoa que mais acredita em mim e me permite ir em busca dos meus sonhos. Obrigada mãe, pelo carinho, pela presença e pelo amor incondicional. Sem a senhora, essa vitória não seria possível.

A senhora, mãe, dedico essa vitória!

Ao meu irmão, **Thiago**, que me apoia sempre em todas as conquistas. Que está presente em todos os momentos da minha vida me incentivando sempre ser uma pessoa melhor. Obrigada Thi, pela sua compreensão e seus ensinamentos, você além de irmão, é um grande amigo!

Ao meu noivo, **Bruno**, que está ao meu lado em todos os momentos. Que me incentiva sempre a buscar os meus sonhos, me transmitindo confiança e segurança. Obrigada pelo amor, carinho e compreensão.

E por fim, ao meu pai, **Jairo** (*in memoriam*), que mesmo não presente de corpo, sei que está muito feliz com a minha conquista. É também para você que quero ser alguém melhor, sempre.

**“Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”**  
(Isaac Newton)

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me permitir realizar os meus sonhos. Por me guiar e iluminar durante toda a caminhada, me ensinando a cada dia ser uma pessoa melhor. Por me dar forças para nunca desistir e sabedoria para ir em busca dos meus objetivos. Obrigada por estar presente em minha vida nunca desistindo de mim.

À minha mãe, **Vania**, por ser meu alicerce, minha vida. Agradeço o seu carinho diário, sua companhia, seus ensinamentos e principalmente sua paciência. Com a senhora eu aprendo a cada dia. Obrigada por ser essa mãe maravilhosa que está sempre ao meu lado, me proporcionando tudo de melhor que a senhora pode nos oferecer. Obrigada por sempre estar presente e acreditar em mim. Se eu for metade do que a senhora é, eu já estou feliz. Obrigada por tudo. Amo muito a senhora!

Ao meu irmão, **Thiago**, por me ensinar a sempre buscar os meus objetivos. Por sempre tentar fazer o melhor para nós e por estar sempre presente, mesmo à distância. Obrigada por ser irmão e amigo. Obrigada por tudo. Eu te amo, Thi!

Ao meu noivo, **Bruno**, pelo carinho e amor sempre. Pela compreensão durante todos os anos, sempre me incentivando a buscar meus sonhos. Obrigada por me entender nos momentos ausentes, sendo escrevendo ou fazendo experimentos. Obrigada por entender a distância vivenciada por nós, mas que só nos fortaleceu. Obrigada por não sair do meu lado em nenhum momento e sempre acreditar em mim. Obrigada por tudo. Eu te amo, amor!

Ao meu padrasto, **Ginaldo**, que chegou na minha vida e ocupou um espaço super especial. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e sempre me incentivar a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por ter entrado em nossas vidas.

Às minhas cunhadas, **Jéssica** e **Joyce**, por estarem sempre presente na minha vida e acreditarem na minha capacidade. Obrigada pelo carinho e amizade.

À minha família, em especial a minha avó, **Edimar**, meus padrinhos, **Ailton** e **Luciana** e minha tia, **Sandra**, por estarem sempre presentes na minha vida de uma forma especial. Por acreditarem em mim e me incentivarem a ser sempre uma pessoa melhor.

À minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli**, que está em minha vida há 5 anos sempre me ensinando. Agradeço a confiança depositada em mim, por todas as oportunidades concedidas e principalmente por sempre acreditar que sou capaz. Com a senhora eu aprendi muito e levarei sempre por onde

eu for. Obrigada por todas as suas sugestões, críticas e principalmente paciência por me ensinar que sempre é possível alcançar meus objetivos. Obrigada de coração.

Ao querido **Prof. Dr. Adilson Cesar de Abreu Bernardi**, que na ausência da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra, realizou um trabalho maravilhoso como coorientador sempre acreditando na minha competência e me incentivando a questionar resultados, bem como entendê-los. Agradeço pela sua presença quase que diária no laboratório. Obrigada Professor!

Aos meus amigos da pós-graduação, pelo convívio diário e por deixar os dias mais leves, **Júlia Custódio, Júlia Pazos e Jéssica Katarine**. Em especial queria agradecer ao **João Felipe**, pelo seu companheirismo, ensinamento e paciência. O João foi uma pessoa muito importante na minha evolução, me guiando e ensinando como melhorar cada dia mais. Agradeço pela confiança. Obrigada.

À minha amiga **Joissi**, a qual conheci em um curso de verão e que passou ao longo da Pós-Graduação momentos que fortaleceram ainda mais a nossa amizade. Agradeço seu carinho, sua confiança e principalmente sua amizade. Obrigada pela paciência e por sempre estar ao meu lado. Te desejo todo o sucesso do mundo amiga!

À minha amiga **Thaís Pirágine**, que nunca duvidou da minha capacidade e sempre me incentiva a buscar meus objetivos e nunca desistir. Está sempre ao meu lado. Tata, você é uma pessoa incrível e eu sou uma pessoa de sorte por encontrar uma pessoa como você. Obrigada.

À minha amiga **Laiana**, que foi minha dupla na Universidade de Araraquara (UNIARA) e que sempre acreditou na minha competência. Obrigada pelo carinho, conselhos e principalmente pela amizade.

Às minhas amigas de Uberaba, que são pessoas que considero da minha família e mesmo distantes, se fazem sempre presentes. Obrigada por participarem de cada etapa da minha vida e sempre me apoiarem.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, nas pessoas de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini** e Vice-Reitor **Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)** na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e de sua vice-diretora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**, pelo carinho para com todos os alunos durante a caminhada.

Ao **Departamento** e aos **docentes** do **Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Ao **Programa de Pós-graduação de Ciências Odontológicas** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua coordenadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Lourenção Brighenti** e de sua vice-coordenadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli**.

Ao **Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira** e a discente **Maria Carolina Donatoni** do LQBO – Laboratório de Química Bio-Orgânica, Universidade Federal de São Carlos pelo fornecimento da curcumina sintetizada utilizada neste estudo.

À **Dra. Paula Aboud Barbugli** (técnica) do Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) pela atenção, disponibilidade e ajuda durante as análises.

À **Creusa**, funcionária do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pelo convívio amigável e pela disponibilidade e simpatia.

Aos funcionários da **Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Cristiano Afonso Lamounier** e **José Alexandre Garcia** pela disponibilidade e pelo carinho com que sempre me ajudou.

À **CAPES** – O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 (Processo nº: 88882.432525/2019).

Ao **Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica – CEPOF**, do Instituto de Física de São Carlos - IFSC, Universidade de São Paulo – USP (financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo Número: 07276-1/2013) pelo auxílio financeiro e ao Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT, Instituto de Física de São Carlos - IFSC, Universidade de São Paulo – USP ), pelo desenvolvimento e suporte técnico do dispositivo de remoção de cárie por ultrassom.

Por fim, agradeço a todos que, embora não tenham sido citados, mas participaram desta etapa da minha vida contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão!**

*“ O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. “*

José de Alencar

Melo PBG. Uso de ultrassom associado à terapia fotodinâmica antimicrobiana na remoção de lesão cáriosa artificial em dentina [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## RESUMO

Visando uma abordagem mais conservadora durante a remoção da cárie dentária, torna-se importante a avaliação de novos dispositivos que minimizem o desgaste da estrutura dentinária e terapias complementares que promovam a descontaminação da dentina remanescente. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficiência do uso do ultrassom descariador após a remoção da camada de dentina infectada e a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) mediada por curcumina na descontaminação da camada de dentina afetada. Previamente aos experimentos, foi determinado o melhor solvente para solubilizar a curcumina, o tempo pré-irradiação mais adequado e a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) da curcumina. Após, foram obtidos espécimes de dentina bovina (n=187), medindo 4x4x2 mm e realizou-se análise de microdureza Knoop superficial para padronização dos espécimes (29,4 ±3 KHN). Foram induzidas lesões artificiais de cárie na dentina com cepa de *Streptococcus mutans* (modelo biológico) de acordo com o protocolo estabelecido após análise por luz polarizada. A camada de dentina infectada foi removida por 1 min, com as técnicas: fresa esférica em baixa rotação, escavador de dentina (cureta) e ultrassom descariador. Para avaliação da taxa de remoção (n=10), os espécimes foram pesados em 3 momentos: T1 (previamente à indução), T2 (após indução) e T3 (após a remoção). Em seguida, realizou-se análise de microdureza Knoop longitudinal (n=10). Para análise quantitativa de células viáveis (UFC/mL), os espécimes (n=9) foram irradiados uniformemente com sistema de iluminação a LED (Biotable, MMOptics) em comprimento de onda de 460 nm com dose/densidade de energia de 15 J/cm<sup>2</sup> após a remoção da dentina cariada. Adicionalmente, avaliou-se a viabilidade celular por meio da microscopia confocal (n=2). Aplicou-se teste de Shapiro-Wilk (para normalidade) e ANOVA a 1 e a 2 fatores com nível de significância de 5%. A CIM e a CBM da curcumina foi de 67,5 µM incorporada ao solvente Dimetilsulfóxido (DMSO). O tempo pré-irradiação foi de 5 min. De acordo com a análise de luz polarizada, o protocolo utilizado para a indução da lesão cáriosa foi de 7 dias. De acordo com a taxa de remoção, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos T1 e T2 (baseline). Já em relação aos tempos T2 e T3, houve diferença estatística significativa (p≤0,029). Grupos tratados com ultrassom,

promoveram menor taxa de remoção. Na microdureza longitudinal, considerando as técnicas de remoção, nas mesmas profundidades, quase em todos os grupos observou-se diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Considerando as diferentes profundidades em um mesmo grupo, houve diferença significativa em todas as profundidades ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos tratados com TFDA após a remoção da camada de dentina infectada, demonstraram diferença estatística significativa quando comparado aos grupos não tratados ( $p \leq 0,01$ ). De acordo com os resultados de UFC/mL e viabilidade do biofilme de *Streptococcus mutans* observou-se redução após aplicação da TFDA. De forma geral, pôde-se concluir que o ultrassom descariador é eficiente para a remoção da camada de dentina infectada e a TFDA pode ser utilizada como terapia complementar com a finalidade de reduzir as bactérias presentes na camada de dentina afetada.

**Palavras – chave:** Terapia por ultrassom. Fotoquimioterapia. Cárie dentária. *Streptococcus mutans*.

Melo PBG. The use of ultrasound associated with antimicrobial photodynamic therapy on caries-like dentin removal [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

## ABSTRACT

Aiming for a more conservative approach during caries lesion removal, it is important to study new devices that minimize wear of the dentin structure and complementary therapies that promote the decontamination of the remaining dentin. Thus, the aim of this study was to evaluate in vitro the efficiency of the infected dentin layer removal with low power ultrasound device and after removal, the effect of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the affected dentin layer. Prior to the experiments, the best solvent for solubilizing curcumin, the most appropriate pre-irradiation time and the minimal inhibitory and bactericidal concentration MIC and MBC of curcumin were determined. Afterwards, bovine dentin specimens (n=187) were obtained, measuring 4x4x2 mm and superficial Knoop microhardness analysis was performed to standardize the specimens ( $29.4 \pm 3$  KHN). Artificial caries lesions were induced in the dentin with *Streptococcus mutans* strain (biological model) according to the protocol established after polarized light analysis. The carious dentin was removed for 1 min using the following methods: low-speed rotation spherical bur, dentin excavator and ultrasound device. To evaluate the removal rate (n=10), the specimens were weighed in 3 times: T1 (previously induction), T2 (after induction) and T3 (after removal). Afterwards, a longitudinal microhardness analysis was performed (n=10). For quantitative analysis of viable cells (CFU/mL), the specimens (n=9) were uniformly irradiated with an LED lighting system (Biotable, MMO) at a wavelength of 440 nm with a dose/energy density of  $15 \text{ J/cm}^2$  after removal of affected dentin. Cell viability was assessed using confocal microscopy (n=2). Shapiro-Wilk test (for normality) and ANOVA with 1 and 2 factors were applied with a 5% significance level. The MIC and MBC of curcumin were  $67.5 \text{ }\mu\text{M}$  incorporated into the Dimethylsulfoxide (DMSO) solvent and the pre-irradiation time was 5 min. According to the polarized light analysis, the protocol used to induce the carious lesion was 7 days. According to the removal rate, there was no statistical difference between T1 and T2 (baseline). Regarding the T2 and T3 time, there was a statistically significant difference ( $p \leq 0.029$ ). Groups treated with ultrasound, showed a lower removal rate. In the longitudinal microhardness, considering the removal methods, at the same depths, in almost all

groups there was a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ). Considering different depths in the same group, there was a significant difference in all depths ( $p \leq 0.05$ ). The groups treated with aPDI after removing the infected dentin layer, there was a statistically significant difference when compared to the groups that were not treated with aPDI ( $p \leq 0.01$ ) according to the results of the CFU/mL analysis and the viability of *Streptococcus mutans* was reduced after the application of the aPDI. In general, it can be concluded that the ultrasound device is efficient for the conservative removal of infected dentin layer and aPDI can be used as complementary therapy in order to reduce the bacteria present in the dentin layer it affected.

**Keywords:** Ultrasonic therapy. Photochemotherapy. Dental caries. *Streptococcus mutans*.

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                 | <b>17</b> |
| <b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                                                 | <b>20</b> |
| 2.1 Geral .....                                                                                           | 20        |
| 2.2 Específicos .....                                                                                     | 20        |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                                      | <b>21</b> |
| 3.1 <i>Streptococcus mutans</i> e a Cárie Dentária.....                                                   | 21        |
| 3.2 Modelos de Indução da Cárie Dentária.....                                                             | 22        |
| 3.3 Técnicas de Remoção da Cárie Dentária .....                                                           | 24        |
| 3.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA).....                                                       | 25        |
| 3.5 Fotossensibilizador.....                                                                              | 28        |
| 3.6 Curcumina.....                                                                                        | 29        |
| 3.7 Fontes de Luz .....                                                                                   | 31        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                        | <b>32</b> |
| 4.1 Delineamento Experimental .....                                                                       | 32        |
| 4.2 Fluxograma .....                                                                                      | 32        |
| 4.3 Fotossensibilizador e Fonte de Luz Utilizados para a TFDA .....                                       | 33        |
| 4.4 Método de Preparação de Micelas Poliméricas .....                                                     | 34        |
| 4.5 Preparo da Suspensão Bacteriana Padronizada .....                                                     | 35        |
| 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) ..... | 36        |
| 4.7 Obtenção e Preparo dos Espécimes de Dentina Bovina .....                                              | 39        |
| 4.8 Análise de Microdureza Knoop Superficial .....                                                        | 41        |
| 4.9 Indução da Lesão Cariosa em Dentina por Modelo Biológico .....                                        | 41        |
| 4.10 Microscopia de Luz Polarizada .....                                                                  | 43        |
| 4.11 Técnicas para Remoção do Tecido Cariado .....                                                        | 44        |
| 4.11.1 Técnica manual.....                                                                                | 44        |
| 4.11.2 Técnica convencional .....                                                                         | 44        |
| 4.11.3 Uso de ultrassom descariador .....                                                                 | 45        |
| 4.12 Avaliação da Capacidade de Remoção das 3 Diferentes Técnicas .....                                   | 45        |
| 4.13 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) .....                                                     | 47        |
| 4.14 Microdureza Longitudinal.....                                                                        | 47        |
| 4.15 Avaliação Quantitativa de Células Bacterianas Viáveis.....                                           | 49        |
| 4.16 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC).....                                                  | 50        |
| 4.17 Análise Estatística.....                                                                             | 51        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                                                                  | <b>52</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                                                  | <b>66</b> |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b> | <b>76</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>77</b> |
| <b>ANEXO A .....</b>     | <b>92</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença de etiologia multifatorial<sup>1</sup> e um dos principais fatores que colaboram com o seu desenvolvimento é a formação de produtos finais produzidos por microrganismos bucais acidogênicos durante o metabolismo de carboidratos<sup>3</sup>. Dessa forma, a remoção mecânica do biofilme é fundamental<sup>4</sup> para diminuir a presença desses microrganismos acidogênicos, os quais estão diretamente ligados à progressão da doença cárie<sup>5-7</sup>. Quando ocorre um desequilíbrio no meio bucal, o biofilme cariogênico se altera e o ambiente seleciona os grupos microbianos mais resistentes ao ataque ácido. Alguns grupos são mais predominante devido sua capacidade de sobreviver em ambiente ácido, como o *Streptococcus mutans*, que possui grande importância no início e progressão da lesão de cárie<sup>2,9-11</sup>

Por se tratar de um processo altamente dinâmico, o desequilíbrio entre a desmineralização e a remineralização pode auxiliar no desenvolvimento e progressão da doença<sup>9,12-15</sup>. Com a presença de carboidratos fermentáveis na cavidade bucal, a estrutura dental é desmineralizada, no entanto, pode ser reparada à medida que os ácidos produzidos pelas bactérias são neutralizados, remineralizando a estrutura do dente<sup>14-16</sup>. Quando não ocorre essa remineralização, ocorre a dissolução dos tecidos duros dentais devido à perda líquida de minerais, sendo possível observar a formação de uma lesão cariiosa<sup>1,13,17</sup>. Assim, os processos dinâmicos que ocorrem no biofilme, promovem a desmineralização do esmalte, que se não tratada, evolui para a dentina<sup>12</sup>

Quando a lesão de cárie não é tratada em seu estágio inicial atingindo um estágio avançado da doença cárie, torna-se importante restaurar a integridade do elemento dental, de modo que o paciente tenha sua função restabelecida. Dessa forma, com a cavitação do esmalte, a dentina é desmineralizada devido ao acúmulo de biofilme no interior da cavidade<sup>12</sup>. Ocorre também, a redução do conteúdo mineral, aumento da porosidade devido à variação na estrutura do colágeno dentinário e alteração de proteínas não colagenosas<sup>18</sup>

A dentina cariada é composta por duas camadas<sup>19,20</sup>. A primeira camada, (conhecida também como camada externa ou dentina infectada), formada por uma zona necrótica superficial e amolecida, rica em bactérias e incapaz de remineralização e a segunda camada (conhecida também como camada interna ou dentina afetada), formada por uma dentina mais firme, capaz de remineralizar-se<sup>19,21</sup>. Para evitar a atividade cariogênica e fornecer uma base bem mineralizada de dentina para

confeção da restauração, antigamente o operador realizava a remoção completa dentina cariada (infectada e afetada)<sup>22</sup>. No entanto, a remoção completa da lesão cariosa pode resultar em exposição pulpar<sup>20,23</sup>, o que demanda cuidado especial do profissional durante o tratamento dessas lesões<sup>22</sup>.

Visando abordagens conservadoras e preconizando a Odontologia minimamente invasiva, a remoção da lesão cariosa deve ser realizada parcialmente<sup>22,24</sup>. Neste método remove-se a camada de dentina infectada (toda a camada externa) e preserva-se a camada interna (composta pela dentina afetada), a qual é passível de remineralizar-se<sup>22,25</sup>.

Várias alternativas para a remoção da lesão cariosa e limpeza da cavidade são utilizadas, sendo alguns deles: escavação com instrumento manual, fresas esféricas e laser de alta intensidade<sup>26</sup>. O método de escavação manual possui a melhor relação entre a eficácia de remoção da lesão cariosa e eficiência<sup>26</sup>. Visando desenvolver e investigar novas tecnologias que possibilitem a remoção da lesão de cárie em dentina de forma conservadora, foi desenvolvido um dispositivo ultrassônico, denominado de ultrassom descariador. Esse equipamento possui a capacidade de realizar remoção conservadora da dentina cariada, capaz de remover somente a camada de dentina infectada, preservando a camada de dentina afetada. Dentre suas vantagens estão a realização de corte preciso e seletivo<sup>27,28</sup>, diminuindo ainda mais as chances de exposição pulpar.

Após a remoção, prossegue-se com os passos do procedimento restaurador<sup>22</sup>. Isso é possível, porque as bactérias cariogênicas são isoladas de sua fonte de nutrição pela restauração e conseqüentemente acabam morrendo ou permanecem adormecidas pela falta de nutrientes, não representando risco à polpa<sup>22</sup>. No entanto, para diminuir a possibilidade de cáries secundárias futuras, é importante reduzir a quantidade de bactérias presente na camada de dentina afetada. Dessa forma, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA), pode ser um método complementar promissor para promover a descontaminação dentinária previamente à futura restauração<sup>29</sup>, reduzindo a quantidade de bactérias presentes no local. Em estudos que utilizaram substrato de dentina em diferentes modelos *in vitro* de indução da lesão cariosa e modelos *in vivo*, os resultados utilizando a terapia fotodinâmica antimicrobiana, foram favoráveis<sup>18,30-32</sup>.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) consiste na associação de um fotossensibilizador e uma fonte de luz, na presença de oxigênio<sup>10,33</sup>. O

fotossensibilizador se liga à célula-alvo e é ativado pela luz em comprimento de onda específico. Após, o fotossensibilizador pode perder energia por meio de emissão de fluorescência ou calor, retornando ao seu estado original ou convertido a um estado tripleto excitatório<sup>34</sup> ou gerar espécies reativas de oxigênio por meio de duas reações<sup>34</sup>, sendo elas: reação tipo I ou reação tipo II. Na reação tipo I há produção de radicais livres por meio da transferência de elétrons do fotossensibilizador no estado tripleto para um substrato dentro das células<sup>35</sup>. Esses radicais livres interagem com o oxigênio, causando morte celular. Já na reação tipo II, a transferência de energia ocorre entre o fotossensibilizador excitado e o oxigênio molecular no estado fundamental, produzindo oxigênio singleto que pode interagir com um grande número de moléculas na célula para gerar produtos oxidados<sup>20,35,36</sup>. Com isso, é possível a realização de múltiplas aplicações de forma segura e não invasiva, não representando risco de toxicidade<sup>37</sup>.

Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados atualmente na Odontologia, a curcumina, principal constituinte do açafrão em pó, tem sido utilizada há séculos pela medicina como pigmento alimentar e tempero<sup>38</sup>. A curcumina é um composto isolado da *Curcuma longa* L. e possui propriedades farmacológicas, como ação anti-inflamatória, anticancerígena e anti-infecciosa<sup>(37-39)</sup>. Além disso, possui baixo custo, fácil manuseio e amplo espectro de absorção, que variam de 300 - 500nm<sup>37</sup>. Apesar de existirem várias fontes de luz, que podem ser utilizadas na TFDA, a luz azul emitida por diodo emissor de luz (LED) emite o comprimento de onda específico para a curcumina exercer seus efeitos fototóxicos<sup>40-42</sup>.

Os LEDs (*light emitting diodes*), são aparelhos que apresentam uma fonte de luz de alta potência, fornecendo uma luz confiável e promovendo uma iluminação ampla e homogênea da superfície<sup>43</sup>. Além disso, possuem fácil utilização e vida longa<sup>44</sup>.

Dessa forma, com o avanço da Odontologia minimamente invasiva, é importante realizar estudos que visem o desenvolvimento de novos equipamentos que removam a cárie dentária de forma conservadora, bem como terapias adjuvantes que auxiliem na descontaminação da dentina afetada

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficiência do uso do ultrassom descariador por meio da taxa de remoção e da microdureza longitudinal após a remoção da camada de dentina infectada e ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) mediada por curcumina na descontaminação da camada de dentina afetada.

As hipóteses nulas testadas foram:

1. O ultrassom descariador não é eficiente quando comparado às outras técnicas de remoção;
2. A TFDA mediada por curcumina não promove descontaminação da camada de dentina afetada.

### 2.2 Específicos

- Determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da curcumina incorporada ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO) ou às micelas de Pluronic® F-127 nas concentrações de 270; 135; 67.5; 33.75; 16.875; 8.4375; 4.2187; 2.1093; 1.0546 e 0.5273  $\mu$ M.

- Determinar o melhor tempo pré-irradiação durante a CIM e CBM, sendo: 5, 10, 15 ou 20 minutos.

- Determinar o tempo ideal para a indução da lesão de cárie, sendo: 7, 10 ou 14 dias por meio da avaliação da profundidade da lesão cariosa utilizando-se microscopia de luz polarizada.

- Avaliar a eficiência do aparelho ultrassom descariador na remoção de lesão de dentina infectada quando comparado à técnica manual com escavador de dentina e fresa esférica em baixa rotação por meio do cálculo da taxa de remoção de dentina infectada.

- Avaliar a microdureza longitudinal após a remoção da dentina infectada, por meio do teste de microdureza Knoop (KHN).

- Avaliar a influência do uso do aparelho ultrassom descariador e a ação antibacteriana da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) por meio da avaliação quantitativa de células viáveis (UFC/mL) e viabilidade celular por meio de microscopia confocal de varredura a laser (MC).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Streptococcus mutans* e a Cárie Dentária

O biofilme formado na superfície dentária desempenha papel importante no desenvolvimento da cárie dentária<sup>45,46</sup>. A adesão de microrganismos à superfície acontece por meio da película adquirida formada a partir de glicoproteínas salivares. Com isso, a produção de polissacarídeos extracelulares por esses microrganismos auxilia a sua adesão na superfície do dente, formando um biofilme cariogênico<sup>47-50</sup>. Por meio da fermentação de carboidratos da dieta do hospedeiro (sacarose como principal carboidrato), esses microrganismos produzem grande quantidade de ácido láctico, resultando na desmineralização da superfície do dente<sup>45,46</sup>.

Dentre os vários microrganismos presentes no biofilme oral, o *Streptococcus mutans* ganhou grande evidência na comunidade científica quando estudos clínicos e laboratoriais em animais o descreveram como importante agente etiológico na cárie dentária<sup>51</sup>. O *Streptococcus mutans* é uma bactéria Gram-positiva que atua diretamente na fermentação de carboidratos da dieta<sup>45</sup>.

Além disso, o *Streptococcus mutans* é um microrganismo acidogênico e acidúrico, capaz de utilizar carboidratos para produzir ácidos e ainda se desenvolver em pH baixo<sup>45,48</sup>. Quando comparado a outros microrganismos do biofilme cariogênico, o *S. mutans* possui algumas diferenças: maior virulência e maior capacidade de se acumular em grande quantidade na presença de sacarose da dieta, permitindo sua adesão à superfície do dente ou em colônias presente no biofilme<sup>48,51-53</sup>. Tais características evidenciam o *S. mutans* como o principal agente etiológico responsável pela cárie dentária<sup>54,55</sup>.

A cárie dentária pode ser definida como uma doença multifatorial, dinâmica e mediada pelo biofilme cariogênico<sup>56-58</sup>. O processo de desenvolvimento e progressão da doença resulta no desequilíbrio do biofilme e na produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos da dieta, resultando na desmineralização da superfície dentária<sup>59,60</sup>. A longo prazo, a doença cárie pode provocar consequências não apenas biológicas e dentárias, mas também impactos negativos na qualidade de vida e saúde geral do indivíduo. Embora redução significativa na prevalência da cárie em muitas partes do mundo <sup>59</sup>, exceto nos países escandinavos<sup>61</sup> venha sendo observado, a doença cárie ainda continua sendo um grande problema de saúde pública, afetando mais de 2,4 bilhões de pessoas de todas as faixas etárias ao redor do mundo<sup>59,62</sup>.

Quando há progressão da cárie dentária, é possível observar o desenvolvimento de alterações visíveis na estrutura dentária, ou lesões de cárie incipientes, que inicialmente não provocam nenhum desconforto, mas que se não tratada, podem progredir para a cavitação<sup>60,63,64</sup>. Novas estratégias, o aprimoramento das técnicas convencionais e o desenvolvimento de novos equipamentos para o tratamento de lesão cariosa são importantes não só para diminuir a prevalência de cárie, como também, para promover a saúde bucal<sup>65</sup>. Por isso, a Odontologia minimamente invasiva visa a prevenção, remineralização e quando necessário, a intervenção mínima durante os procedimentos restauradores, preservando o máximo possível de estrutura saudável<sup>60,66</sup>.

No momento em que ocorre a cavitação, o biofilme presente no local, altamente ácido e ideal para bactérias cariogênicas, auxilia na progressão rápida da lesão, atingindo a superfície dentinária<sup>67</sup>. Com isso, a remoção do biofilme presente no local se torna ainda mais difícil<sup>67</sup>. Histologicamente e clinicamente, a cárie dentinária apresenta duas camadas distintas: dentina infectada e dentina afetada<sup>68</sup>. A dentina infectada, conhecida também como zona infectada, é uma dentina altamente desmineralizada, com colágeno desnaturado e fortemente infectado por bactérias. Já a dentina afetada, conhecida também como zona afetada por cárie, é formada por dentina desmineralizada, mas com o colágeno intacto e minimamente infectado, sendo passível de remineralização<sup>19,67,68</sup>.

Tradicionalmente, a completa remoção da cárie era realizada (infectada e afetada) durante o preparo cavitário para a futura restauração. Entretanto, a Odontologia contemporânea visa a preparação da cavidade de maneira minimamente invasiva, removendo somente a dentina infectada<sup>68-71</sup>. Esse tipo de tratamento tem sido cada vez mais utilizado, afim de evitar exposição pulpar<sup>72,73</sup>. A remoção por completo do tecido cariado pode promover exposição da polpa, devido à profundidade da cavidade e pode promover também a redução na espessura da dentina remanescente (espessura entre o fundo da cavidade e a polpa dentária)<sup>68,74</sup>. Por isso, abordagens mais conservadoras estão sendo cada vez mais adotadas e estudadas<sup>68</sup>.

### **3.2 Modelos de Indução da Cárie Dentária**

Existem diferentes modelos de indução de cárie dentária que buscam reproduzir lesões de cárie naturais. Esses modelos podem ser *in situ* ou *in vitro*.

O modelo *in situ* pode ser utilizado como uma associação entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, pois utiliza dispositivos intra-orais que facilitam a coleta das amostras em períodos de tempo determinados, promovendo ambiente natural que contempla as trocas minerais, a cariogenicidade dos alimentos e a presença dos fatores de virulência microbiano e de enzimas presentes na saliva<sup>75,76</sup>. No entanto, esse modelo possui algumas limitações, como: características do biofilme (padronização dos microrganismos), perfil de desmineralização, tempo, colaboração do paciente e custo<sup>75</sup>.

A lesão de cárie produzida por modelos de indução *in vitro* tentam reproduzir a lesão *in vivo* de forma fiel objetivando a finalidade clínica e mecânica<sup>77,78</sup>. Além disso, permitem a realização de investigações em ambientes controlados, com menor variabilidade. Existem diferentes tipos de modelos *in vitro*, com diferentes padrões de desenvolvimento. Alguns desses modelos utilizam métodos químicos, sendo eles estático (soluções ou géis ácidos) ou dinâmico (ciclagem de pH) e também, métodos que utilizam microrganismos, como por exemplo o modelo microbiológico<sup>76</sup>.

O modelo químico estático, utiliza géis ou soluções ácidas e promove a indução da lesão cariosa por meio de episódios desmineralizantes e remineralizantes. Além disso, é altamente dependente do conteúdo de flúor presente nos fluidos orais e nos tecidos duros<sup>79,80</sup>. Já o modelo dinâmico, utiliza ciclagem de pH, reproduzindo o ciclo des/remineralização que ocorre no ambiente bucal, além de conseguir promover de maneira simples a inibição e saturação com mudanças constantes<sup>79-81</sup>, reproduzindo o tecido cariado<sup>76</sup>. Entretanto, os métodos químicos não conseguem simular de forma eficaz os fatores envolvidos no processo de desenvolvimento da lesão cariosa, simulando apenas os aspectos físico-químicos da dissolução do tecido duro<sup>76,82</sup>.

Embora os modelos de cárie artificial apresentem limitações, o modelo microbiológico é mais representativo quando comparado ao químico, uma vez que a cárie dentária é uma doença multifatorial e durante o desenvolvimento da lesão, há presença dos microrganismos, bem como, degradação do biofilme e do colágeno<sup>76,83,84</sup>. O modelo microbiológico utiliza microrganismos produtores de ácido para a indução da lesão cariosa e tem o *Streptococcus mutans* como um dos principais microrganismos no desenvolvimento da cárie primária e secundária<sup>82</sup>. Além disso, esse método reproduz o acúmulo de biofilme nos tecidos duros e sua exposição aos desafios cariogênicos, simulando o processo de cárie dentária<sup>85</sup>.

Apesar do modelo microbiológico apresentar melhor reprodutibilidade no desenvolvimento da cárie dentária, há uma falta de padronização quando se trata do tempo de indução<sup>86</sup>. No entanto, muitos autores utilizam o tempo de 7 dias para a indução da lesão cariosa, e evidenciam que o tempo é suficiente para formação de lesões artificiais utilizando o modelo microbiológico com *Streptococcus mutans* como microrganismo<sup>86-89</sup>.

### 3.3 Técnicas de Remoção da Cárie Dentária

As técnicas utilizadas na remoção da lesão cariosa foram desenvolvidas desde GV Black, em 1893 e tiveram inicialmente o princípio de “extensão para prevenção” durante o tratamento de lesões cariosas<sup>90,91</sup>. A proposta era que a remoção ocorresse de forma anatômica, evitando a progressão do biofilme local e consequentemente, minimizaria o início e a progressão da lesão cariosa. Princípio este, baseado no aspecto clínico da cárie dentária e limitado pelo conhecimento acerca da doença e dos materiais restauradores disponíveis na época<sup>90,91</sup>.

No entanto, ao longo dos anos, novos materiais restauradores adesivos foram desenvolvidos, novas metodologias e com isso novos equipamentos que visam remover a lesão cariosa de forma conservadora. Com isso, questionamentos em relação à quantidade de tecido a ser escavado para tratar com sucesso a lesão cariosa vem sendo levantados<sup>91,92</sup>.

Existem diversas técnicas para remoção da cárie dentária<sup>93,94</sup>. Algumas removem esse tecido seletivamente e outras não conseguem fazer essa distinção ou nem mesmo conseguem realizar de forma eficaz. Alguns fatores são importantes durante a remoção da lesão cariosa: conforto e facilidade, capacidade de remover apenas a dentina infectada, geração de ruído, indolor e acessível<sup>91</sup>.

Geralmente, a dentina cariada é removida mecanicamente com escavadores e/ou fresas em baixa rotação<sup>26,95,96</sup>. A fresa esférica em baixa rotação remove facilmente a lesão cariosa e promove a abertura dos túbulos dentinários mais profundos após a remoção. Com isso, associado à água proveniente dos túbulos dentinários, esse processo pode resultar em dor. Apesar de utilizar técnicas que minimizem esses fatores, ele ainda não é erradicado e pode prejudicar o operador durante a remoção<sup>91</sup>.

Algumas outras técnicas surgiram ao longo dos anos com o intuito de minimizar os fatores causados pelas principais e mais antigas técnicas de remoção. Algumas dessas técnicas são: abrasão a ar, métodos químicos, laser, sono-abrasão e instrumentação ultrassônica<sup>91,97,98</sup>.

As técnicas utilizando abrasão a ar, laser e os métodos químicos, permitiam remoção menos invasiva e menos destrutiva, que visava conservar a estrutura dental<sup>99</sup>. Além disso, essas técnicas promoviam mínima alteração térmica, menor vibração, menos dor e tinha como objetivo remover somente a dentina infectada<sup>96,99</sup>.

Dispositivos sônicos e ultrassônicos são bastante utilizados em diversas áreas da Odontologia, como na endodontia<sup>100</sup> e na periodontia<sup>101</sup>. Esses dispositivos pertencem ao grupo conhecido como “micro-traumático” para a remoção da cárie dentária<sup>102</sup>, por serem conservador<sup>103</sup>. Além disso, a oscilação fornecida pela energia ultrassônica dos dispositivos ultrassônicos pode resultar na preparação minimamente invasiva da cavidade<sup>102,104,105</sup>, sendo importante para a remoção precisa e controlada da cárie<sup>106–108</sup>.

Os dispositivos sônicos e ultrassônicos possuem também, pontas que permitem que a técnica de remoção de cárie seja conservadora, pois durante a preparação da cavidade, estes dispositivos realizam um preparo minimamente invasivo<sup>102,106,109,110</sup>.

Em geral, as pontas de diamante são acopladas em dispositivos ultrassônicos projetados para várias indicações. No entanto, não existe até o presente momento dispositivo específico para remoção de dentina cariada que seja capaz de fornecer parâmetros específicos para uma remoção seletiva.

### **3.4 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)**

A luz é utilizada para tratamento de doenças desde a antiguidade. Entretanto, somente mais recentemente ela começou a ser utilizadas em práticas médicas. Há mais de um século que o conceito de morte celular induzida pela interação de luz e produtos químicos é conhecido. A primeira vez que foi relatado esse efeito, foi por meio de um estudante de medicina, Oscar Raab. Por meio de estudo realizado com protozoários causadores da malária, ele descobriu que a combinação de um corante alaranjado (acridina) com a luz promovia efeito letal. Nem a luz e nem o corante de forma isolada promoviam qualquer efeito sobre os protozoários, mas, associados

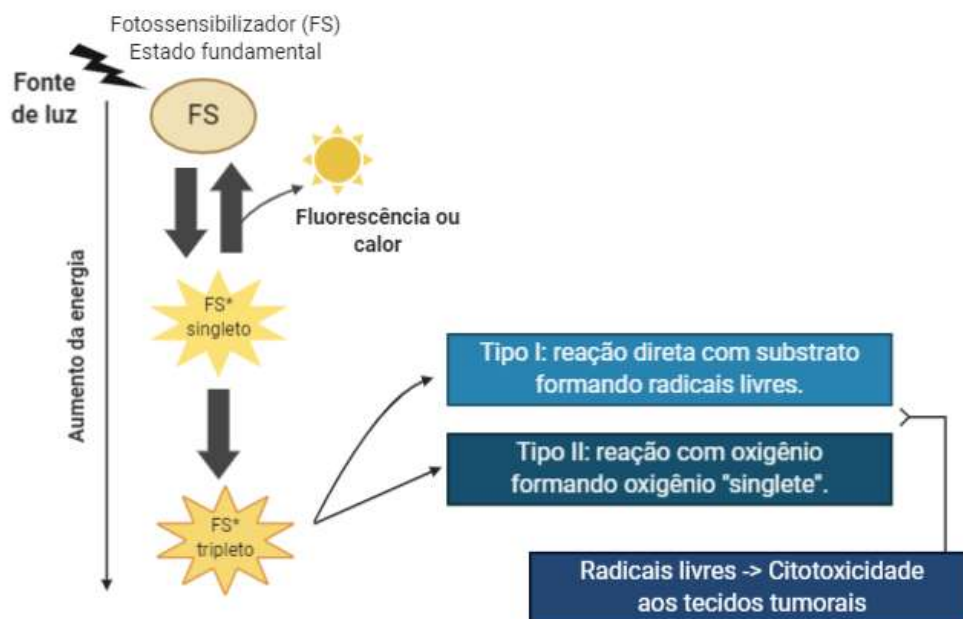
promoveram efeitos altamente tóxicos<sup>111,112</sup>. Após essa descoberta, em 1903, Tappeiner, Jesionek<sup>111</sup> realizaram aplicação tópica de eosina associada à luz para tratar tumores cutâneos e em 1907, Jodlbauer, Tappeiner<sup>113</sup> descreveram como “ação fotodinâmica”, a necessidade de se utilizar oxigênio nas reações de fotossensibilização<sup>111,113</sup>.

Estudos *in vivo* só foram realizados na década de 60, após a realização de experimentos realizados em ratos terem apresentado resultados promissores. O tratamento foi realizado por Lipson & Schwartz em uma mulher portadora de câncer de mama, dando início ao tratamento conhecido como terapia fotodinâmica para o tratamento clínico do câncer. A partir de então, vários estudos foram desenvolvidos na área<sup>31,33,113–116</sup>.

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) é derivada do termo em inglês *antimicrobial photodynamic therapy* (aPDT) e consiste na interação entre três componentes: fotossensibilizador (composto fotossensível), luz em comprimento de onda adequado <sup>117</sup> e presença de oxigênio<sup>33,118–123</sup>. A interação desses três componentes resulta em reações foto-físico-químicas formando espécies reativas de oxigênio (EROs) com alto poder de oxidação dos componentes celulares, resultando em apoptose ou necrose celular<sup>33</sup>.

Dessa forma, dois tipos de mecanismos de ação para terapia fotodinâmica antimicrobiana pode levar à morte ou à apoptose celular. Essas reações podem ser do tipo I ou do tipo II (Diagrama de Jablonski modificado, Figura 1)<sup>124</sup>. Na reação tipo I, o fotossensibilizador absorve fótons emitidos pela luz que promovem a sua excitação, saindo do seu estado fundamental para o estado singleto excitado. Quando o fotossensibilizador sofre essa transformação inicial, ele pode retornar ao seu estado fundamental liberando energia de excitação (fluorescência ou calor) ou passar para um estado de excitação menos instável, chamado de estado tripleto. Pelo estado tripleto a reação pode interagir com qualquer biomolécula presente no meio, causando morte da célula<sup>35,125</sup>.

**Figura 1** – Interação do fotossensibilizador com a fonte de luz e possíveis caminhos – diagrama de Jablonski modificado.



**Fonte:** Elaboração própria. Adaptada de Longo et al.<sup>125</sup>.

Já na reação tipo II, a energia do fotossensibilizador no estado tripleto excitado é transferida para o estado tripleto fundamental do oxigênio, gerando oxigênio singleto, com alta toxicidade<sup>35,126</sup>. O oxigênio singleto gerado pode interagir com várias moléculas no interior da célula, causando morte celular<sup>126,127</sup>. A reação do tipo II possui efeito tóxico do oxigênio singleto, causando uma reação rápida e indiscriminada com todos os tipos de biomoléculas<sup>128</sup>. Por não apresentar mecanismo de defesa contra essas moléculas, a célula morre<sup>129</sup>. As reações tipo I e II podem ocorrer ao mesmo tempo, independentemente de terem caminhos diferentes. O equilíbrio entre as duas reações é influenciado diretamente pelos substratos intracelulares, pelas características dos fotossensibilizadores utilizados e pela concentração de oxigênio presente no ambiente celular.

A aplicação da TFDA na Odontologia tem sido um método bastante utilizado para tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, câncer de boca, diagnóstico de transformações nas lesões orais malignas, desinfecção da cavidade bucal e para tratamento de cárie dentária<sup>10,130,131</sup>. Além disso, pode ser considerada uma técnica de princípio simples, com características atrativas para o uso, já que apresenta algumas vantagens importantes, como: amplo espectro de ação (fotossensibilizador

atua em diversos microrganismos), efeito antibactericida, pouco efeito colateral e não apresenta resistência ao tratamento<sup>10</sup>.

Algumas terapias antimicrobianas geralmente não são tão eficazes para o tratamento da cárie<sup>111,132</sup>. Isso acontece porque os microrganismos se organizam na forma de biofilme e são mais resistentes a este tipo de tratamento<sup>132</sup>. Por isso, a terapia fotodinâmica antimicrobiana surgiu como uma nova abordagem para promover efeito antimicrobiano em microrganismos presentes no biofilme cariogênico, consequentemente proporcionando controle da cárie dentária<sup>37,133,134</sup>. Atualmente, novos estudos também avaliam seu efeito em dentina afetada, atuando como tratamento complementar para a redução de bactérias presente no local<sup>135,136</sup>.

### 3.5 Fotossensibilizador

Com a descoberta da reação fotodinâmica, “agentes fotossensíveis” apropriados foram desenvolvidos para serem utilizados como fotossensibilizadores<sup>34</sup>. Ao longo do tempo, muitas abordagens foram realizadas para melhorar as propriedades fotodinâmicas do fotossensibilizador, entre elas: modificação da estrutura química ou desenvolvimento de novas classes de fotossensibilizadores<sup>137</sup>.

Os fotossensibilizadores utilizados na TFDA podem ser classificados em: derivados fenotiazínicos (azul de metileno e azul de toluidina), porfirinas, clorinas e ftalocianinas, xantenos (eosina Y, eritrosina e rosa bengala), fulerenos, fenalenonas, riboflavina (vitamina B2) e curcumina (corante amarelo, derivado da *Curcuma longa*)<sup>34</sup>. É importante, que o fotossensibilizador selecionado, produza espécies tóxicas de oxigênio, capazes de destruir células bacterianas na presença de oxigênio<sup>138</sup>. Dessa forma, para que a TFDA seja bem sucedida é importante que o fotossensibilizador apresente características ideais, como: não ser tóxico quando no escuro, alta absorção no comprimento de luz utilizado, estado tripleto de energia apropriado, alto rendimento quântico e vida útil no estado tripleto e alta estabilidade<sup>139,140</sup>.

Concentrações excessivas de fotossensibilizadores podem formar agregados, alterando o pico de absorção da luz, consequentemente reduzindo sua absorção e diminuindo a atividade fotodinâmica promovida pela terapia. Por isso, alguns parâmetros são importantes para que ocorra a interação com o fotossensibilizador, sendo eles: solubilidade em água e lipídios, ionização constante, características de absorção da luz e a eficácia do oxigênio em seu estado excitado e singleto<sup>37,133,141,142</sup>.

A estrutura de um fotossensibilizador é muito diferente para tratamentos de diferentes tipos de câncer e antimicrobianos. Os fotossensibilizadores para tratamento de câncer são lipofílicos, com pouca ou nenhuma carga. Já os antimicrobianos, devem ter cargas catiônicas. Outra diferença é que para o câncer, o fotossensibilizador deve apresentar boa penetração tecidual, com bandas de absorção longas (infravermelho), enquanto que para os antimicrobianos, essa propriedade não é tão importante<sup>142</sup>.

### 3.6 Curcumina

A curcumina é um pigmento amarelo extraído da cúrcuma (*Curcuma longa* L.)<sup>143,144</sup>. É uma planta baixa, que cresce até 100 cm de altura, possui haste curta, perene, folhas curvas e ovadas com flores brancas/coloridas e rizomas cilíndricos<sup>143,145</sup> (Figura 2). Geralmente é cultivada em todo o subcontinente indiano e em climas tropicais. Por isso, a Índia é maior produtora do mundial de açafrão<sup>143-145</sup>.

Atualmente, a curcumina é utilizada em vários segmentos. Pela indústria alimentícia, como tempero, corante, aromatizante, conservante e corante e pela indústria cosmética, presente em óleos essenciais<sup>146,147</sup>. Na área médica, a curcumina tem sido utilizada há séculos para tratamento de reumatismos, doenças cutâneas, feridas, inflamação e acima de tudo, vários tipos de câncer<sup>143,144,148</sup>. Além disso, a curcumina possui inúmeras atividades farmacológicas, como propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias<sup>149-154</sup>.

**Figura 2** – Rizoma e curcumina em pó (A); Planta *Curcuma longa* L.(B)



**Fonte:** Google imagens, Imagem adaptada 2020.

A cúrcuma é composta por três curcuminóides: curcumina (77%), demetoxicurcumina (DMC; 17%) e bide metoxicurcumina (BDMC; 3%), além de óleos voláteis, açúcares e proteínas<sup>150,155</sup>. Os curcuminóides são a essência das raízes do açafrão que são pulverizados por secagem. Além da curcumina, os outros curcuminóides também apresentam propriedades biológicas<sup>156</sup>.

A estrutura química da curcumina é 1,7-bis- (4-hidroxi-3-metoxifenil) -hepta-1,6-dieno-3,5-diona ou difiloilmetano, enquanto sua fórmula química é  $C_{21}H_{20}O_6$ <sup>157</sup>. Além disso, a curcumina possui duas unidades aromáticas, conectadas por um ligante de polieno, podendo existir uma espécie aniônica ou eletricamente neutra. Os radicais hidroxilas (enol) são fracamente ácido e o ceto-enol é dependente de solvente<sup>158,159</sup>.

A curcumina é um corante insolúvel em água, mas altamente solúvel em solvente orgânicos polares, como etanol, ácido acético e dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>159</sup>. Por isso, a curcumina é diluída em solventes que melhoram a sua biodisponibilidade, como por exemplo, o dimetilsulfóxido (DMSO). Atualmente, a nanotecnologia também tem ganhado espaço na área médica, devido ao surgimento de nanomateriais que auxiliam no avanço dessa área<sup>160</sup>. As nanopartículas poliméricas tem se destacado para realizar a incorporação de fármacos ou drogas, devido sua característica de encapsulamento e possuir uma variedade de agentes terapêuticos<sup>161</sup>. As micelas poliméricas possuem nanopartículas que atuam como nanocarregadores e têm a função de incorporar fármacos hidrofóbicos, melhorando a solubilidade dos mesmos<sup>162,163</sup>. As micelas possuem essa função, pois têm características anfifílicas (hidrofóbicas e hidrofílicas)<sup>164</sup>.

No entanto, o DMSO é o solvente mais utilizado. Além disso, é selecionado como um solvente orgânico biologicamente aceitável, porque possui aplicações terapêuticas e é usado como um transportador para drogas hidrofóbicas<sup>165</sup>. O DMSO promove efeito solubilizante em compostos menos solúveis, aumentando a penetração simplesmente por fornecer uma concentração mais alta que a barreira da membrana bacteriana<sup>165</sup>.

De acordo com suas propriedades fotofísicas, a curcumina apresenta pico de absorção que varia de 300 a 500 nm que se sobrepõe à região de emissão da luz azul<sup>37,42,166</sup>. Esses valores podem variar do solvente utilizado<sup>159</sup>.

### 3.7 Fontes de Luz

A TFDA utiliza três diferentes grupos de luz, sendo eles: lâmpadas convencionais (amplo espectro), lasers e diodos emissores de luz. A ação de cada aparelho vai depender do espectro de emissão, da irradiância, da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho<sup>43,167</sup>.

As lâmpadas convencionais foram as primeiras fontes de luz utilizadas na TFDA. O problema de utilizar esse tipo de lâmpada é que muitas vezes havia sobreaquecimento do local e dificuldade em calcular a dose de luz administrada. Essas lâmpadas eram muito utilizadas devido sua facilidade de uso e baixo custo<sup>111</sup>. Além disso, a emissão das lâmpadas convencionais abrange quase todo o espectro da luz visível e o início do infra-vermelho. As lâmpadas halógenas metálicas são geralmente utilizadas por apresentarem alta irradiância, mantendo a exposição da luz constante<sup>44,168,169</sup>.

No entanto, as fontes de luz mais convenientes e mais utilizadas são os lasers. Produzem luz monocromática (feixe de luz homogêneo) com comprimento de onda específico, facilidade de calcular a dosimetria da luz e a transmissão da luz é através de uma fibra óptica. Além disso, o laser a ser utilizado pode ser escolhido de acordo com o fotossensibilizador utilizado e a profundidade de penetração da luz desejada. Porém, possui alto custo, não são portáteis e demandam assistência técnica maior<sup>111</sup>.

Os LEDs (do inglês "*light emitting diodes*") são aparelhos compostos por semicondutores sólidos ligados entre si que geram luz. Apresentam fonte de luz de alta potência, com pequena faixa de variação (faixa estreita das bandas de luz entre 20 - 50 nm), promovendo emissão de luz adequada e promovendo iluminação ampla e homogênea da superfície<sup>43</sup>. Além disso, possuem fácil utilização e vida útil longa. É importante a checagem da irradiância e da uniformidade promovida pela irradiação, isso porque, o tempo de exposição à fonte de luz pode ser muito longo se a irradiância for muito baixa. A irradiância utilizada na TFDA varia de 50 a 150 mW/cm<sup>2</sup>. Durante a irradiação da célula, ocorre um processo conhecido como fotodegradação (do inglês "*photobleaching*"), ou seja, à medida que a TFDA vai destruindo a célula, paralelamente, ocorre a degradação do fotossensibilizador pela luz<sup>43,167,170</sup>.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

Trata-se de um estudo experimental, do tipo laboratorial (*in vitro*) randomizado.

As variáveis dependentes do estudo são: microscopia de luz polarizada, análise da taxa de remoção ( $\Delta P$ ), análise da microdureza longitudinal por meio do teste de microdureza Knoop, avaliação quantitativa de células viáveis (UFC/mL) e viabilidade celular por meio da análise em microscopia confocal (MC).

Já as variáveis independentes são: técnicas de remoção e descontaminação da dentina por meio da terapia fotodinâmica antimicrobiana.

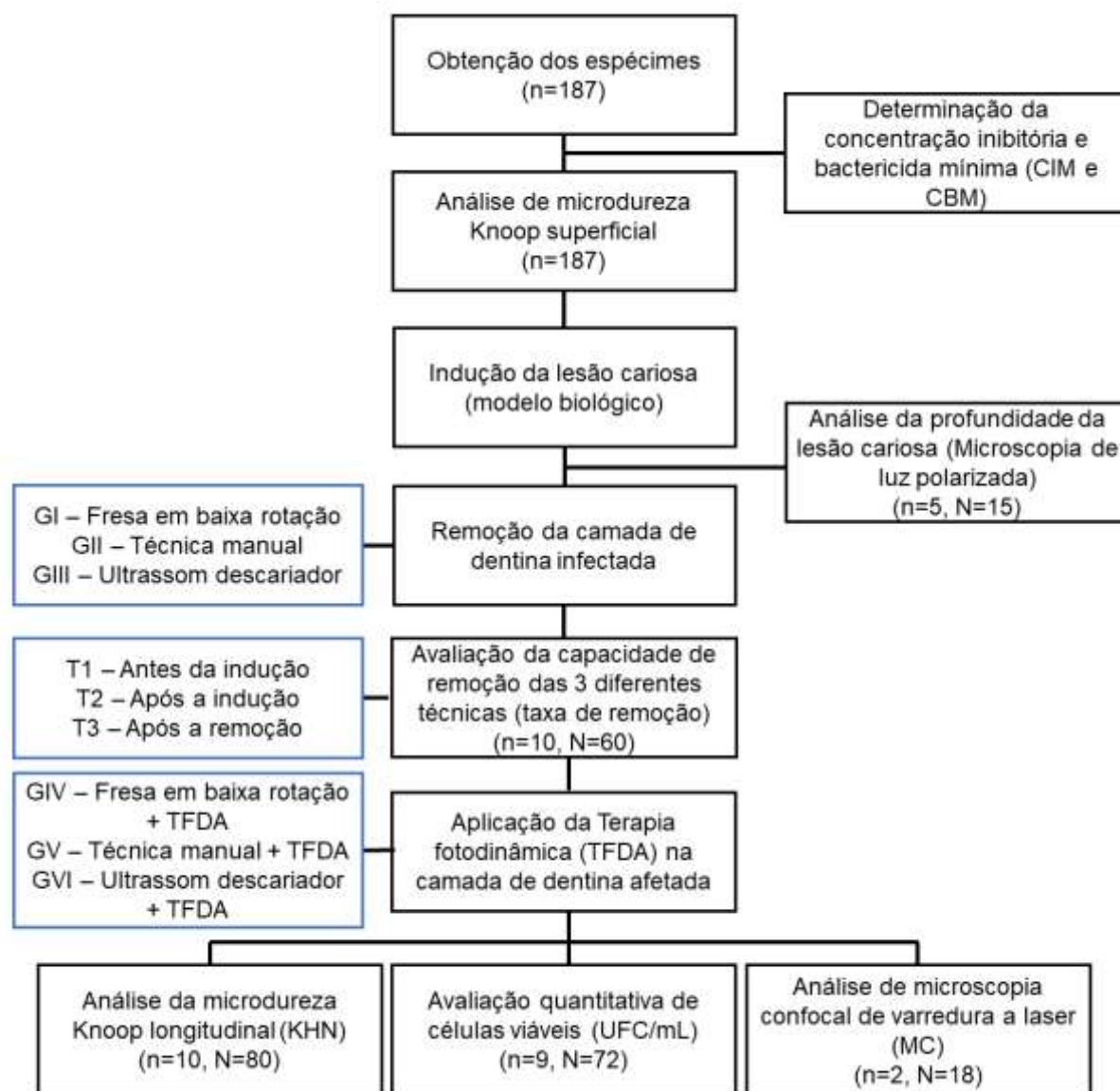
Cada etapa do estudo foi realizada em um determinado laboratório. Abaixo estão listados os laboratórios e as respectivas etapas do estudo que foram realizadas.

- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP:
  - Laboratório de Biofotônica e Bionanomateriais, Departamento de Odontologia Restauradora: indução da lesão cáriosa em dentina por modelo biológico, técnicas para remoção do tecido cariado, avaliação da capacidade de remoção das 3 diferentes técnicas, terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) e avaliação quantitativa de células bacterianas viáveis.
  - Centro de Confeções de Amostras, Departamento de Odontologia Restauradora: obtenção e preparo dos espécimes de dentina bovina.
  - Laboratório de Microscopia de Luz Polarizada, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia: microscopia de luz polarizada.
  - Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal: microscopia confocal de varredura a laser (MC).
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP:
  - Laboratório de Ciência dos Materiais aplicada à Farmácia: Método de preparação de micelas poliméricas.
- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP:
  - Laboratório de Pesquisa em Dentística, Departamento de Odontologia Restauradora: análise de microdureza Knoop superficial e microdureza longitudinal.

### 4.2 Fluxograma

No fluxograma abaixo, visualizamos todas as etapas do estudo que foram desenvolvidas, o n para cada grupo e o N total. (Figura 3).

**Figura 3 – Desenho do estudo.**



**Fonte:** Elaboração própria

#### 4.3 Fotossensibilizador e Fonte de Luz Utilizados para a TFDA

O fotossensibilizador utilizado foi a curcumina, sintetizada pelo LQBO – Laboratório de Química Bio-Orgânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil<sup>171</sup>, incorporada às micelas de Pluronic® F-127 ou ao solvente Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Lote: SHBF7360V). A fonte de luz utilizada foi equipamento com LED (*Light Emitting Diode*) em comprimento de onda de 460 nm, promovendo a irradiação uniforme e simultânea de todos os orifícios de uma mesma placa, com dose na ordem de 15 J/cm<sup>2</sup>, durante 11 minutos e 36 segundos (Biotable, MMOptics Ltda, São Carlos, São Paulo, Brasil).

#### 4.4 Método de Preparação de Micelas Poliméricas

Foi utilizado o copolímero Pluronic® F-127, produzido pela empresa Badische Anilin & Soda Fabrik BASF Corp. fornecido pela Sigma Aldrich (Lote: SLBS1853V) para obtenção das micelas e posterior associação com a curcumina.

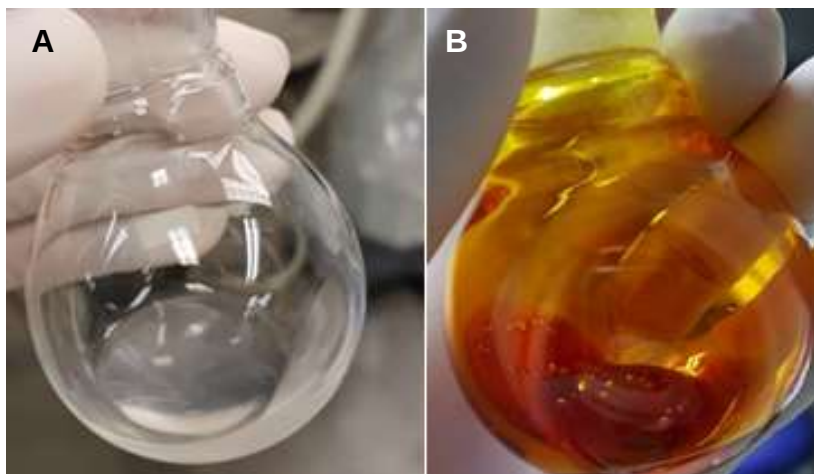
Pesou-se 0,003 g de curcumina + 0,6000 g de Pluronic® F-127 inserindo os em balão volumétrico de 50 mL contendo 35 mL de clorofórmio (Merck, Brasil) (Lote:843745-88). Realizou-se agitação manual durante 2 minutos para a homogeneização/dissolução da solução. Após, a solução foi levada ao evaporador rotatório (BuchiSwitzerland, Model: RV 10D, número de série: 07324380) (Figura 4) com bomba de vácuo (MARCONI, número de série: 350847) a 78 kPa, agitação de 55 r.p.m., água do banho (50°C) e coluna de refrigeração a 8°C para a evaporação do solvente e produção do filme polimérico (Figura 5). O solvente foi evaporado durante 30 minutos.

**Figura 4** – Evaporador rotatório com bomba de vácuo.



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 5** – Evaporação total do solvente, formando o filme polimérico. Filme polimérico contendo somente Pluronic® F-127 (A) e filme polimérico contendo curcumina + Pluronic® F-127 (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Os filmes poliméricos obtidos foram reidratados (para obter a solução micelar) com 30mL de água ultrapura (Mili-Q) a 30°C e levados ao agitador magnético IKA (Model: C-MAG HS 7 S3, número de série:07350934) com 700 r.p.m., por 30 minutos para promover a formação das micelas. Em seguida as soluções foram submetidas a dispersor do tipo mecânico (rotor estator) modelo IKA ULTRATURRAX® T 18 basic, número de série: 03364795) para o preparo das micelas durante 2 minutos na velocidade 4 de rotação do dispersor (15.500 r.p.m.).

#### 4.5 Preparo da Suspensão Bacteriana Padronizada

Utilizou-se cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fornecida pela Fundação FioCruz (Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência, Setor de Bactérias de Referência localizados na Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O *Streptococcus mutans* foi reativado e cultivado em placas de petri contendo ágar BHI (KASVI Imp. e Dist. de Prod. p/ Laboratórios LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brazil, Lote: 0824175-7). Após, em tubo Falcon contendo 5mL de caldo Bacto™ BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA, Lote: 050317503) 3 a 5 colônias foram inoculadas, sendo incubadas em estufa bacteriológica (Modelo: Q316M5, QUIMIS ISO 9001, número de série: 16042092) por 18 horas a 35°C (±2°C) e utilizados nos experimentos para obtenção da concentração

inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) e indução do biofilme.

Após o crescimento, a cultura dos tubos foi centrifugada a 3000 r.p.m. por 15 minutos, (Centrífuga Excelsa II, Fanem, Mod. 206 BL, número de série: RAM047321) proporcionando a obtenção de precipitado da biomassa. O sobrenadante foi descartado e a biomassa resuspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada) até atingir a absorbância padronizada de 0,08-1.0 lida no espectrofotômetro (Modelo VM-5, Bel Photonics, número de série: HC1509041) (Figura 6) em 600 nm, turvação aproximada a 0.5 da escala de Mc Farland com quantidade de células da ordem de  $10^8$  células bacterianas/mL.

**Figura 6** – Espectrofotômetro visível (Modelo VM-5, Bel Photonics).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

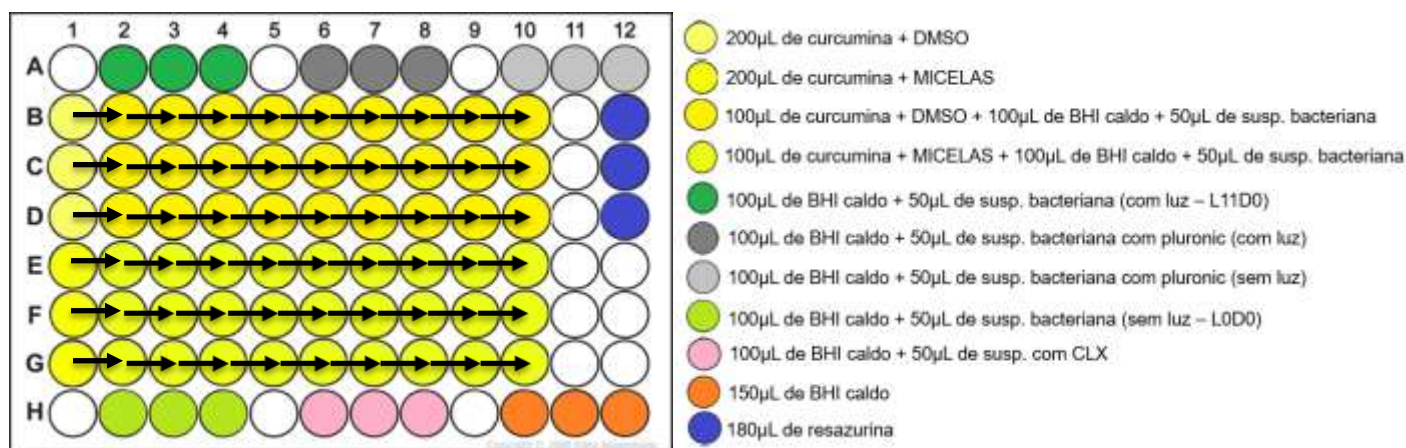
#### **4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Poços para cada grupo, controle e experimental, foram utilizados para determinação da CIM por meio do método da microdiluição em caldo de acordo com as normas da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de 2013<sup>172</sup>. Cada poço de uma placa de 96 poços (KASVI Imp. e Dist. de Prod. p/ Laboratórios LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brazil, lote: 171016-078) contendo 100µL de caldo BHI + sacarose a 1% recebeu 100 µL do fotossensibilizador curcumina incorporada ao solvente Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, Lote: SHBF7360V) e poços do fotossensibilizador incorporado às micelas de Pluronic® F-127 utilizado nas concentrações de 270, 135, 67.5, 33.75, 16.875, 8.4375, 4.2187, 2.1093, 1.0546 e 0.5273 µM. Uma suspensão contendo 50 µL de *Streptococcus mutans* foi adicionada

separadamente em cada poço da placa obtendo-se concentração final da ordem de  $1 \times 10^5$  células/mL.

O estudo também foi realizado utilizando-se o controle positivo de crescimento, por meio de poços com bactéria e sem a solução com fotossensibilizador e controle negativo de crescimento, por meio de poços sem adição de bactéria (Figura 7). Após os tempos pré-irradiação, para os grupos TFDA, foi realizada irradiação dos poços por sistema de luz LED (Biotable, MMO) (Figura 8) com dose de  $15 \text{ J/cm}^2$  sendo incubados na sequência em estufa bacteriológica (Modelo: Q316M5, QUIMIS ISO 9001, número de série: 16042092) à  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após, realizou-se a adição de  $30 \mu\text{L}$  de rezasurina (Sigma Aldrich, Lote: MKBT9691V) a 0.10%, com incubação das placas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , sob agitação de 75 r.p.m (Incubadora com agitação orbital, QUIMIS, Modelo: Q816M22, número de série: 16052406) (Figura 9) por 3 horas. Para a CIM, a presença de bactérias viáveis foi observada pela mudança de coloração nos poços (173). Os poços com coloração em azul não tiveram crescimento bacteriano visível e os poços com coloração violeta observou-se crescimento bacteriano. Já a CBM foi determinada após o plaqueamento dos orifícios que não mostraram crescimento visível (coloração azul), ou seja,  $\text{DO } 600\text{nm} \leq 0.05$ , sendo retirados  $10 \mu\text{L}$ , os quais foram plaqueados em meio de cultura específico (ágar BHI) para crescimento de *Streptococcus mutans*. As placas foram mantidas a  $35^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$  por 48 horas em estufa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**Figura 7** – Representação da metodologia utilizada na determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM).



**Fonte:** Elaboração própria.

**Figura 8** – Fonte de luz utilizada para TFDA (BioTable, MMOptics).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 9** – Incubadora com agitação orbital (QUIMIS).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

A CIM foi definida como a menor concentração da curcumina sem crescimento visível (atividade bacteriostática), e a CBM como a menor concentração capaz de reduzir o inóculo inicial a  $\geq 99.9\%$  (atividade bactericida).

Ao final da CIM e da CBM, utilizou-se as melhores concentrações nos experimentos (sendo curcumina incorporada às micelas ou ao solvente Dimetilsulfóxido - DMSO).

#### 4.7 Obtenção e Preparo dos Espécimes de Dentina Bovina

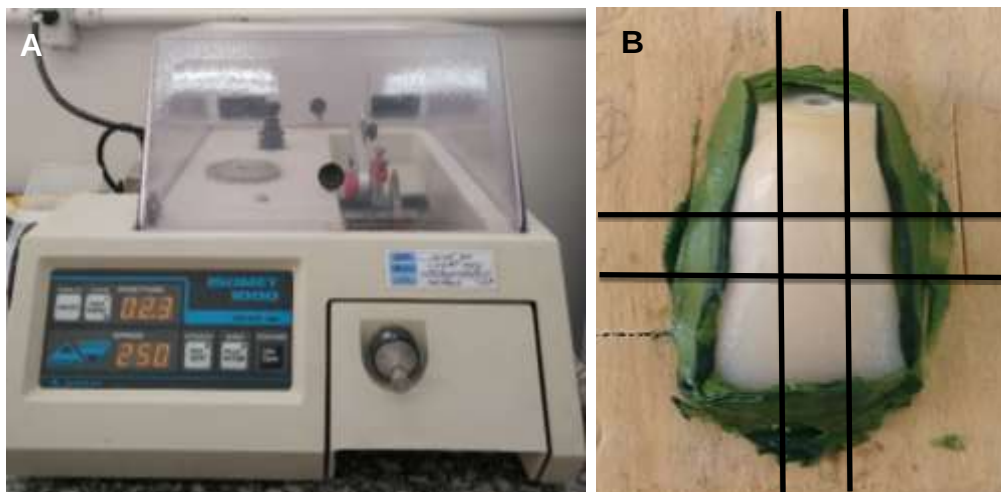
Previamente ao início da pesquisa, o protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CEUA), Processo nº 33/2018 (ANEXO A). Foram obtidos 250 incisivos bovinos, sendo utilizados 190 para obtenção dos espécimes. Os outros 60 incisivos bovinos foram excluídos por apresentarem trincas, fraturas ou manchamentos (Figura 10) em lixo biológico de acordo com as normas do CEUA. Os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% durante 24 horas. A fim de obter blocos de dentina bovina (espécimes) com dimensões de 4x4x2 mm, utilizou-se cortadeira de precisão (Isomet 1000, Buheler LTD, Lake Bluff, Illinois – USA, modelo: 11-2180, número de série: 519IPS00641) (Figura 11).

**Figura 10 – Dentes excluídos.**



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 11** – Cortadeira de precisão utilizada para obter os espécimes de dentina (Isomet 1000, Buheler LTD) (A) e Incisivo bovino utilizado para obter os espécimes de dentina (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Após o corte, removeu-se a superfície vestibular do esmalte (lixa #80) até atingir a dentina e a mesma foi lixada e polida (lixa #320 #600 #1200 #1500) em Politriz circular (DP-10, Struers-Panambrá, São Paulo, São Paulo, Brasil, número de série: 15A-1138) (Figura 12) removendo o esmalte remanescente e aplainando-se a superfície. Os espécimes foram armazenados em água destilada e ficaram refrigerados a 8°C ( $\pm 2$ ) até o início dos experimentos.

**Figura 12** – Equipamento utilizado para lixar os espécimes (Politriz - Panambrá DP-10)

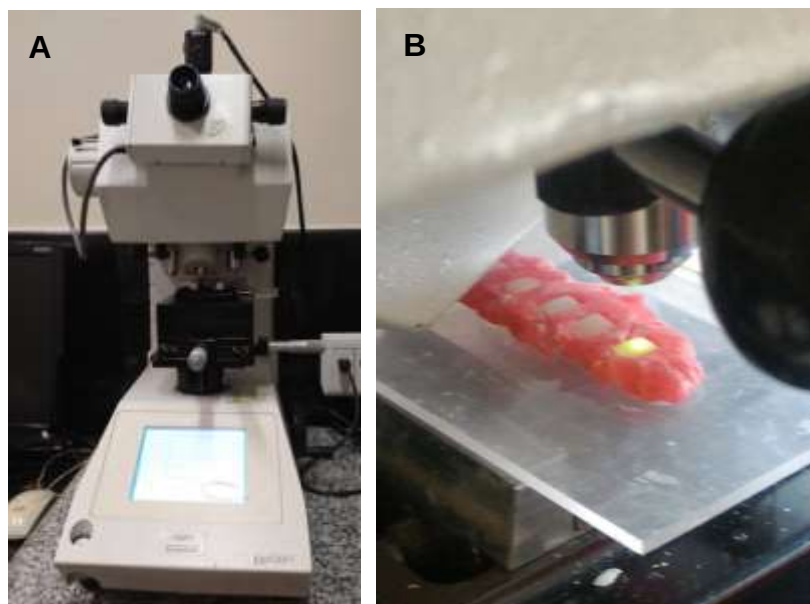


**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

#### 4.8 Análise de Microdureza Knoop Superficial

Submeteu-se os espécimes (n=187) à análise de microdureza superficial utilizando-se o microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000, Japão, número de série: 344-04109-XX), por meio de indentador do tipo Knoop com carga de 10 gramas de força durante 10 segundos. Em cada fragmento foram realizadas 5 indentações com 100  $\mu$ m de distância entre cada indentação para analisar a microdureza superficial (Figura 13). Foram excluídos os espécimes que apresentaram a média de microdureza de superfície 20% abaixo ou 20% acima da média geral, sendo 29  $\pm$  6 KHN para a dentina<sup>174</sup>.

**Figura 13** – Microdurômetro (A), Visualização do espécime que foi realizado a indentação do tipo Knoop (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

#### 4.9 Indução da Lesão Cariosa em Dentina por Modelo Biológico

As superfícies dos espécimes foram isoladas com verniz ácido-resistente (Colorama CEIL Ltda., São Paulo, SP, Brasil, Lote: 58S500) a fim de deixar apenas a superfície vestibular em contato com a suspensão bacteriana. Após, os espécimes foram incluídos em lamínulas de vidro circular (diâmetro de 13 mm, espessura de 0.13 -0.16 mm) (Olen, KASVI Imp. e Dist. de Prod. p/ Laboratórios LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brazil, Lote: 201803) utilizando silicona de condensação: silicona leve (Oranwash L – Zhermak, Lote: 102581) e catalisador (Indurent gel – Zhermak, Lote:

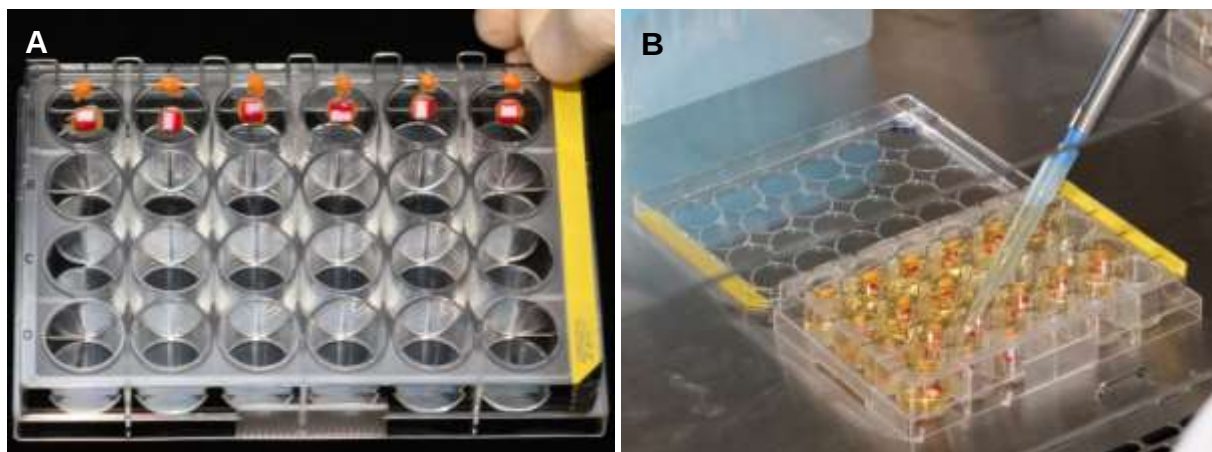
210876). Posteriormente, as lamínulas de vidro foram estabilizadas no fio ortodôntico utilizando também a silicona de condensação. Para que os fios ortodônticos ficassem corretamente posicionados na placa de 24 poços (KASVI Imp. e Dist. de Prod. p/ Laboratórios LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brazil, Lote: 171007-076), foram realizadas dobraduras no fio, afim de estabilizá-lo na placa. Com isso, o fio ortodôntico contendo os espécimes nas lamínulas ficaram suspensos dentro de cada poço. Para tanto, ambos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C e transferidos para placas com 24 poços, contendo 2 mL de suspensão indutora de cárie (Figuras 14 e 15). Essa suspensão foi preparada com suplementação da infusão de cérebro-coração (caldo BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedura 0,5 g/100 mL, glicose 1g/100 mL e sacarose P.A. 2g/100 mL). A cada 100 mL dessa suspensão foram acrescentados 20% da suspensão bacteriana contendo *Streptococcus mutans* ( $10^8$  UFC), com o intuito de promover o crescimento bacteriano. Os espécimes foram mantidos em estufa bacteriológica (Modelo: Q316M5, QUIMIS ISO 9001, Número de série: 16042092) a 35°C  $\pm$  2°C, por 7, 10 ou 14 dias. A suspensão indutora era trocada a cada 48 horas. Decorrido esse período, os experimentos foram realizados de acordo com os grupos estudados.

**Figura 14** – Meio de cultura utilizados para confecção da solução indutora (caldo BHI, sacarose, glicose e extrato de levedura) (A) e Preparo da suspensão bacteriana com *Streptococcus mutans* (B).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

**Figura 15** – Indução da lesão de cárie em dentina por modelo biológico. Espécimes isolados com verniz ácido resistente (A) e Placa de 24 poços contendo solução indutora + espécimes de dentina (B).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Estudo piloto foi realizado para determinar o melhor tempo para promover a formação da lesão cáriosa artificial em dentina. Os espécimes foram mantidos em placa de 24 poços, contendo a solução indutora com *Streptococcus mutans* a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), em estufa bacteriológica por 7, 10 e 14 dias. Após a indução da lesão cáriosa de acordo com os dias determinados, as profundidades das lesões foram analisadas por meio da análise de microscopia de luz polarizada.

#### 4.10 Microscopia de Luz Polarizada

Após indução da lesão cáriosa *in vitro* ( $n=5$ ,  $N=15$ ), os espécimes de dentina foram lavados em água destilada corrente por 1 minuto e submetidos à análise por microscopia de luz polarizada. Os espécimes foram incluídos em lâminas de acrílico para serem cortados em micrótomo para corte de metais e sistema de processamento histológico (EXAKT Technologies, CL System, modelo 300 CP) com espessura de 300  $\mu\text{m}$  cada, por meio da técnica do “sanduíche”. Posteriormente foram lixados até atingir espessura média de 100  $\mu\text{m}$ , sendo 20% abaixo ou acima. A espessura do espécime foi confirmada por meio de paquímetro digital.

Para verificar a profundidade das lesões cárias, as lâminas de acrílico contendo os espécimes foram levadas ao microscópio de luz polarizada (Leica DM2500 – Leica Microsystem, São Paulo, SP, Brasil, número de série: 332354-

032011). As análises foram realizadas com as objetivas em aumento de 10 e 20x no Laboratório de Análise Histopatológica para Cortes não Descalcificados e Laboratório de Microscopia de Luz Polarizada da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Ao final da análise, foi possível identificar o melhor protocolo para realizar a indução. Dessa forma, o estudo piloto foi importante para identificar a melhor metodologia para se utilizar quanto ao período em que os espécimes ficariam em contato com a solução indutora.

#### **4.11 Técnicas para Remoção do Tecido Cariado**

Após o desenvolvimento das lesões cariosas, os espécimes foram lavados com água destilada e aplicado evidenciador de dentina cariada (Revelacárie, ASFER, Indústria química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil, Lote: 2450) para a identificação visual da dentina infectada, de acordo com os critérios descritos por Momoi et al. (2012)<sup>175</sup>. A solução foi aplicada sobre a superfície da dentina cariada por 10 segundos seguido de lavagem com jato de água por 10 segundos. A dentina corada foi identificada como infectada (dentina amolecida)<sup>176</sup>. A remoção foi realizada durante 1 minuto e executada por único operador de acordo com as seguintes técnicas:

##### **4.11.1 Técnica manual**

Realizou-se a remoção da dentina infectada por meio da técnica manual utilizando escavador de dentina (cureta) (Escavador duplo nº 18, Golgran, São Caetano do Sul, Brasil, número de série: 1046333) (Figura 16). Para aferir o tecido remanescente, a checagem foi realizada por meio da análise visual e com uma sonda exploradora estéril<sup>177</sup>. A aplicação do evidenciador de dentina cariada foi realizada novamente para confirmar se houve remoção completa da dentina infectada.

##### **4.11.2 Técnica convencional**

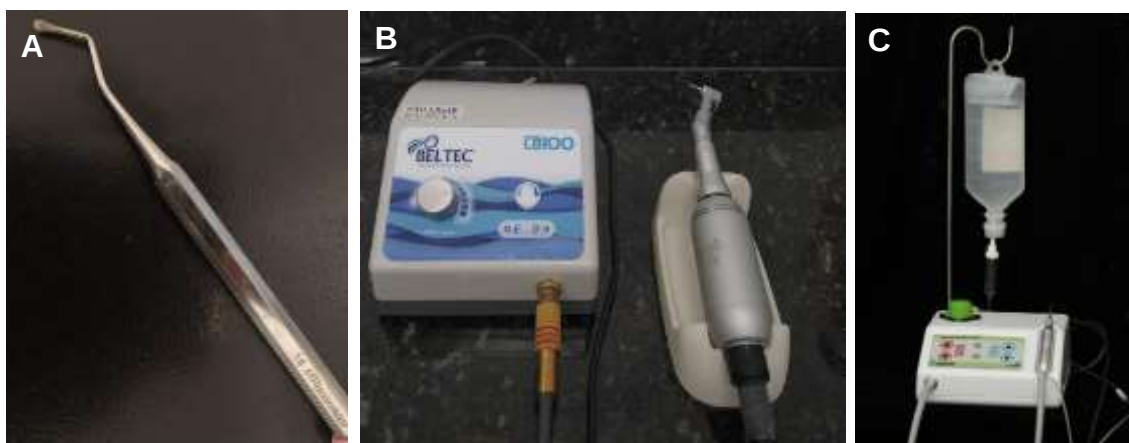
A remoção da dentina infectada foi realizada com fresa esférica de aço carbide AR 7 (JET Carbide Burs) em baixa rotação acoplada em uma peça de mão de baixa velocidade (LB100, Beltec Ind. E Com. de Equipamentos Odontológicos, Araraquara, SP, Brasil, número de série: LB1-0132680) (Figura 16) com os seguintes parâmetros: 15000 r.p.m., potência de 40 W e frequência de 0,06 kHz. Para aferir o tecido

remanescente, a checagem foi realizada por meio da análise visual e com uma sonda exploradora estéril<sup>177</sup>. A aplicação do evidenciador de dentina cariada foi realizada novamente para confirmar se houve remoção completa da dentina infectada.

#### 4.11.3 Uso de ultrassom descariador

Realizou-se a remoção da dentina infectada com ponta esférica revestida de diamante (E3D, Helse Dental Technology, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil, Lote: 17080618) acoplada a protótipo de dispositivo para remoção de cárie por ultrassom (potência de 30 W; frequência de 27,5 kHz) (Figura 16) sob refrigeração de água destilada estéril. O equipamento foi desenvolvido pelo CePOF - Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica, do Instituto de Física de São Carlos – IFSC, Universidade de São Paulo - USP. Para aferir o tecido remanescente, a checagem foi realizada por meio da análise visual e com uma sonda exploradora estéril<sup>177</sup>. A aplicação do evidenciador de dentina cariada foi realizada novamente para confirmar se houve remoção completa da dentina infectada.

**Figura 16** – Escavador nº 18 (A), Peça de mão em baixa velocidade (B) e Ultrassom descariador (C).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

#### 4.12 Avaliação da Capacidade de Remoção das 3 Diferentes Técnicas

Dez espécimes para cada grupo (n=10, N=60) foram utilizados para a avaliação da capacidade de remoção das 3 diferentes técnicas.

O quadro abaixo (Quadro 1) mostra os grupos que foram investigados e a situação experimental de cada grupo.

**Quadro 1** – Grupos investigados e situação experimental.

| Grupos Investigados | Situação Experimental                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>GI</b>           | Fresa esférica em baixa rotação                            |
| <b>GII</b>          | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)           |
| <b>GIII</b>         | Ultrassom descariador                                      |
| <b>GIV</b>          | Fresa esférica em baixa rotação + TFDA                     |
| <b>GV</b>           | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)<br>+ TFDA |
| <b>GVI</b>          | Ultrassom descariador + TFDA                               |

**Fonte:** Elaboração própria.

A análise foi realizada por meio da taxa de remoção (perda de massa de cada espécime de dentina). Os espécimes foram desidratados em incubadora a  $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Labor Com. De Prod. Lab. Ltda., Presidente Prudente, SP, Brasil, número de série: 09/16-0106) durante 30 minutos. Após, os espécimes foram pesados em balança de precisão (Adventurer AR2140, OHAUS Corporation, Parsippany, NJ, USA, número de série: M2548329080189) (Figura 17) em três momentos diferentes de avaliação: T1 - previamente a indução da lesão cariosa, T2 - após indução da lesão cariosa e T3 - após remoção da lesão cariosa.

Após T1, os espécimes foram reidratados por 60 segundos em PBS e em seguida, as técnicas de remoção foram realizadas.

**Figura 17** – Balança de precisão utilizada para a pesagem dos espécimes.



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

#### 4.13 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)

Após os procedimentos de remoção da dentina infectada, realizou-se a TFDA em cada poço com fragmento com a finalidade de promover ação antibacteriana de acordo com os grupos. Nos grupos que foram realizados a descontaminação com a TFDA, a solução contendo o fotossensibilizador, permaneceu em contato com a dentina por 5, 10, 15 ou 20 minutos (tempo pré-irradiação) determinado na análise de CIM e CBM da curcumina. Em seguida, os espécimes foram irradiados uniformemente com luz LED em comprimento de onda de 460 nm com dose da ordem de 15 J/cm<sup>2</sup> (BioTable, MMO) por 11 minutos e 36 segundos.

#### 4.14 Microdureza Longitudinal

Após a remoção da dentina infectada e aplicação da TFDA, dez espécimes (n=10, N=80) para cada grupo foram cuidadosamente limpos com gaze estéril.

O quadro abaixo (Quadro 2) mostra os grupos que foram investigados e a situação experimental de cada grupo.

**Quadro 2** – Grupos investigados e situação experimental.

| Grupos Investigados | Situação Experimental                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>GI</b>           | Fresa esférica em baixa rotação                            |
| <b>GII</b>          | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)           |
| <b>GIII</b>         | Ultrassom descariador                                      |
| <b>GIV</b>          | Fresa esférica em baixa rotação + TFDA                     |
| <b>GV</b>           | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)<br>+ TFDA |
| <b>GVI</b>          | Ultrassom descariador + TFDA                               |
| <b>GVII</b>         | Dentina hígida                                             |
| <b>GVIII</b>        | Presença de lesão cáries                                   |

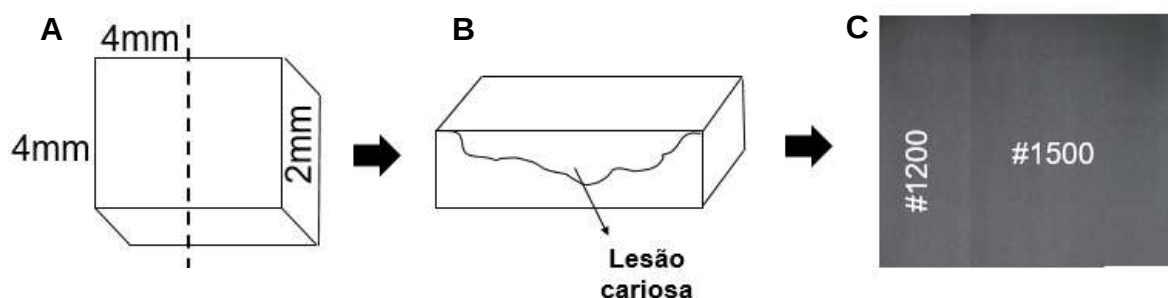
**Fonte:** Elaboração própria.

Os espécimes foram seccionados longitudinalmente ao centro da superfície da dentina (Figura 18) utilizando-se cortadeira de precisão (Isomet 1000, Buheler LTD, Lake Bluff, Illinois – USA, Modelo: 11-2180, número de série: 519IPS00641). Após, foram submetidos à análise de microdureza longitudinal por microdurômetro com

indentação do tipo Knoop (Shimadzu Micro HardnessTester HMV-2000, Japão, número de série: 344-04109-XX) (Figura 19). Realizou-se também, análises de microdureza de espécimes sem a indução da lesão de cárie e espécimes somente com a indução da lesão de cárie (controles). Foram realizadas 10 indentações, divididas em 2 colunas com 10 gramas força por 10 segundos e distância de 40  $\mu\text{m}$  entre elas, iniciadas a partir da superfície externa da lesão, segundo as profundidades de 40, 80, 120, 160, 200  $\mu\text{m}$ <sup>174,178</sup>.

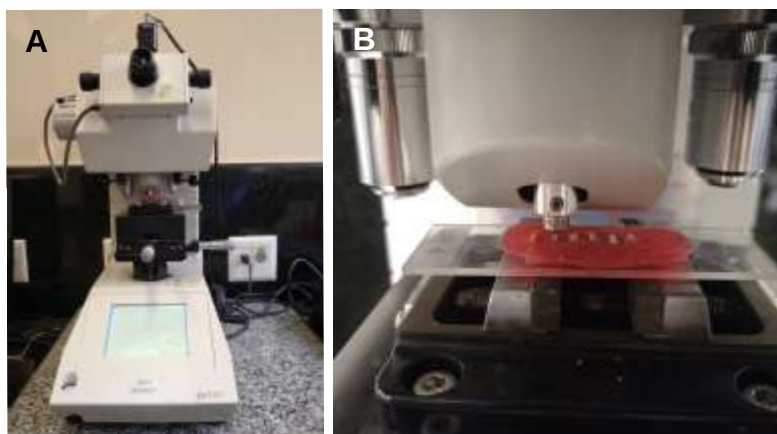
**Figura 18** – Representação esquemática do preparo dos espécimes para realização da análise de microdureza longitudinal. Corte transversal localizado no centro do espécime (A), visão da superfície interna do espécime, localizada a lesão cariosa e Lixas (#1200 e #1500) utilizadas para o polimento interno dos espécimes (C).

Preparo dos espécimes



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 19** – Análise de microdureza longitudinal utilizando microdurômetro com indentação do tipo Knoop. Microdurômetro (A), Visualização do espécime que foi realizado a indentação do tipo Knoop (B).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

#### 4.15 Avaliação Quantitativa de Células Bacterianas Viáveis

Após os procedimentos experimentais, o fotossensibilizador foi removido e realizada a lavagem dos poços contendo os espécimes com PBS, sendo repetido por 3 vezes para remover todo o fotossensibilizador remanescente.

O quadro abaixo (Quadro 3) mostra os grupos que foram investigados e a situação experimental de cada grupo.

**Quadro 3** – Grupos investigados e situação experimental.

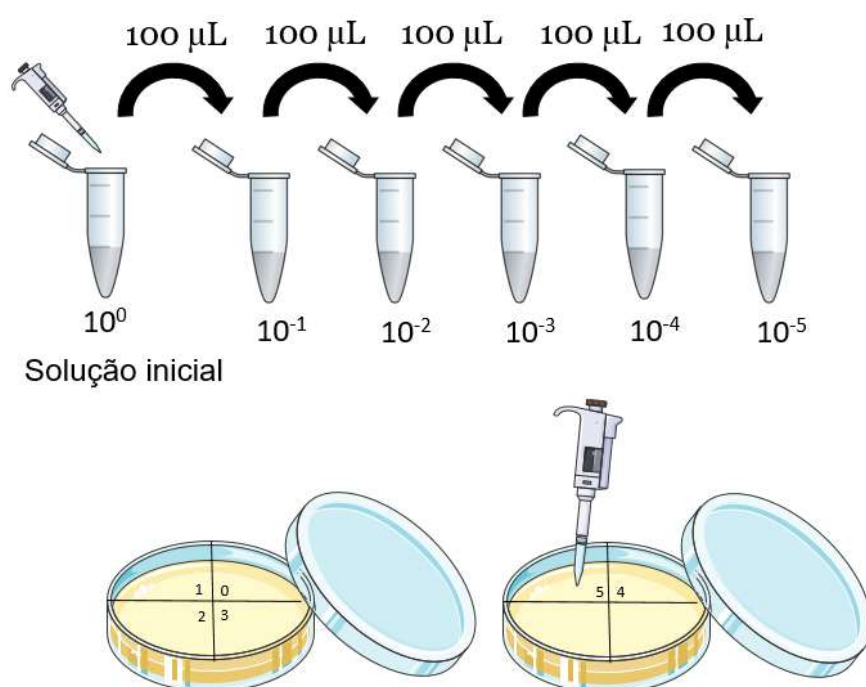
| Grupos Investigados | Situação Experimental                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>GI</b>           | Fresa esférica em baixa rotação                            |
| <b>GII</b>          | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)           |
| <b>GIII</b>         | Ultrassom descariador                                      |
| <b>GIV</b>          | Fresa esférica em baixa rotação + TFDA                     |
| <b>GV</b>           | Técnica manual com escavador de dentina (cureta)<br>+ TFDA |
| <b>GVI</b>          | Ultrassom descariador + TFDA                               |
| <b>GVII</b>         | Clorexidina (CLX)                                          |
| <b>GVIII</b>        | Presença de lesão cariosa                                  |

**Fonte:** Elaboração própria.

Após a lavagem, o espécime foi colocado em um tubo do tipo eppendorf e então levado ao agitador de soluções (vortex) (Phoenix, modelo: AP-56, número de série: 16737) durante 30 segundos para desagregar as bactérias presente no espécime. Esse eppendorf foi considerado a solução inicial ( $10^0$ ). A partir da solução inicial, realizou-se as diluições seriadas para posteriormente efetuar a contagem das unidades formadoras de colônias. Realizou-se 5 diluições,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  para cada poço de cada grupo a partir da suspensão considerada inicial ( $10^0$ ). De um tubo de microcentrifugação do tipo eppendorf para o outro, 100  $\mu$ L foi coletado, pois em cada eppendorf havia 900  $\mu$ L de PBS, sendo originadas assim as demais diluições. De cada diluição foram pipetados 25  $\mu$ L sobre meio de cultura apropriado (BHI Agar - Brain Heart Infusion, DifcoLaboratories, Becton Dickinson andCompany, USA + sacarose a 1%, Lote: 082417507) contido em placas de Petri (90x15 mL) divididas em 4 quadrantes (Figura 20). Esta solução foi espalhada sobre a superfície deste meio

com alça de Drigalsky sempre da maior diluição para a menor. O estudo também foi realizado utilizando-se espécimes sem nenhum tipo de tratamento (somente a presença de biofilme) e espécimes tratados somente com clorexidina 0.2% (Sigma Aldrich, St Louis, MI, EUA). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 48 horas em estufa bacteriológica (Modelo: Q316M5, QUIMIS ISO 9001, número de série: 16042092), para ocorrer a multiplicação bacteriana a ponto de surgirem colônias visíveis a olho nu. Cada colônia visível corresponde a uma unidade formadora de colônia que existiu inicialmente após ocorrência da multiplicação celular ao longo do tempo.

**Figura 20** – Técnica da diluição seriada e plaqueamento em ágar BHI.



**Fonte:** Elaboração própria.

Segundo esta técnica de contagem escolheu-se as placas que apresentam de 30 a 300 UFC para cálculo do número de UFC/mL. Para realização da análise, utilizou-se três espécimes para cada grupo em três ocasiões diferentes (n=9, N=72).

#### 4.16 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MC)

Dois espécimes para cada grupo foram utilizados para a análise (n=2, N=18). Foram obtidas imagens utilizando-se microscópio de fluorescência confocal (CARLS

ZEISS LSM 800 com Airyscan com detector GaAsp, lasers 488 nm e 561 nm, Alemanha, número de série: 120L-80034) do Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Os espécimes foram imersos em 500 µL de água destilada contendo o corante LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, Lote: 1856569) durante 30 minutos para posterior análise. Este sistema é composto por dois corantes que devem ser misturados previamente ao uso, sendo: SYTO 9 (1 µL) e iodeto de propídio (IP, 1 µL) para cada 1000 µL. O SYTO 9 cora as bactérias de verde (marcador para ácido nucléico), enquanto o IP penetra nas membranas danificadas corando-as de vermelho, permitindo identificar, dessa forma as células viáveis (verdes) e não viáveis (vermelha). Para detectar a autofluorescência, foram utilizadas objetivas com aumento 40 e 63x em alta resolução com faixa de excitação em 488 nm e um filtro de passagem de 505 nm para SYTO e excitação em 561 nm com filtro de passagem de 610 nm para IP. Configurações padrão para contraste, brilho e energia do laser serão adotadas para todas as imagens<sup>80</sup>.

#### **4.17 Análise Estatística**

Após a avaliação dos pressupostos de normalidade (Shapiro Wilk,  $p \geq 0,05$ ) e homocedasticidade (Teste F), os dados foram submetidos à análise estatística de acordo com os métodos de análise:

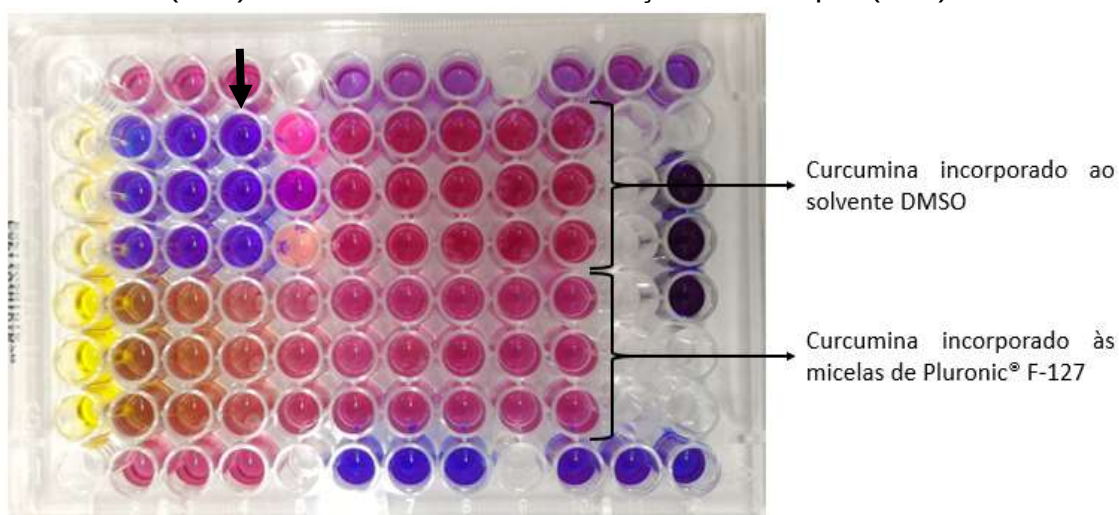
- Taxa de remoção: análise de variância ANOVA a 2 fatores e pós-teste de Sidak;
- Microdureza longitudinal: análise de variância ANOVA a 2 fatores e pós-teste de Tukey;
- Análise quantitativa de células viáveis (UFC/mL): análise de variância ANOVA a 1 fator;
- As imagens em microscopia confocal de varredura a laser (MC) foram analisadas de maneira qualitativa.

Os pós-testes foram realizados para verificar a comparação múltipla entre os grupos. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

De acordo com a determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM), a curcumina incorporada ao solvente DMSO se mostrou eficaz nas concentrações 270, 135 e 67,5  $\mu\text{m}$  quando comparada à curcumina incorporada às micelas de Pluronic® F-127 nas mesmas concentrações (Figura 21). A concentração mínima capaz de promover ação bacteriostática (CIM), foi também, a concentração que promoveu ação bactericida (CBM) (Figura 22). Sendo assim, a concentração de curcumina escolhida para os experimentos foi de 67,5  $\mu\text{m}$  incorporada ao solvente DMSO.

**Figura 21** – Concentrações de curcumina incorporada ao solvente DMSO e às micelas de Pluronic® F-127 e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A seta mostra a concentração de 67,5  $\mu\text{m}$  (CIM).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

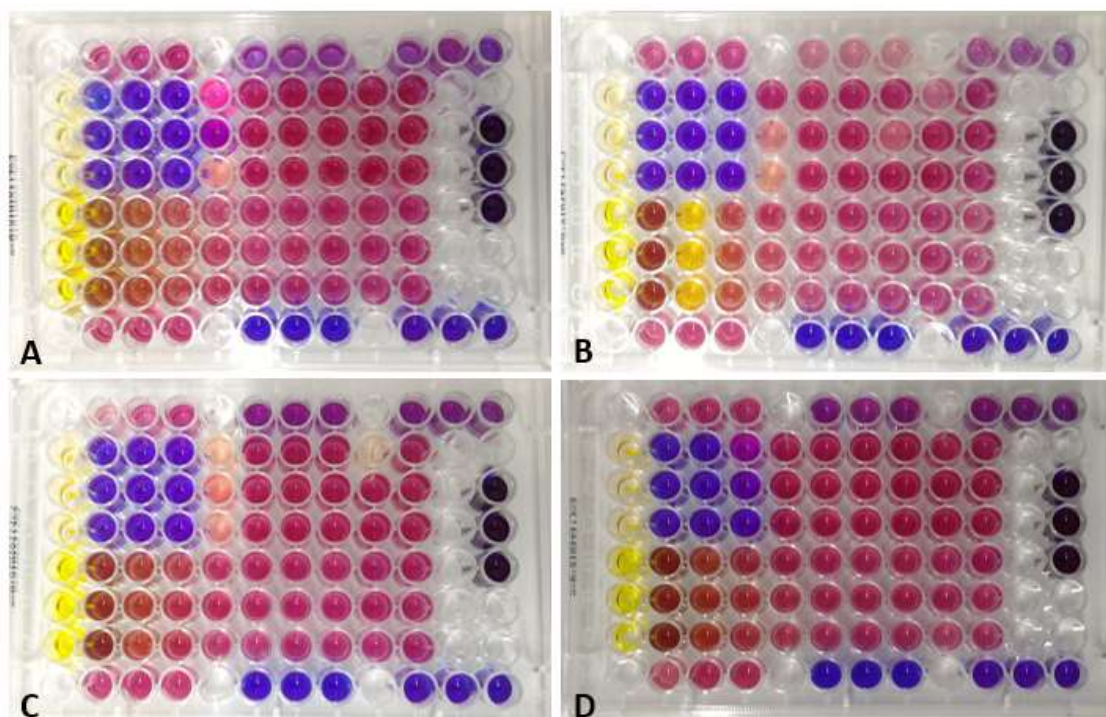
**Figura 22** – Concentração bactericida mínima (CBM). A seta mostra a concentração de 67,5  $\mu$ m (CBM).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Em relação aos tempos pré-irradiação não houve diferença entre eles. Sendo assim, permaneceu o menor tempo pré-irradiação que foi de 5 minutos (Figura 23).

**Figura 23** – Placas da CIM e da CBM com os diferentes tempos pré-irradiação: 5 minutos (A), 10 minutos (B), 15 minutos (C) e 20 minutos (D).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

De acordo com a análise de microscopia de luz polarizada, foi possível verificar a profundidade da lesão cáriosa e determinar o melhor protocolo a se utilizar para indução da cárie artificial por modelo biológico (7,10 ou 14 dias). As análises de 7, 10 e 14 dias mostraram profundidade de 147,9  $\mu\text{m}$  (Figura 24), 199,5  $\mu\text{m}$  (Figura 25) e 467,2  $\mu\text{m}$  (Figura 26) respectivamente.

Além disso, em todas as lesões formadas é possível verificar a presença de 3 diferentes camadas. A camada superior é a superfície que ficou em contato diretamente com a suspensão indutora de cárie, sugerindo ser a camada referente à dentina infectada (totalmente desmineralizada). Abaixo desta, temos o que sugere ser a camada referente a dentina afetada (passível de remineralização) e por fim, a camada em que apresenta a dentina hígida.

Por isso, de acordo com as diferenças entre as lesões formadas em cada protocolo, a lesão que apresentou maior uniformidade para a padronização dos experimentos, foi a de 7 dias.

**Figura 24** – Imagens de microscopia de luz polarizada mostrando a lesão de cárie artificial de dentina (7 dias).

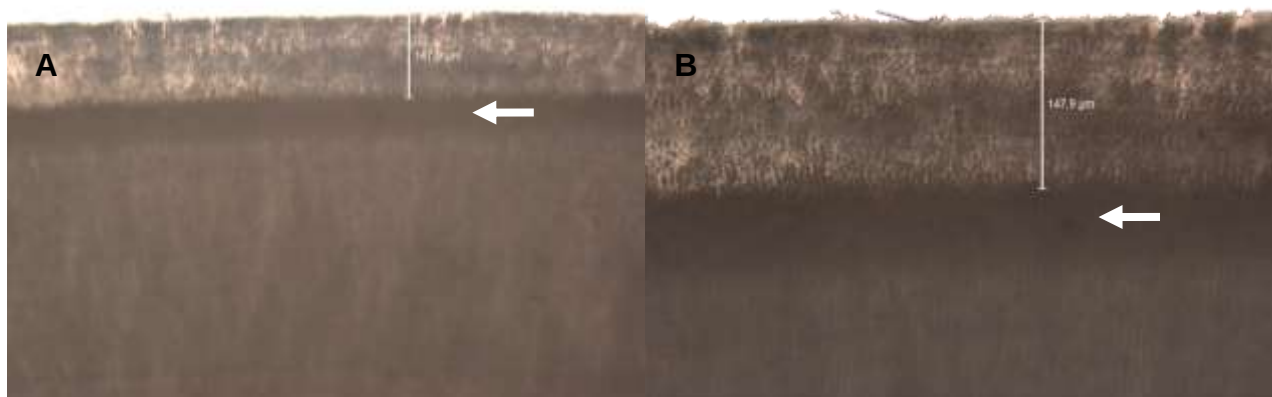


Imagem de microscopia de luz polarizada exibindo as diferentes camadas da dentina cariada em aumentos de 10x (A) e 20x (B). As setas indicam a dentina afetada por cárie.

**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 25** – Imagens de microscopia de luz polarizada mostrando a lesão de cárie artificial de dentina (10 dias).

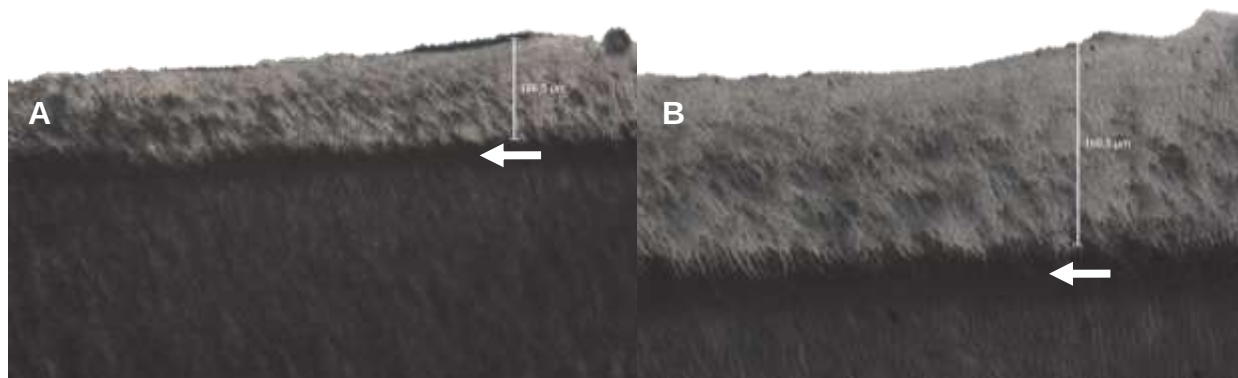


Imagem de microscopia de luz polarizada exibindo as diferentes camadas da dentina cariada em aumentos de 10x (A) e 20x (B). As setas indicam a dentina afetada por cárie.

**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 26** – Imagens de microscopia de luz polarizada mostrando a lesão de cárie artificial de dentina (14 dias).

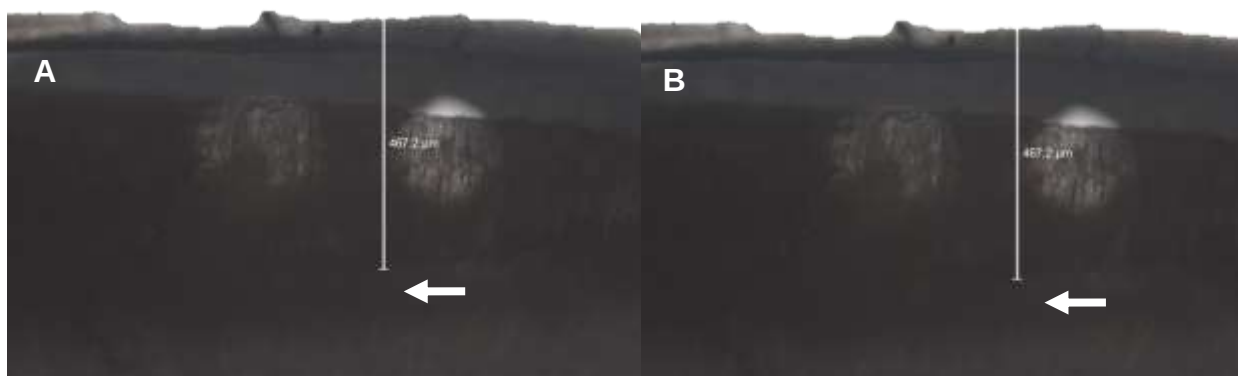
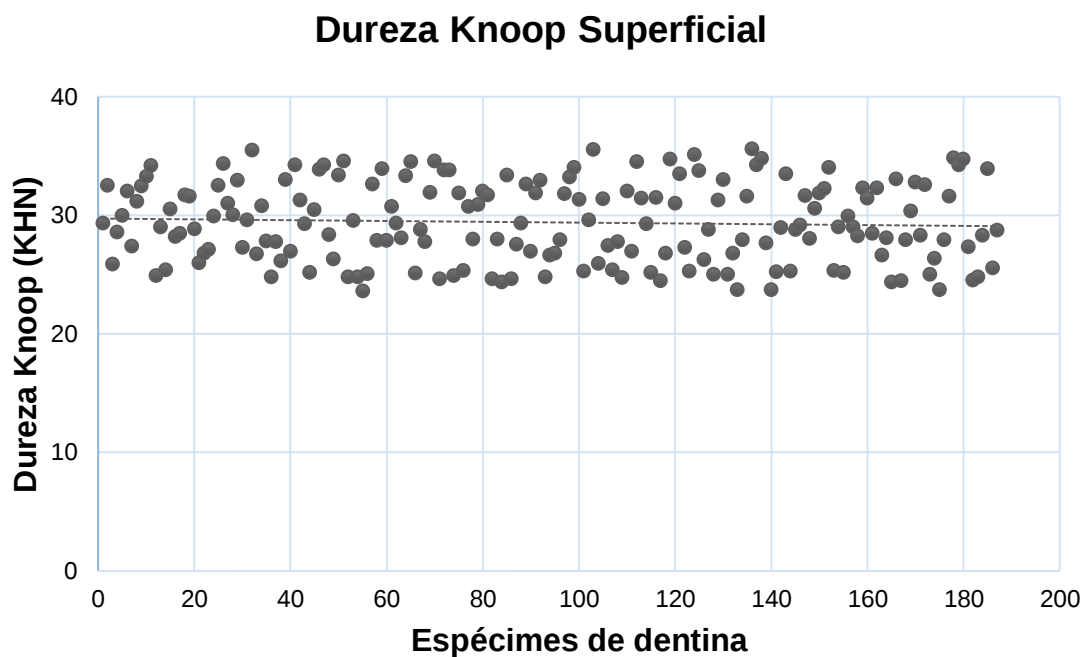


Imagem de microscopia de luz polarizada exibindo as diferentes camadas da dentina cariada em aumentos de 10x (A) e 20x (B). As setas indicam a dentina afetada por cárie.

**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Previamente ao início dos experimentos, foi realizada a padronização dos espécimes (n=187) utilizados na pesquisa por meio do teste de microdureza Knoop superficial ( $29,4 \pm 3$  KHN) (Figura 27).

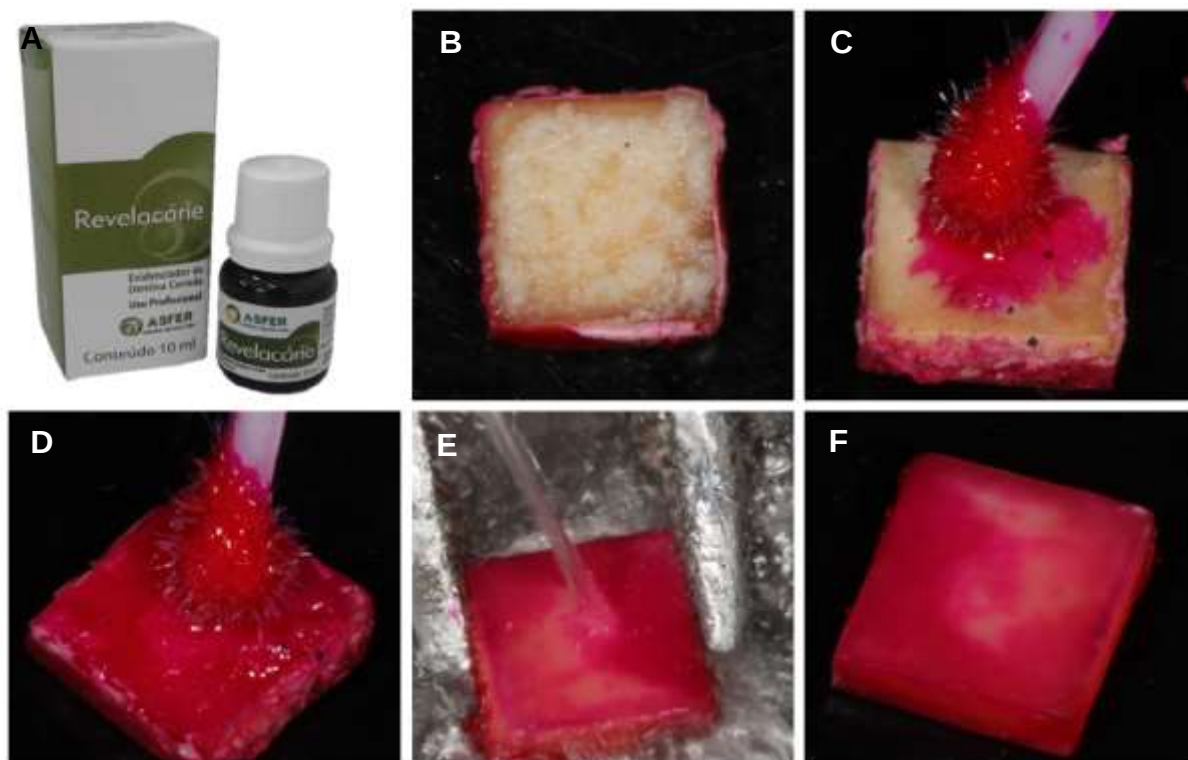
**Figura 27** – Microdureza Knoop superficial dos espécimes. (n=187).



**Fonte:** Elaboração própria.

Para realizar a remoção da lesão cariosa, aplicou-se evidenciador de cárie em dois momentos: o primeiro, após a formação da lesão cariosa e o segundo, após a remoção do tecido cariado com as diferentes técnicas. A aplicação desse corante, teve como finalidade, demonstrar a presença de tecido cariado no espécime e verificar se a técnica utilizada removeu de forma conservadora toda dentina infectada (Figura 28).

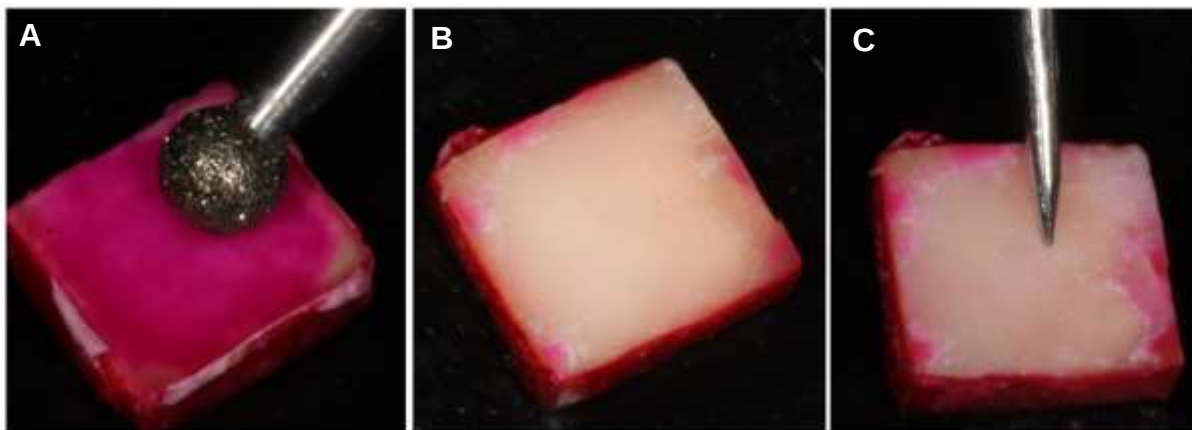
**Figura 28** – Sequência de aplicação do evidenciador de cárie. Evidenciador de Cárie (Revelacárie, ASFER) (A), espécime de dentina com presença de biofilme superficial e formação da lesão cariosa (B), aplicação do evidenciador de cárie (C), espécime coberto com evidenciador de cárie (D), enxágue abundante com água (E) e aspecto final do espécime de dentina após a aplicação do evidenciador de cárie (F).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Após a aplicação pela segunda vez, foi possível observar que o ultrassom descariador promoveu remoção conservadora, já que conseguiu remover toda a dentina infectada presente no espécime, preservando a dentina afetada. Isso é possível afirmar, pois o tecido remanescente não corou após a segunda aplicação. Além disso, após a realização de uma análise tátil e visual, era possível visualizar um tecido mais firme e amarelado, diferente do tecido dentinário hígido, o que sugere a presença da dentina afetada (Figura 29).

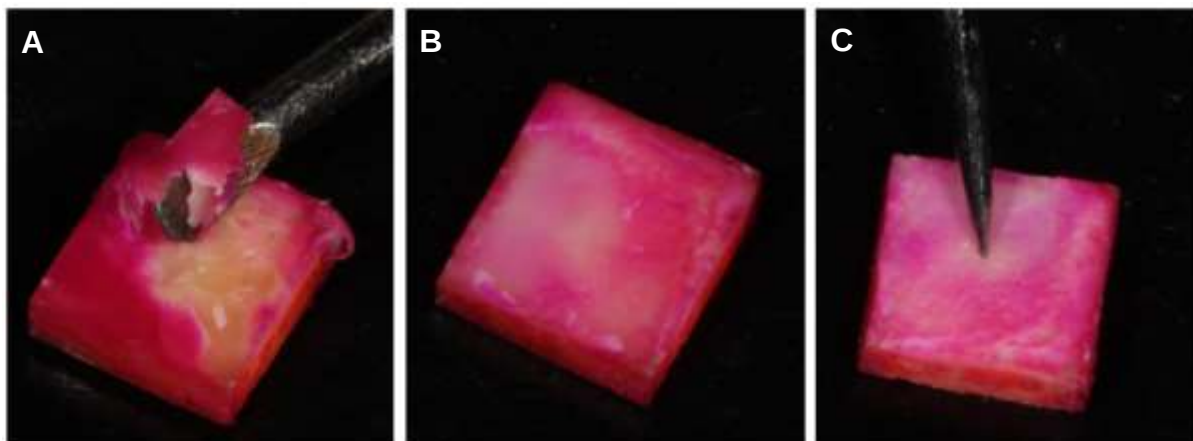
**Figura 29** – Sequência de remoção da lesão cariosa. Remoção da lesão com Ultrassom descariador (A), aspecto final do espécime após a remoção (B) e análise tátil da dentina remanescente com sonda exploradora (C).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

Quando aplicado o corante pela segunda vez nos espécimes em que foram removidos com cureta, foi possível observar grande quantidade de dentina infectada remanescente. Isso demonstra que durante o mesmo tempo de 1 minuto, não foi possível remover toda quantidade de dentina infectada com esta técnica. Dessa forma, comparando-se à técnica utilizando ultrassom descariador durante 1 minuto, o escavador de dentina (cureta) não foi eficiente, pois não removeu o tecido infectado presente no local. Além disso, esse resultado foi confirmado com a análise tátil e visual, já que ao realizar a sondagem, era possível detectar o tecido amolecido (Figura 30).

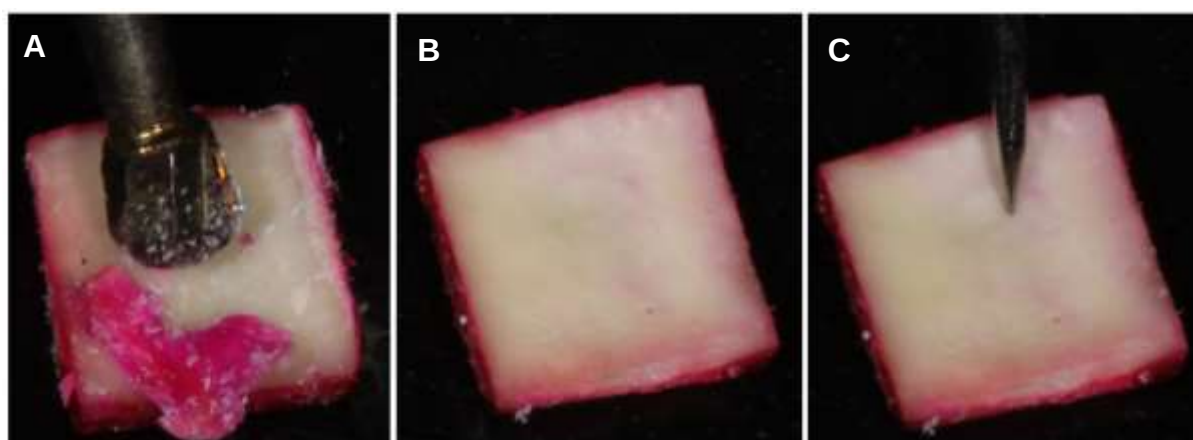
**Figura 30** – Sequência de remoção da lesão cariosa. Remoção da lesão com escavador de dentina (A), aspecto final do espécime após a remoção (B) e análise tátil da dentina remanescente com sonda exploradora (C).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

A remoção com fresa esférica em baixa rotação apresenta resultado diferente. Assim como, o escavador de dentina (cureta) não removeu tecido suficiente, a fresa esférica acabou removendo tecido em excesso durante 1 minuto. Isso é possível verificar após a segunda aplicação do corante, em que não se observou nenhuma região corada, no entanto, durante a análise tátil e visual, o tecido apresentava aspecto de dentina hígida (Figura 31).

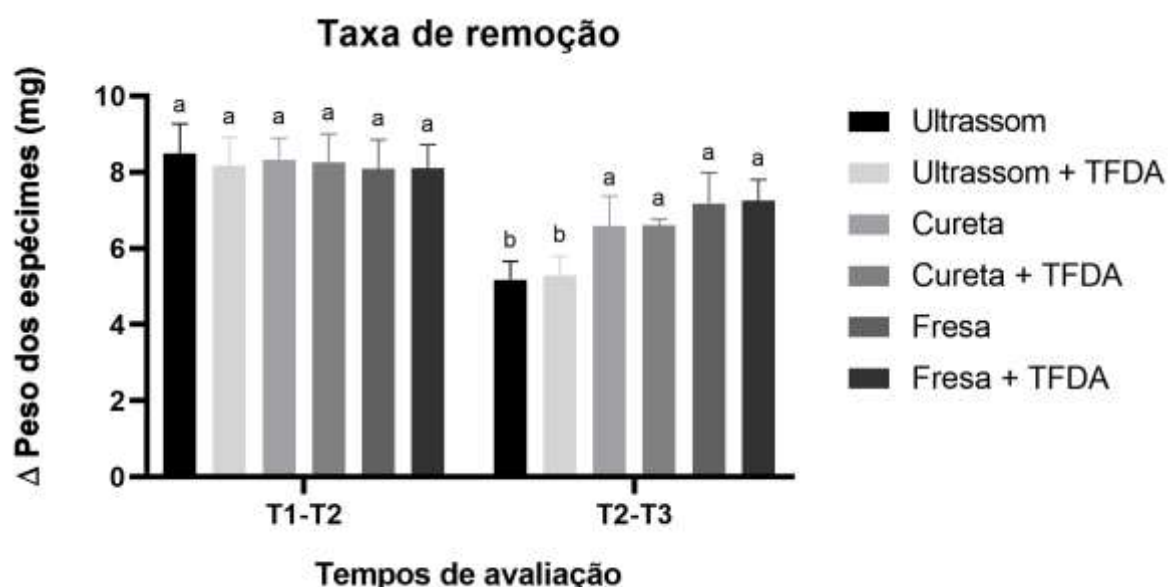
**Figura 31** – Sequência de remoção da lesão cariosa. Remoção da lesão com fresa esférica em baixa rotação (A), aspecto final do espécime após a remoção (B) e análise tátil da dentina remanescente com sonda exploradora (C).



**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

A fim de avaliar a eficácia do ultrassom descariador, foi realizado o cálculo da taxa de remoção. Os espécimes foram pesados em três diferentes tempos, sendo: T1: antes da indução da lesão de cárie, T2: após a indução da lesão de cárie e T3: após a remoção da lesão de cárie. A remoção da lesão cariosa ocorreu durante 60 segundos para todas as técnicas de remoção por único operador devidamente calibrado. Dessa forma, a Figura 32 mostra para as diferentes técnicas de remoção as diferenças de peso entre os tempos de avaliação (T1-T2 e T2-T3).

**Figura 32** – Médias e desvio padrão da diferença de peso do espécime (mg) de acordo com cada tempo de avaliação (n=10, N=60). T1 - antes do desenvolvimento da lesão de cárie artificial; T2 - antes da remoção da dentina cariada; e T3 - após a remoção da dentina cariada.



Letras minúsculas iguais no mesmo tempo de avaliação significam que não há diferença estatisticamente significante ( $p \geq 0,04$ ).

Letras minúsculas diferentes no mesmo período de avaliação significam diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,029$ ).

**Fonte:** Elaboração própria.

Todos os dados apresentaram normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk ( $p \geq 0,05$ ) e homocedasticidade por meio do teste F. Em seguida foram submetidos à análise de variância ANOVA a 2 fatores com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Após, foi realizado o pós-teste de Sidak para verificar em quais grupos estavam a diferença. Em relação aos tempos T1-T2 não houve diferença estatisticamente

significante entre os Grupos ( $p \geq 0,84$ ), o que já era esperado, visto que a indução da lesão de cárie foi realizada com o mesmo microrganismo e de forma padronizada. Já em relação aos tempos T2-T3, houve diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,029$ ). Foi possível verificar essa diferença entre os grupos: Ultrassom e Ultrassom + TFDA quando comparado aos grupos: Fresa, Fresa + TFDA, Cureta e Cureta + TFDA. Sendo possível afirmar que o método de remoção mais eficaz, foi o ultrassom, removendo menor quantidade de estrutura dental hígida.

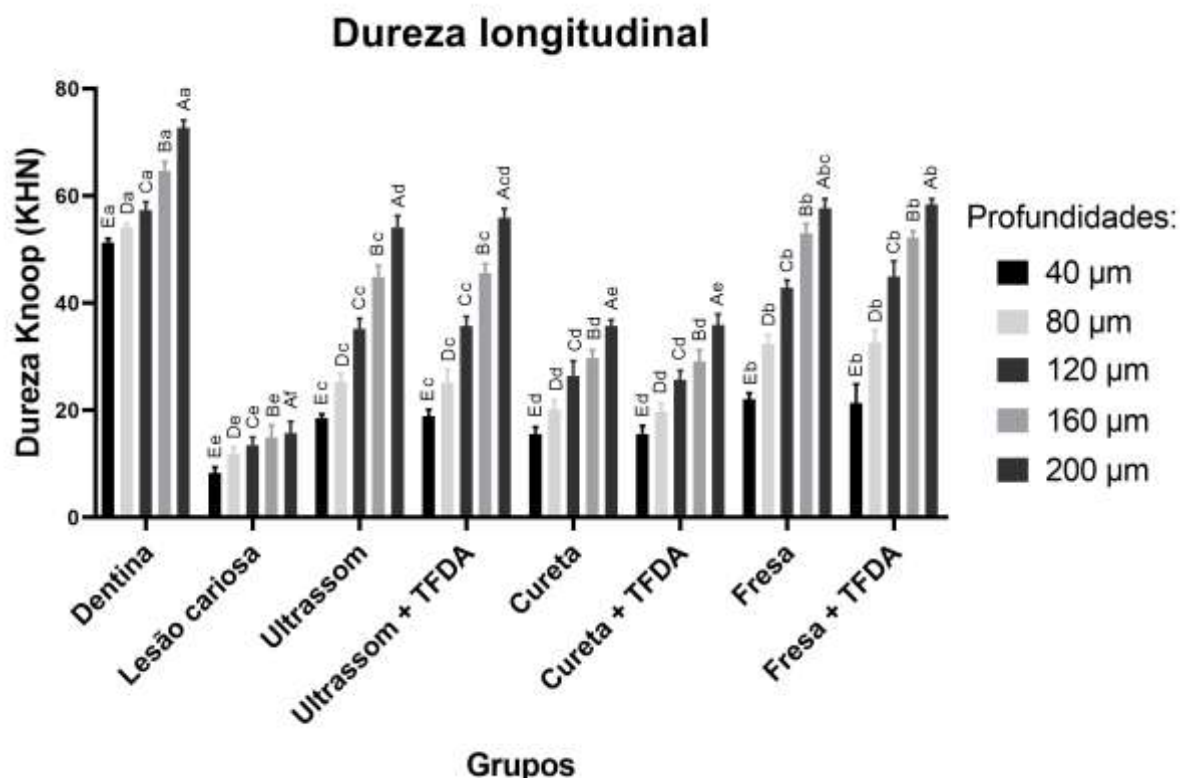
Os dados do teste de microdureza longitudinal apresentaram normalidade por meio do teste de Shapiro Wilk ( $p \geq 0,05$ ) e homocedasticidade por meio do teste F. Após, foram submetidos à análise de Variância a dois fatores com pós teste de Tukey.

Observa-se que a dentina hígida apresentou valores de microdureza significativamente maior quando comparado aos outros grupos. Já os espécimes com lesão cáriosa apresentaram valores muito baixos. Isso ocorre devido à desmineralização da dentina, causada pela formação da lesão de cárie, deixando o tecido amolecido. Os grupos que utilizaram o mesmo método de remoção e aplicaram TFDA não demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos que não aplicaram TFDA ( $p \leq 0,05$ ).

Considerando as diferentes técnicas de remoção, nas mesmas profundidades, quase em todos os grupos houve diferença estatisticamente significativa entre as técnicas utilizadas para remover a lesão cáriosa ( $p \leq 0,05$ ). Considerando profundidades diferentes em um mesmo grupo, houve diferença significativa em todas as profundidades ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 33).

Os espécimes que foram removidos com cureta, apresentaram valores de microdureza menores quando comparado às outras técnicas de remoção (ultrassom e fresa com ou sem TFDA), isso porque a cureta é um instrumento manual e a quantidade de tecido desmineralizado removido pode variar durante o procedimento. Os grupos tratados com ultrassom apresentaram microdureza maior quando comparado ao instrumento manual, a cureta, e menores quando comparado à fresa esférica. A técnica que faz uso do ultrassom realiza a remoção da lesão cáriosa de forma conservadora, preservando a estrutura dental hígida. Já os espécimes que foram removidos com fresa esférica em baixa rotação, apresentaram uma microdureza maior em todas as profundidades quando comparado às outras técnicas de remoção.

**Figura 33** – Médias e desvio padrão da microdureza longitudinal (KHN) de cada grupo. (n= 10, N=80).



Letras minúsculas diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre Grupos ( $p \leq 0,05$ ).

Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre profundidades ( $p \leq 0,05$ ).

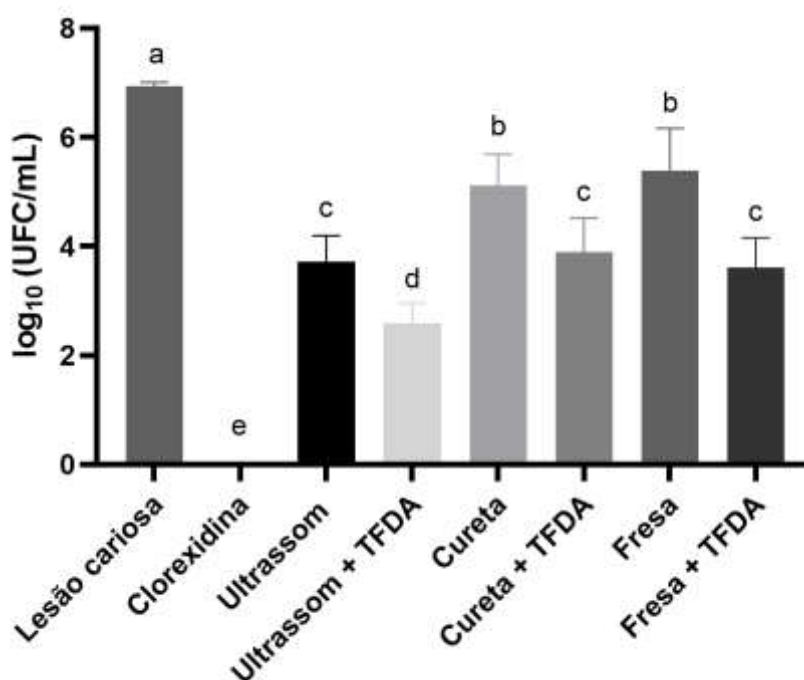
**Fonte:** Elaboração própria.

Adicionalmente, realizou-se a análise quantitativa de células viáveis por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) para avaliar o efeito antibacteriano da TFDA. Os valores foram transformados em  $\log_{10}$ . Os dados obtidos apresentaram normalidade por meio do teste de Shapiro Wilk ( $p \geq 0,05$ ) e homocedasticidade por meio do teste F. Após, os dados foram submetidos à análise de ANOVA a 1 fator com nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) e pós-teste de Tukey para comparação múltipla.

Foi possível observar que em todos os grupos tratados com TFDA após a remoção da dentina infectada, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado aos grupos que não eram tratados com TFDA ( $p \leq 0,01$ ). Além disso, a remoção da dentina infectada somente com ultrassom apresentou resultados iguais quando comparado aos outros grupos que foram tratados com TFDA (fresa + TFDA e cureta + TFDA), mostrando-se bastante eficaz para tratamento da lesão de cárie. Já em relação ao grupo ultrassom + TFDA, houve redução significativa quando

comparado ao grupo controle negativo (biofilme), apresentando redução de  $4,35 \log_{10}$  ( $p \leq 0,01$ ). O grupo controle positivo (clorexidina) promoveu completa redução de *Streptococcus mutans* presente na lesão de cárie (Figura 34).

**Figura 34** – Média e desvio padrão para os tratamentos empregados. (n=9, N=72).



Letras minúsculas iguais significam que não há diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,93$ ).

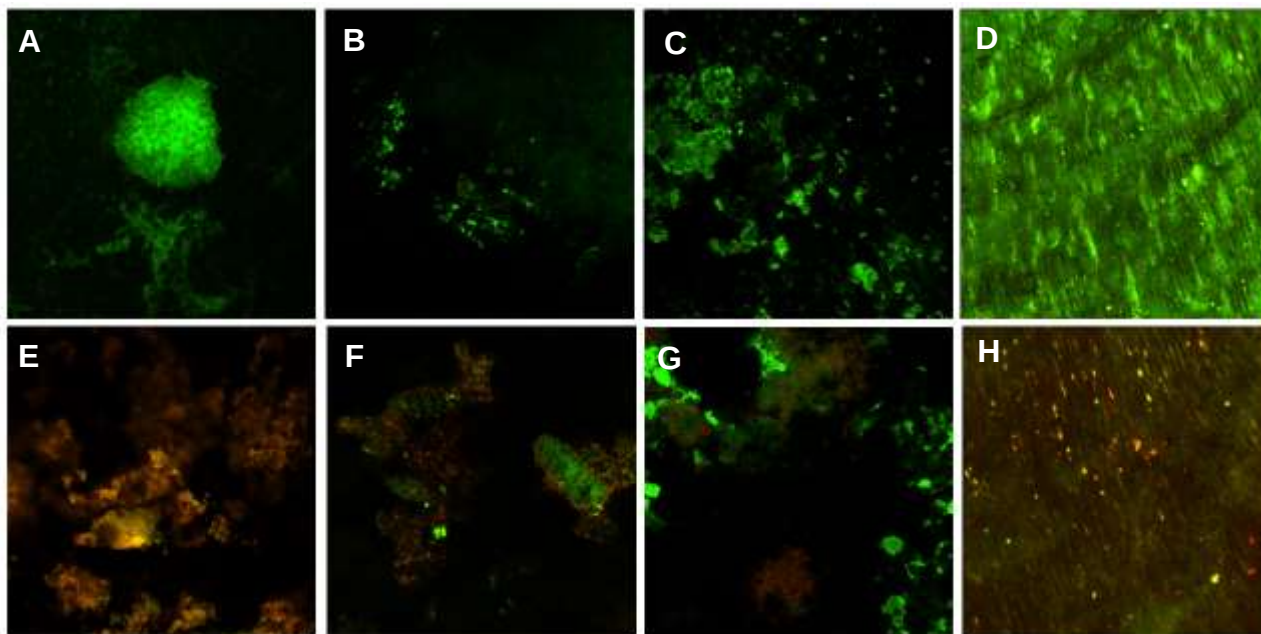
Letras minúsculas diferentes significam diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,013$ ).

**Fonte:** Elaboração própria.

A análise em microscopia confocal a laser foi realizada nos espécimes em dentina para todos os grupos experimentais (ultrassom, ultrassom + TFDA, cureta, cureta + TFDA, fresa e fresa + TFDA) e nos grupos controle positivo (clorexidina) e controle negativo (biofilme) (Figura 35 e 36). As imagens comprovam os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), onde se observa a presença de bactérias mortas nas imagens nos grupos em que foram realizados a aplicação de TFDA.

**Figura 35** – Imagens de microscopia confocal a laser da dentina (n=2, N=18).

Biofilme (A), escavador de dentina (B), fresa esférica em baixa rotação (C), ultrassom descariador (D), clorexidina (E), escavador de dentina + TFDA (F), peça de mão de baixa rotação + TFDA (G) e ultrassom descariador + TFDA (H).

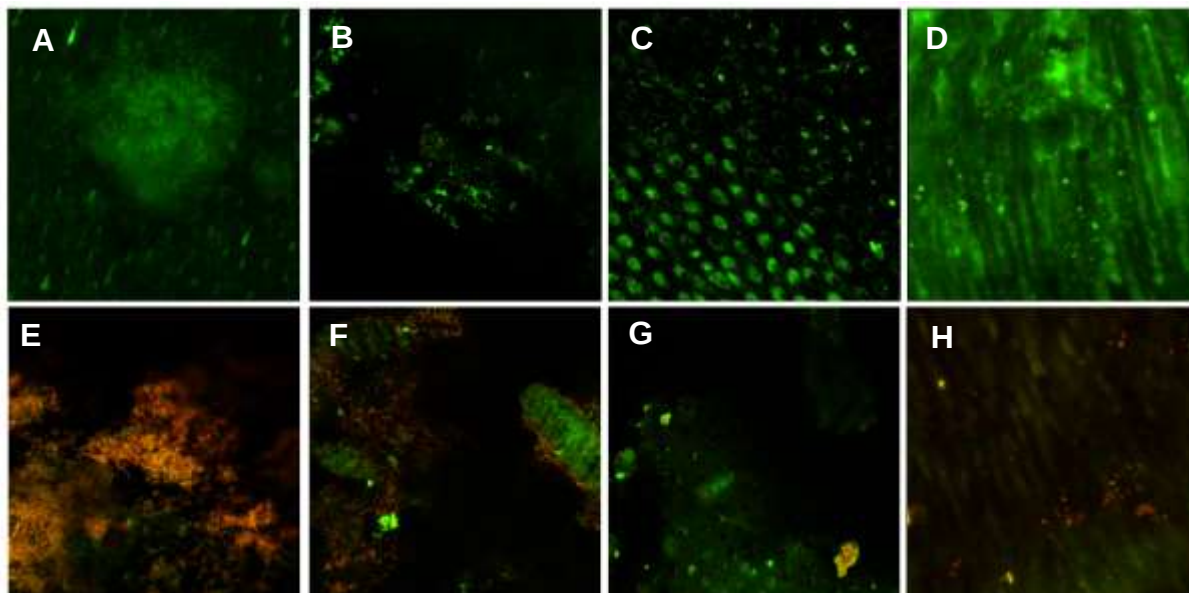


Imagens da dentina corada com LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability contendo SYTO 9 e o iodeto de propídio. Aumento de 40x.

**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

**Figura 36** – Imagens de microscopia confocal a laser da dentina (n=2, N=18).

Biofilme (A), escavador de dentina (B), fresa esférica em baixa rotação (C), ultrassom descariador (D), clorexidina (E), escavador de dentina + TFDA (F), peça de mão de baixa rotação + TFDA (G) e ultrassom descariador + TFDA (H).



Imagens da dentina corada com LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability contendo SYTO 9 e o iodeto de propídio. Aumento de 63x.

**Fonte:** Arquivo pessoal do autor.

## 6 DISCUSSÃO

Com o avanço da Odontologia minimamente invasiva, a remoção conservadora e ultraconservadora da lesão cáriosa tem sido cada vez mais realizada, preservando maior quantidade de estrutura dentária, reduzindo a quantidade de bactérias e permitindo a possibilidade de remineralização da dentina afetada<sup>23,72</sup>. Entretanto, apesar da remoção seletiva da lesão cáriosa promover benefícios, os microrganismos ainda permanecem, mesmo que em pequena quantidade, na dentina afetada após o tratamento restaurador<sup>66</sup>. É relatado na literatura, que a TFDA pode diminuir ou eliminar a presença desses microrganismos, sendo uma alternativa promissora aumentando a probabilidade de se desenvolver um tratamento bem sucedido<sup>64</sup>. Além disso, com o avanço da TFDA na odontologia, a aplicação da técnica para promover o controle da cárie dentária, tem ganhado atenção<sup>57,131</sup>.

A remoção conservadora da lesão cáriosa afeta o microambiente da lesão, diminui a quantidade de bactérias presente no local e conseqüentemente reduz a progressão da lesão, assim como as chances de exposição pulpar<sup>68</sup>. Por isso, é importante tanto o desenvolvimento de novos equipamentos que minimizem a remoção excessiva (limitando somente à remoção da dentina infectada), quanto de terapias antibacterianas que promovam a redução ou eliminação de bactérias remanescentes na dentina afeta.

As hipóteses nulas deste estudo foram rejeitadas. A remoção da lesão cáriosa utilizando ultrassom descariador apresentou menor taxa de remoção quando comparado à fresa esférica em baixa rotação. Além disso, a TFDA promoveu efeito antibacteriano em todos os grupos, especialmente no grupo utilizando ultrassom descariador para remoção da lesão cáriosa (Figura 34). É possível confirmar esses resultados por meio da análise de microscopia confocal, em que é possível visualizar a redução do *Streptococcus mutans* na dentina afetada (Figuras 35 e 36).

Considerando a importância no desenvolvimento e experimentação de novos equipamentos para a remoção conservadora da cárie dentária e em estratégias que auxiliem na descontaminação na camada de dentina afetada, promovendo controle antibacteriano, este estudo avaliou a eficácia do uso do ultrassom descariador por meio da taxa de remoção e da microdureza longitudinal após a remoção da camada de dentina infectada e a ação da TFDA mediada por curcumina na descontaminação da camada de dentina afetada.

É importante considerar que este estudo é o primeiro a testar um novo dispositivo ultrassônico (ultrassom descariador) desenvolvido especialmente para a remoção conservadora da cárie dentária, removendo somente a camada de dentina infectada. Dessa forma, o estudo desempenha papel importante para estimular o desenvolvimento de estudos futuros, com a finalidade de avaliar a eficácia do ultrassom descariador, o impacto que ele promove na estrutura dentária, na adesão aos tecidos dentários, nos procedimentos restauradores e consequentemente na longevidade da restauração. Além disso, a aplicação da TFDA após a remoção conservadora da cárie dentária está surgindo como uma intervenção complementar e promissora para descontaminação da dentina afetada.

Para o desenvolvimento das lesões cariosas, optou-se pelo modelo biológico, pois esse método é mais compatível para simular a cárie dentária, pois há presença do *Streptococcus mutans* na forma de biofilme e degradação do colágeno<sup>84</sup>. Além disso, o *Streptococcus mutans* foi a bactéria escolhida por desempenhar papel importante no desenvolvimento da cárie dentária<sup>82</sup>.

No entanto, antes de avaliar as técnicas de remoção e o efeito antibacteriano, os primeiros passos foram determinar o melhor solvente para solubilizar a curcumina, o tempo pré-irradiação mais adequado e as concentrações de curcumina que seriam utilizadas na TFDA. Para isso, realizou-se as análises para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).

Considerando a baixa solubilidade da curcumina em meio aquoso, é necessário realizar a sua incorporação em solventes orgânicos, tais como etanol e DMSO. Assim, estudos que aplicam a curcumina como fotossensibilizador utilizam esses solventes, pois melhoram sua biodisponibilidade<sup>165,179</sup>. Para melhorar ainda mais a biodisponibilidade da curcumina, estudos são realizados utilizando-se nanopartículas que auxiliam na solubilização da curcumina. Algumas dessas nanopartículas utilizadas são as nanopartículas poliméricas, conhecidas também como micelas poliméricas, que auxiliam na liberação controlada de fotossensibilizadores/fármacos<sup>160,161</sup>.

Entretanto, de acordo com os nossos resultados de CIM e CBM quando comparados a curcumina solubilizada pelo solvente DMSO e incorporadas às micelas de Pluronic® F-127, pôde-se observar que a curcumina incorporada às micelas de Pluronic® F-127 não apresentou efeito antibacteriano em nenhuma das concentrações testadas (270, 135, 67.5, 33.75, 16.875, 8.4375, 4.2187, 2.1093, 1.0546 e 0.5273 µM)

(Figura 23). Já a curcumina incorporada ao solvente DMSO mostrou-se adequada para a utilização nos experimentos na concentração de 67,5  $\mu$ M tanto para CIM (Figura 21), quanto para CBM (Figura 22) sem promover nenhum efeito tóxico em cultura planctônica. De acordo com nossos resultados, sugere-se que o fotossensibilizador precisa de um tempo maior para ser liberado das micelas e promover efeito antibacteriano, já que estudos na literatura relatam os efeitos antibacterianos que as micelas de Pluronic<sup>®</sup> promovem quando utilizando em biofilmes<sup>53,162,163</sup>. Além disso, é importante a realização de estudos que verifiquem se a curcumina está conseguindo ser liberada através das micelas para então penetrar na membrana bacteriana, já que o fotossensibilizador/fármaco precisa de um determinado tempo para ser liberado do interior das micelas.

Por isso, sugere-se que grande parte do fotossensibilizador deve ter permanecido no interior das micelas, não sendo liberado para o meio externo e consequentemente, não promovendo o efeito antibacteriano esperado em culturas planctônicas. Dessa forma, são importantes estudos que investiguem o tempo de liberação desse fármaco e como ele é realizado para que se tenha o efeito desejado.

Em relação ao tempo pré-irradiação (TPI), nossos resultados mostraram que a fotoinativação não era dependente do TPI para culturas planctônicas. Dessa forma, o aumento do tempo pré-irradiação, não reduziu a viabilidade celular para nenhuma das concentrações de curcumina testada, sendo ela incorporada às micelas de Pluronic<sup>®</sup> ou ao solvente DMSO (Figura 23). Nosso estudo está de acordo com o achado na literatura<sup>117</sup>. Por isso, o tempo pré-irradiação utilizado nos experimentos foi de 5 minutos<sup>42</sup>. Pensando na aplicabilidade clínica, um tempo muito longo, seria inviável, já que a aplicação seria realizada na cavidade bucal e poderia causar desconforto ao paciente pelo grande tempo de espera. Um estudo clínico utilizou a TFDA em dentina cariada, com tempo pré-irradiação de 5 minutos e observou que este tempo foi eficiente para realização do tratamento<sup>66</sup>.

Após a análise da CIM e CBM, realizou-se estudo piloto para identificar o melhor tempo para indução da lesão cáriosa, sendo 7, 10 ou 14 dias (Figuras 24, 25 e 26). Dessa forma, para verificar a formação e a profundidade da lesão, realizou-se a análise de microscopia de luz polarizada. A microscopia de luz polarizada tem sido bastante utilizada como método de investigação, com o objetivo de verificar se houve formação de maneira padronizada da lesão cáriosa<sup>58,180</sup>. De acordo com nossos resultados, foi possível observar que o tempo de 7 dias, foi capaz de formar lesão

cariosa em dentina (147,9  $\mu\text{m}$ ) (Figura 24). Nossos resultados estão de acordo com achados na literatura<sup>86,89</sup>.

Wu et al.<sup>89</sup> 2019, avaliaram o efeito inibitório de compósitos de nanopartículas utilizando modelo biológico com *Streptococcus mutans* para a indução da lesão cariosa, utilizou o tempo de 7 dias para a formação da cárie dentária e conseguiu observar que a lesão cariosa foi desenvolvida com sucesso a partir da formação de biofilme na superfície<sup>89</sup>. Já De Azevedo et al.<sup>86</sup> 2015, avaliaram o melhor protocolo para a formação de dentina cariada padronizada em função do tempo (7, 14 ou 21 dias). Além disso, eles verificaram que a lesão cariosa formada em um período de 7 dias é suficiente para a obter uma dentina cariada padronizada para realização de estudos laboratoriais<sup>86</sup>. Portanto, os espécimes de dentina foram submetidos à suspensão bacteriana por 7 dias para a formação da lesão cariosa.

Os modelos *in vitro* são geralmente utilizados quando muitas variáveis podem atrapalhar a coleta de dados<sup>174</sup>. Quando se utiliza modelos *in vitro*, uma ferramenta muito importante para investigar mecanismos que auxiliem no tratamento e prevenção de lesões cariosas é a indução de lesões cariosas artificiais em dentina<sup>181-183</sup>.

Dessa forma, nosso estudo utilizou espécimes de dentina bovina para a indução de lesões cariosas em dentina, no entanto, antes de realizar a indução dessas lesões, foi realizado a análise de microdureza Knoop superficial (KHN) nos 187 espécimes utilizados durante todo o estudo. A média obtida em nosso estudo foi de  $29,4 \pm 3$  KHN (Figura 27) e corresponde com os valores encontrado na literatura ( $29 \pm 6$  KHN)<sup>174</sup>.

Embora ainda existam polêmicas sobre a quantidade de tecido cariado a ser removido para impedir a progressão da cárie, a literatura mostra que o desgaste excessivo e desnecessário dos tecidos dentinários pode resultar em possível exposição pulpar<sup>31,69</sup>. Para evitar que isso aconteça, é benéfico que a camada de dentina parcialmente desmineralizada seja mantida, afim de preservar a vitalidade do tecido pulpar e estimular o processo de reparação, formando dentina terciária<sup>31</sup>.

Por isso, é importante seguir alguns princípios que auxiliem o operador durante a remoção do tecido cariado, sendo eles: preservar o tecido não desmineralizado e remineralizável e manter a saúde pulpar preservando a dentina residual (dentina afetada), evitando a exposição pulpar<sup>70</sup>. Apesar de não ser possível avaliar a espessura da dentina residual clinicamente, é importante a sua preservação para

evitar o desconforto pulpar do paciente. Isso porque, a exposição pulpar tem grande impacto no prognóstico do elemento dental a longo prazo<sup>71,73,184</sup>.

Dessa forma, visando a remoção seletiva da cárie dentária, técnicas para a abordagem minimamente invasiva estão sendo cada vez mais utilizadas<sup>93</sup>. Essas técnicas realizam a remoção seletiva do tecido cariado, remoção gradual ou remoção parcial da cárie<sup>70,93,94</sup>. No entanto, como é difícil a diferenciação clínica das diferentes dentinas cariadas, dificultando o trabalho do operador durante o procedimento, abordagens minimamente invasiva estão sendo desenvolvidas, como abrasão a ar, sonoabrasão, dispositivos ultrassônicos, métodos quimio-mecânico e laser<sup>91,97,98</sup>.

Os dispositivos ultrassônicos possuem uma energia de ultrassom com frequência de aproximadamente 20 kHz acima da audição humana e sua vibração é causada basicamente por dois métodos: piezoelétrico e magnético<sup>107</sup>. A vibração produzida pelo método piezoelétrico é provocada pela troca da carga elétrica, causando a deformação dimensional dos discos piezocerâmicos. Já o método magnético, promove alterações no campo magnético através da transferência de energia magnética elétrica em energia mecânica<sup>108</sup>.

O método piezoelétrico possui algumas vantagens quando comparado ao método magnético, sendo eles: vibração maior a partir de um movimento linear e eficiência maior na transferência de energia. A vibração linear promove modo de vibração preciso e a alta eficiência de transferência de energia diminui o aumento da temperatura e o consumo de energia durante o processo de transferência<sup>108</sup>.

O modo de vibração e a amplitude dos dispositivos ultrassônicos dependem do design da estrutura, morfologia, frequência e fonte de alimentação dos dispositivos<sup>104</sup>. A frequência dos dispositivos ultrassônicos utilizados atualmente em odontologia é de aproximadamente 25 a 40 kHz<sup>27</sup>. Para criar vibração adequada para a aplicação clínica, os dispositivos ultrassônicos devem apresentar estrutura e morfologia adequadas, com frequências correspondentes<sup>105</sup>.

A primeira utilização de um dispositivo ultrassônico na Odontologia foi para realizar um preparo cavitário por meio da abrasão<sup>110</sup>. Quando comparado aos outros dispositivos convencionais de alta e baixa velocidade, o dispositivo ultrassônico pode apresentar menor eficiência de corte, no entanto, eles apresentam corte seletivo e preciso, além de serem considerados como abordagem conservadora<sup>27,28</sup>.

O ultrassom descariador deste estudo utiliza o método piezoelétrico e possui frequência de 30 kHz. Além disso, esse equipamento demonstrou-se mais

conservador quando comparado às outras técnicas de remoção (cureta e fresa esférica em baixa rotação), confirmando a eficiência desse equipamento por meio da utilização da energia ultrassônica como uma ferramenta para a remoção da lesão cariosa<sup>102</sup>. Dessa forma, o ultrassom descariador pode ser um equipamento utilizado principalmente para remoção de lesões cariosas de forma conservadora, já que dentre suas vantagens estão a realização de corte preciso e seletivo<sup>27,28</sup>, diminuindo ainda mais as chances de exposição pulpar.

Para comprovar a presença de lesão cariosa, bem como o aspecto da dentina após a sua remoção, realizou-se a aplicação de evidenciador de cárie, com a finalidade de demonstrar a quantidade de tecido que foi removido por cada técnica (Figuras 28, 29 30 e 31). As imagens trouxeram resultados interessantes, que corroboram com a literatura e com os dados quantitativos obtidos neste estudo. É importante observar que em 1 minuto, a remoção da dentina cariada realizada pelas três diferentes técnicas é bem diferente.

Dessa forma, o resultado das imagens demonstra a remoção excessiva da dentina cariada pela técnica utilizando fresa esférica em baixa rotação (Figura 31), remoção deficiente quando utilizada a cureta (Figura 30) e remoção conservadora com o ultrassom descariador (Figura 29). Imagens que conseguem reproduzir o que a literatura relata quando se estudam novos dispositivos ultrassônicos com a finalidade de realização de procedimentos mais conservadores<sup>27,28</sup>.

Além disso, os resultados da taxa de remoção (Figura 32), mostram que o ultrassom descariador promoveu remoção conservadora da lesão cariosa, confirmando o resultado das imagens obtidas após a aplicação do evidenciador de cárie (Revelacárie, ASFER). O peso dos espécimes (mg) após a remoção com ultrassom (5,18 mg) é estatisticamente menor ( $p \leq 0,01$ ) quando comparado aos outros grupos (cureta e fresa esférica em baixa rotação) (6,59 e 7,18 mg respectivamente).

Após a remoção da dentina cariada, a microdureza longitudinal dos espécimes foi examinada utilizando um microdurômetro do tipo Knoop (Figura 33). O desenvolvimento da lesão cariosa por meio do método biológico durante 7 dias promoveu a redução dos valores de microdureza para todos os grupos quando comparado ao grupo de dentina hígida. O grupo que continha somente dentina hígida apresentou valores na região mais superficial (40  $\mu\text{m}$ ) de 51,3 KHN e de 72,76 KHN em uma profundidade de 200  $\mu\text{m}$ . Já o grupo em que continha apenas espécimes com lesões cariosas, o valor na profundidade de 40  $\mu\text{m}$  foi de 8,33 KHN e de 200  $\mu\text{m}$  foi

de 15,68 KHN, confirmando a desmineralização causada pela indução da cárie. Os dados do nosso estudo correspondem a achado na literatura, em que à medida que se aumentava a profundidade, aumentava também os valores da microdureza<sup>76</sup>. Além disso, os valores da microdureza da dentina hígida e da dentina cariada, utilizando o método biológico para indução da lesão cariosa, corroboram com os achados na literatura<sup>76,79</sup>.

A análise de microdureza longitudinal tem sido utilizada para avaliar se um determinado tipo de agente remineralizante promoveu aumento dos valores de microdureza longitudinal<sup>185,186</sup>. Além disso, essa análise também é utilizada para comparar métodos de indução e verificar qual é o mais adequado para a formação da cárie dentária<sup>76,79,174</sup>. No entanto, existem poucos estudos na literatura que realizam este tipo de análise para verificar se houve redução da microdureza após a remoção da lesão cariosa.

Com isso, levando em consideração todos os achados na literatura, os valores de microdureza do grupo com a lesão cariosa e sem remoção, apresentou valores baixos, o que sugere a presença de dentina infectada<sup>79</sup>. Já os grupos que foram removidos com ultrassom descariador, apresentaram valores de microdureza maiores quando comparado ao grupo de lesão cariosa e menores quando comparado à dentina hígida, principalmente à medida que se aumentava a profundidade. Com isso, sugere-se que houve a remoção completa da dentina infectada e preservação da dentina afetada remanescente.

Quando comparado aos espécimes que foram removidos com a fresa esférica em baixa rotação, os valores da microdureza aumentam, principalmente à medida que também se aumenta a profundidade. Dessa forma, esses valores quase se igualam aos valores da dentina hígida, sugerindo remoção excessiva da dentina cariada, não realizando uma remoção conservadora. Isso ocorre, pois a fresa esférica remove maior quantidade de tecido cariado, entretanto, ao remover o tecido cariado, ela remove também a dentina hígida e a dentina afetada, passível de remineralização.

No entanto, a remoção com cureta, mostra valores de microdureza diferentes quando comparados aos outros grupos que também realizaram a remoção da lesão cariosa. Esse grupo apresenta valores de dentina semelhantes ao que possui somente lesões cariosa, sugerindo que a cureta não consiga remover toda a dentina infectada em um mesmo período de tempo do que as outras técnicas utilizadas, sendo prejudicial à futura restauração.

Após a remoção conservadora de acordo com a técnica específica, realizou-se a aplicação de TFDA para verificar se houve diferença nos valores de microdureza. Entretanto, o nosso estudo mostrou que não há alteração nos valores de microdureza da dentina após a aplicação da TFDA. Apesar de não termos encontrado estudos na literatura sobre isso, o nosso estudo conseguiu demonstrar que a aplicação da TFDA não é prejudicial para a dentina, já que os valores obtidos são estatisticamente iguais aos grupos nos quais a TFDA não foi aplicada.

Considerando as limitações da remoção parcial e completa da lesão cariosa na eliminação de bactérias<sup>29</sup>, a TFDA está sendo utilizada como etapa complementar para promover efeito antibacteriano na dentina afetada e consequentemente, redução das bactérias residuais<sup>66</sup>. De acordo com a literatura, as chances de sucesso do tratamento após a redução ou eliminação dessas bactérias, são maiores<sup>135</sup>. Além disso, a TFDA é considerada como terapia complementar adequada e satisfatória para tratar lesões profundas de cárie dentinária, já que a aplicação, poderia diminuir rapidamente a carga bacteriana de microrganismos viáveis presente na dentina, contribuindo para o reparo tecidual dentário<sup>136</sup>.

Nesse estudo, a TFDA foi utilizada após a remoção da camada de dentina infectada como uma terapia complementar para promover a redução de bactérias remanescentes na camada de dentina afetada e demonstrou ser eficaz. Na literatura existe uma variedade de protocolos para aplicação de TFDA, quanto ao fotossensibilizador a luz a ser utilizada. Além disso, é importante levar em consideração os microrganismos e local (biofilme, cultura planctônica, cárie dentária, entre outros) que será utilizada a terapia<sup>66,120–122,179</sup>. No entanto, o protocolo utilizado neste estudo foi a aplicação da TFDA mediada por curcumina em lesão cariosa, já que a curcumina é de baixo custo e possui propriedades antineoplásicas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e esses efeitos são potencializados quando associados a luz<sup>123,151,152,154,187</sup>. Seu pico de absorção é de ~460 nm, equivalente ao LED azul<sup>188</sup>. Essa faixa de luz é muito utilizada na Odontologia durante procedimentos clínicos para realizar a fotoativação de materiais restauradores<sup>189</sup>.

Alves et al.<sup>66</sup> 2019, realizaram um estudo clínico em que avaliaram a aplicação da TFDA em dentina afetada e concluiu que houve redução de *Streptococcus mutans* remanescente presente na dentina afetada e que a TFDA não interferiu no sucesso da restauração, sendo uma terapia complementar promissora<sup>66</sup>. Dessa forma, é possível afirmar que nossos resultados estão de acordo com os achados deste estudo

clínico. Apesar de realizarmos um estudo *in vitro* em espécimes de dentina bovina, nossos dados de UFC/mL, mostraram que houve redução significativa nos grupos que receberam tratamento com TFDA quando comparado aos grupos que não receberam.

Ao realizar a análise quantitativa de células viáveis (UFC/mL), grupos controles foram adicionados ao estudo, sendo eles: espécimes com biofilme (controle negativo) e espécimes tratados com clorexidina (controle positivo) (Figura 34). Por isso, ao comparar o grupo controle negativo (biofilme) aos grupos que tiveram a camada de dentina infectada removida e após, a camada de dentina afetada receberam aplicação da TFDA (G4, G5 e G6), foi possível observar redução de:  $\sim 3 \log_{10}$ ,  $p < 0,001$  para o G4 (fresa esférica + TFDA) e G5 (cureta + TFDA) e  $\sim 4 \log_{10}$ ,  $p < 0,001$  para o G6 (ultrassom + TFDA). Já quando a comparação é realizada de acordo com as técnicas de remoção, é possível observar maior quantidade no número de bactérias nos grupos em que foram removidos com fresa esférica (G1) ( $5,38 \log_{10}$ ) e cureta (G2) ( $5,12 \log_{10}$ ) e quando comparado ao grupo que foi somente removido com ultrassom (G3) ( $3,71 \log_{10}$ ). Isso se deve ao fato, de o ultrassom descariador promover vibração adequada<sup>105</sup> e dessa forma realizar a expulsão dessas bactérias do tecido.

Após aplicação da TFDA, G6 apresentou quantidade de UFC/mL menor quando comparado a G4 e G5 (redução de  $\sim 2 \log_{10}$ ,  $p < 0,001$ ). Quando se comparou ao grupo em que apresenta lesão cáriosa (controle negativo), essa redução chega a  $\sim 4 \log_{10}$  ( $p < 0,001$ ), sugerindo uma vantagem à vibração adequada causada pelo ultrassom<sup>105</sup>, já que de acordo com os resultados anteriores (taxa de remoção e microdureza longitudinal), o ultrassom foi a técnica mais conservadora para a remoção de lesão cáriosa em dentina. O grupo no qual se aplicou a clorexidina (controle positivo), observou-se eliminação completa das bactérias presentes na dentina afetada. Nossos resultados diferem do encontrado na literatura, que no entanto, realizou a aplicação da TFDA em dentina infectada e não afetada<sup>20</sup>.

De acordo com uma revisão sistemática publicada por de Oliveira et al., 2019<sup>8</sup>, sugere a TFDA como uma terapia auxiliar para promover um efeito antibacteriano local, principalmente em bactérias responsáveis pela cárie dentária<sup>8</sup>, confirmando os resultados que obtivemos ao longo do estudo.

Uma análise qualitativa também foi realizada para confirmar os dados obtidos na contagem de UFC/mL. A análise em microscopia confocal (MC) demonstra a viabilidade bacteriana na camada de dentina afetada (Figura 35 e 36). A cor vermelha/alaranjada demonstra a morte bacteriana e a cor verde, demonstra as

bactérias que são viáveis (estão vivas)<sup>179</sup>. Por isso, nossos resultados estão de acordo com os obtidos na contagem de UFC/mL, já que é possível observar que os grupos que receberam aplicação da TFDA (G4, G5 e G6) após a remoção da dentina cariada, estão corados com a cor vermelha/alaranjada, confirmando que a TFDA promoveu efeito antibacteriano. Já os grupos que não receberam aplicação da TFDA após remoção da dentina cariada (G1, G2 e G3), demonstraram a presença de bactérias na dentina afetada, pois foram coradas em verde. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, em que a TFDA é uma terapia complementar para promover a redução de bactérias presente na dentina afetada<sup>66</sup>.

Dessa forma, o uso de dispositivos ultrassônicos associados à terapia complementar com aplicação da TFDA, pode modernizar os procedimentos minimamente invasivos na Odontologia Restauradora atual. Além disso, reduzir ainda mais as chances de exposição pulpar e chances de falhas pós-operatórias<sup>102</sup>. É importante ressaltar que esse estudo é o primeiro a utilizar um dispositivo ultrassônico específico para remoção da cárie dentária associado à TFDA como terapia complementar para redução de bactérias presentes na dentina afetada. Com isso, mais estudos são necessários para confirmar a eficácia desse novo equipamento e a utilização da TFDA como técnica complementar para auxiliar procedimentos restaurados futuros.

De acordo com uma revisão sistemática encontrada na literatura, a Odontologia minimamente invasiva tem crescido ao longo do tempo e o uso de dispositivos ultrassônicos pode ser uma ferramenta prática, aprimorando e expandindo a capacidade da Odontologia Restauradora atual<sup>190</sup>. Além disso, estudos clínicos que comparem a utilização desses dispositivos com os dispositivos convencionais são importantes.

Além dos resultados obtidos neste estudo e pelos achados na literatura, estudos clínicos são necessários para determinar os parâmetros apropriados para o uso da TFDA, bem como sua eficiência clínica para tratamento antibacteriano em dentina afetada ao longo dos anos.

Dessa forma, esse estudo possibilitou obter informações relevantes sobre a eficácia e viabilidade dos tratamentos e terapias empregadas, assim como pode ser capaz de encorajar a realização de ensaios clínicos futuros.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

- A concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) da curcumina foi de 67,5  $\mu$ M incorporada ao solvente DMSO.
- O tempo pré-irradiação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) foi de 5 minutos.
- O protocolo utilizado para a indução da lesão cáriosa por meio do modelo biológico utilizando *Streptococcus mutans* foi de 7 dias.
- O ultrassom descariador foi eficiente para a remoção de dentina cariada de forma conservadora, preservando maior quantidade de dentina hígida quando comparado às outras técnicas, apresentando menor taxa de remoção.
- O tratamento com a TFDA mediada por curcumina não interferiu nos valores de microdureza da dentina quando comparado aos grupos sem TFDA.
- A TFDA pode ser utilizada como terapia complementar, já que promoveu efeito antibacteriano na dentina afetada, reduzindo a quantidade de bactérias remanescentes.
- De forma geral, o ultrassom descariador foi eficiente, realizando remoção conservadora da cárie dentária e a TFDA pode ser utilizada como terapia complementar com a finalidade de reduzir as bactérias presentes na dentina afetada.

## REFERÊNCIAS\*

1. Mathur VP, Dhillon JK. Dental caries: a disease which needs attention. *Indian J Pediatr.* 2018;85(3):202–6.
2. Svensäter, G, Borgström, M, Bowden, G.H.W, Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial. *Caries Res.* 2003;37:395–403.
3. Conrads G, About I. Pathophysiology of dental caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1–10.
4. Lacerda Rangel Esper MÂ, Junqueira JC, Uchoa AF, Bresciani E, Nara de Souza Rastelli A, Navarro RS, et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and *Streptococcus mutans* biofilms for prevention of white spot lesions during orthodontic treatment: an in vitro investigation. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2019;155(2):243–53.
5. Scharnow AM, Solinski AE, Wuest WM. Targeting: *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. *Medchemcomm.* 2019;10(7):1057–67.
6. Bernimoulin J-P. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodont.* 2003;30:7–9.
7. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends in Microbiology.* 2018;26(3):229–42.
8. de Oliveira AB, Ferrisse TM, Marques RS, de Annunzio SR, Brighenti FL, Fontana CR. Effect of photodynamic therapy on microorganisms responsible for dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3585.
9. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019;7(1):1–26.
10. Azizi A, Shohrati P, Goudarzi M, Lawaf S, Rahimi A. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene blue on *Streptococcus mutans* bacterial colonies. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;27:203–9.
11. Misba L, Khan AU. Enhanced photodynamic therapy using light fractionation against *Streptococcus mutans* biofilm: type I and type II mechanism. *Future Microbiol.* 2018;13(4):437–54.
12. Kidd EAM. How ‘clean’ must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004;38:305–13.

---

\* 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-atualizado.pdf>

13. Nie M, Deng DM, Wu Y, de Oliveira KT, Bagnato VS, Crielaard W, et al. Photodynamic inactivation mediated by methylene blue or chlorin e6 against *Streptococcus mutans* biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020;31:101817. Epub 2020 Sept 20.
14. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res. 2011;90(3):294–303.
15. Young DA, Featherstone JDB. Caries management by risk assessment. Community Dent Oral Epidemiol. 2013;41(1):53–63.
16. Zhan L. Rebalancing the caries microbiome dysbiosis: targeted treatment and sugar alcohols. Adv Dent Res. 2018;29(1):110–6.
17. Kidd E. Infected dentine revisited. Dent Update. 2015;42:802–9.
18. Melo MAS, Rolim JPML, Passos VF, Lima RA, Zanin ICJ, Codes BM, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal linked for management of deep caries lesions. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015;12(4):581–6.
19. Fusayama, T, Therachima S. This section of the journal is devoted to rapidly published one page research notes differentiation of two layers of carious dentin by staining. J Dent Res. 1972;51(3):2015.
20. Wu M, Xu L, Cai Z, Huang S, Li Y, Lei L, et al. Disinfection of cariogenic pathogens in planktonic lifestyle, biofilm and carious dentine with antimicrobial photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 2020;96:170-7.
21. Aytac Bal F, Ozkocak I, Cadirci BH, Sirin Karaarslan E, Cakdinleyen M, Agaccioglu M. Effects of photodynamic therapy with indocyanine green on *Streptococcus mutans* biofilm. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;26:229–34.
22. Thompson V, Craig RG, Curro FA, Green WS, Ship JA. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal. J Am Dent Assoc. 2008;139(6):705–12.
23. Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation — a systematic review. J Dent. 2011;39(2):95–107.
24. Statement P. FDI policy statement on minimal intervention dentistry (MID) for managing dental caries: adopted by the general assembly: september 2016, Poznan, Poland. Int Dent J. 2017;67(1):6–7.
25. Akyuz S, Chousein (Ntemir) OM, Sacan O, Yanardag R, Kalaycı S, Yarat A, et al. Antibacterial and photodynamic effects of some plant extracts for cavity disinfection. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2019;26:48–52.

26. Celiberti P, Francescut A, Lussi P. Performance of four dentine excavation methods in deciduous teeth. *Caries Res.* 2006;40:117–23.
27. Plotino G, Pameijer CH, Maria Grande N, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod.* 2007;33(2):81–95.
28. Van Der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J.* 2007;40(6):415–26.
29. Cieplik F, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, Hiller KA, Maisch T, et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct for treatment of deep carious lesions — a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;18:54–62.
30. Melo MAS, de-Paula DM, Lima JPM, Borges FMC, Steiner-Oliveira C, Nobre-dos-Santos M, et al. In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria. *Laser Phys.* 2010;20(6):1504–13.
31. Guglielmi C de AB, Simionato MRL, Ramalho KM, Imparato JCP, Pinheiro SL, Luz MAAC. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt.* 2011;16(8):088003.
32. Neves PAM, Lima LA, Rodrigues FCN, Leitão TJ, Ribeiro CCC. Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1–8.
33. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014;32(3):415–25.
34. Cieplik F, Deng D, Crielaard W, Buchalla W, Hellwig E, Al-Ahmad A, et al. Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. *Crit Rev Microbiol.* 2018;44(5):571–89.
35. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* 2018;27(4):293–302.
36. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007;86(8):694–707.
37. Carrera ET, Dias HB, Corbi SCT, Marcantonio RAC, Bernardi ACA, Bagnato VS, et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Phys.* 2016;26(12):123001.
38. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, MacHado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011;43(9):927–34.
39. Li B, Li X, Lin H, Zhou Y. Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4508709.

40. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(2):96–101.
41. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(7):393–9.
42. 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.
43. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2007;21(3):293–302.
44. Piacquadio DJ, Chen DM, Farber HF, Fowler JF, Glazer SD, Goodman JJ, et al. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials. *Arch Dermatol.* 2004;140(1):41–6.
45. Terra Garcia M, Correia Pereira AH, Figueiredo-Godoi LMA, Jorge AOC, Strixino JF, Junqueira JC. Photodynamic therapy mediated by chlorin-type photosensitizers against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:256–61.
46. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res.* 2013;47(2):89–102.
47. Cheon K, Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci.* 2013;121:148–55.
48. Lynch DJ, Michalek SM, Zhu M, Drake D, Qian F, Banas JA. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein deletion mutants. *Oral Health Dent Manag.* 2013;12(4):191–9.
49. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:1–8.
50. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, et al. Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development in vivo. *Caries Res.* 2010;44(2):116–26.
51. Walter J. Loesche. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353–80.

52. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):471–80.
53. Chen F, Rice KC, Liu X-M, Reinhardt RA, Bayles KW, Wang D. Triclosan-loaded tooth-binding micelles for prevention and treatment of dental biofilm. *Pharm Res.* 2010;27(11):2356–64.
54. Bojanich MA, Calderón RO. *Streptococcus mutans* membrane lipid composition: virulence factors and structural parameters. *Arch Oral Biol.* 2017;81:74–80.
55. Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(6):2277–84.
56. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:17030.
57. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, Borsatto MC, Corona SAM. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. *Sci World J.* 2014;2014:824538.
58. Silva ARS, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res.* 2009;43(1):43–9.
59. Fontana M, Wolff M, Featherstone JD. Introduction to ICNARA 3. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):3.
60. Fontana M, Gonzalez-Cabezas C. Evidence-based dentistry caries risk assessment and disease management. *Dent Clin North Am.* 2019;63(1):119–28.
61. Manji F, Dahlen G, Fejerskov O. Caries and periodontitis: contesting the conventional wisdom on their aetiology. *Caries Res.* 2018;52(6):548–64.
62. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650–8.
63. Fontana M, Young DA, Wolff MS, Pitts NB, Longbottom C. Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):423–40.
64. Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha ACC, Ramalho KM, Mayer MPA, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015;20(10):108003.

65. Banerjee A, Frencken JE, Schwendicke F, Innes NPT. Contemporary operative caries management: consensus recommendations on minimally invasive caries removal. *Br Dent J.* 2017;223(3):215–22.
66. Alves LVGL, Curylofo-Zotti FA, Borsatto MC, Salvador SL de S, Valério RA, Souza-Gabriel AE, et al. Influence of antimicrobial photodynamic therapy in carious lesion. Randomized split-mouth clinical trial in primary molars. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:124–30.
67. Ferreira Zandona AG. Surgical management of caries lesions: selective removal of carious tissues. *Dent Clin North Am.* 2019;63(4):705–13.
68. Ricketts D, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(3):1–52.
69. Ricketts D, Kidd E, Innes NPT, Clarkson JE. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(3):274–6.
70. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):58–67.
71. Schwendicke F, Stolpe M, Meyer-Lueckel H, Paris S, Dörfer CE. Cost-effectiveness of one- and two-step incomplete and complete excavations. *J Dent Res.* 2013;92(10):880–7.
72. Orhan AI, Oz FT, Ozcelik B, Orhan K. A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. *Clin Oral Investig.* 2008;12(4):369–78.
73. Whitworth JM, Myers PM, Smith J, Walls AWG, McCabe JF. Endodontic complications after plastic restorations in general practice. *Int Endod J.* 2005;38(6):409–16.
74. Murray PE, Smith AJ, Windsor LJ, Mjör IA. Remaining dentine thickness and human pulp responses. *Int Endod J.* 2003;36(1):33–43.
75. Botelho JN, Villegas-Salinas M, Troncoso-Gajardo P, Giacaman RA, Cury JA. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm - caries model. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):1–8.
76. Pacheco LF, de Freitas ECB, Rodrigues E, Soares LES, Pascon FM, Correr-Sobrinho L, et al. Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. *Braz Dent J.* 2013;24(6):610–8.
77. Arends J, Ruben JL, Inaba D. Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. *Adv Dent Res.* 1997;11(4):403–14.

78. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. *J Dent Res.* 1984;63(10):1186–9.
79. Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009;54(12):1111–7.
80. de Carvalho FG, de Fucio SBP, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Braz Dent J.* 2008;19(2):139–44.
81. Rodrigues E, Delbem ACB, Pedrini D, Cavassan L. Enamel remineralization by fluoride-releasing materials: Proposal of a pH-cycling model. *Braz Dent J.* 2010;21(5):446–51.
82. Seemann R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet JF. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation - development and initial testing. *Caries Res.* 2005;39(3):185–90.
83. Marsh PD, Møter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):16–35.
84. De Campos PH, Sanabe ME, Rodrigues JA, Duarte DA, Santos MTBR, Guaré RO, et al. Different bacterial models for in vitro induction of non-cavitated enamel caries-like lesions: microhardness and polarized light microscopy analyses. *Microsc Res Tech.* 2015;78(6):444–51.
85. Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA. Validation of a cariogenic biofilm model to evaluate the effect of fluoride on enamel and root dentine demineralization. *PLoS One.* 2016;11(1):1–13.
86. De Azevedo CS, Garbui BU, Silva CME, Simionato MRL, De Freitas AZ, Matos AB. Obtaining artificially caries-affected dentin for in vitro studies. *J Contemp Dent Pract.* 2015;15(1):12–9.
87. Hettrich F, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Conrads G, Apel C. Evaluation of restorative materials containing preventive additives in a secondary caries model in vitro. *Caries Res.* 2019;53(4):447–56.
88. Mei ML, Li QL, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Antibacterial effects of silver diamine fluoride on multi-species cariogenic biofilm on caries. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12(1):1.
89. Wu R, Zhao Q, Lu S, Fu Y, Yu D, Zhao W. Inhibitory effect of reduced graphene oxide-silver nanocomposite on progression of artificial enamel caries. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:1–10.
90. Elderton RJ. New approaches to cavity design with special reference to the class II lesion. *Br Dent J.* 1984;157(12):421–7.

91. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J.* 2000;188(9):476–82.
92. Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc.* 1998;129(1):55–66.
93. Innes NPT, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing carious lesions: consensus recommendations on terminology. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):49–57.
94. Giacaman RA, Muñoz-Sandoval C, Neuhaus KW, Fontana M, Chalas R. Evidence-based strategies for the minimally invasive treatment of carious lesions: review of the literature. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(7):1009–16.
95. Bittencourt ST, Pereira JR, Rosa AW, Oliveira KS, Ghizoni JS, Oliveira MT. Mineral content removal after papacarie application in primary teeth: A quantitative analysis. *J Clin Pediatr Dent.* 2010;34(3):229–31.
96. Neves AA, Coutinho E, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Does DIAGNOdent provide a reliable caries-removal endpoint? *J Dent.* 2011;39(5):351–60.
97. Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Chemomechanical caries removal: a comprehensive review of the literature. *Int Dent J.* 2001;51(4):291–9.
98. Verma L, Pandit I, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M. Various methods of caries removal in children: a comparative clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007;25(2):93.
99. Avinash A, Grover SD, Koul M, Nayak MT, Singhvi A, Singh RK. Comparison of mechanical and chemomechanical methods of caries removal in deciduous and permanent teeth: a SEM study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012;30(2):115–21.
100. Abella F, De Ribot J, Doria G, Duran-Sindreu F, Roig M. Applications of piezoelectric surgery in endodontic surgery: a literature review. *J Endod.* 2014;40(3):325–32.
101. Apatzidou DA. Modern approaches to non-surgical biofilm management. *Periodontal Dis.* 2011;15:99–116.
102. Cianetti S, Abraha I, Pagano S, Lupatelli E, Lombardo G. Sonic and ultrasonic oscillating devices for the management of pain and dental fear in children or adolescents that require caries removal: a systematic review. *BMJ Open.* 2018;8(4):1–9.
103. Banerjee A, Kellow S, Mannocci F, Cook RJ, Watson TF. An in vitro evaluation of microtensile bond strengths of two adhesive bonding agents to residual dentine after caries removal using three excavation techniques. *J Dent.* 2010;38(6):480–9.

104. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. Vibration characteristics of ultrasonic scalers assessed with scanning laser vibrometry. *J Dent*. 2002;30(4):147–51.
105. Ahmad M, Roy RA, Kamarudin AG, Safar M. The vibratory pattern of ultrasonic files driven piezoelectrically. *Int Endod J*. 1993;26(2):120–4.
106. Sheets CG, Paquette JM. Ultrasonic tips for conservative restorative dentistry. *Dent Today*. 2002;21(10):102–4.
107. Laird WRE, Walmsley AD. Ultrasound in dentistry. Part 1-biophysical interactions. *J Dent*. 1991;19(1):14–7.
108. Chen YL, Chang HH, Chiang YC, Lin CP. Application and development of ultrasonics in dentistry. *J Formos Med Assoc*. 2013;112(11):659–65.
109. Moopnar M, Faulkner KDB. Accidental damage to teeth adjacent to crown-prepared abutment teeth. *Aust Dent J*. 1991;36(2):136–40.
110. Oman CR. Ultrasonic cavity preparation. *J Am Dent Assoc*. 1957;55(6):795–803.
111. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001;74(5):656.
112. Brovko L. Photodynamic treatment. a new efficient alternative for surface sanitation. *Adv Food Nutr Res*. 2010;62:119–47.
113. Ferro S, Ricchelli F, Monti D, Mancini G, Jori G. Efficient photoinactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a novel porphyrin incorporated into a poly-cationic liposome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):1026–34.
114. Mang TS, Mikulski L, Hall RE. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010;7(2):98–105.
115. Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. *Cent Eur J Biol*. 2010;5(4):400–6.
116. Sotomil JM, Münchow EA, Pankajakshan D, Spolnik KJ, Ferreira JA, Gregory RL, et al. Curcumin — a natural medicament for root canal disinfection: effects of irrigation, drug release, and photoactivation. *J Endod*. 2019;45(11):1371–7.
117. 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.
118. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1098–107.

119. Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. J BUON. 2018;23(3):561–7.
120. Gomez GF, Huang R, MacPherson M, Ferreira Zandona AG, Gregory RL. Photo inactivation of *Streptococcus mutans* biofilm by violet-blue light. Curr Microbiol. 2016;73(3):426–33.
121. Haag PA, Steiger-Ronay V, Schmidlin PR. The in vitro antimicrobial efficacy of PDT against periodontopathogenic bacteria. Int J Mol Sci. 2015;16(11):27327–38.
122. Fumes AC, da Silva Telles PD, Corona SAM, Borsatto MC. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: systematic review. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018;21:363–6.
123. Khorsandi K, Hosseinzadeh R, Shahidi FK. Photodynamic treatment with anionic nanoclays containing curcumin on human triple-negative breast cancer cells: Cellular and biochemical studies. J Cell Biochem. 2019;120(4):4998–5009.
124. Mello R, Martínez-Ferrer J, Alcalde-Aragonés A, Varea T, Acerete R, González-Núñez ME, et al. Reactions at interfaces: oxygenation of n-butyl ligands anchored on silica surfaces with methyl(trifluoromethyl)dioxirane. J Org Chem. 2011;76(24):10129–39.
125. Longo J, Lozzi S, Azevedo Cr. Oral cancer and photodynamic therapy as a treatment. RGO. Revista Gaúcha Odontol. 2011;59:51–7.
126. Zhu Z, Tang Z, Phillips JA, Yang R, Wang H, Tan W. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. J Am Chem Soc. 2008;130(33):10856–7.
127. Zhu TC, Finlay JC. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. Med Phys. 2008;35(7):3127–36.
128. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(6):2329–35.
129. Harris F, Pierpoint L. Photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid and its use as an antimicrobial Agent. Med Res Rev. 2012;32(6):1292–327.
130. da Mota ACC, Leal CRL, Olivan S, Gonçalves MLL, de Oliveira VA, Pinto MM, et al. Case report of photodynamic therapy in the treatment of dental caries on primary teeth. J Lasers Med Sci. 2016;7(2):131–3.
131. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. Clin Oral Investig. 2013;17(4):1113–25.
132. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. Trends Microbiol. 2015;23(2):76–82.

133. De Melo WCMA, Avci P, De Oliveira MN, Gupta A, Vecchio D, Sadasivam M, et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(7):669–93.
134. Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, José Dionisio E, Afonso Rabelo Buzalaf M, Cardoso Oliveira R, Andrade Moreira Machado MA, et al. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;24:102–8.
135. Wambier DS, dos Santos FA, Guedes-Pinto AC, Jaeger RG, Simionato MRL. Ultrastructural and microbiological analysis of the dentin layers affected by caries lesions in primary molars treated by minimal intervention. *Pediatr Dent*. 1999;29(3):228–34.
136. Diniz IMA, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MRL, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3):511–8.
137. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al. Photoantimicrobials — are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):e49–55.
138. Reis ACM, Regis WFM, Rodrigues LKA. Scientific evidence in antimicrobial photodynamic therapy: an alternative approach for reducing cariogenic bacteria. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;26:179–89.
139. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2005;79(2):159–70.
140. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev*. 2002;233–234:351–71.
141. Misba L, Zaidi S, Khan AU. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: role of singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2018;183:16–21.
142. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J*. 2016;473(4):347–64.
143. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*. 2011;16(6):4567–98.
144. Prasad S, Aggarwal BB. Turmeric, the golden spice: from traditional medicine to modern medicine. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; c2011. p.259-84.
145. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). TUMERIC post-harvest operations compendium. *Post-harvest Compendium*. 2004;21:1-21.

146. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Curr Sci*. 2004;87(1):44–53.
147. Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(12):533–48.
148. Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer. *Nutrients*. 2019;11(10):2376.
149. Negi PS, Jayaprakasha GK, Rao LJM, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem*. 1999;47(10):4297–300.
150. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2):141–53.
151. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*. 2005;223(2):181–90.
152. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*. 2014;19(12):20091–112.
153. Maghsoudi A, Yazdian F, Shahmoradi S, Ghaderi L, Hemati M, Amoabediny G. Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. *Mater Sci Eng C*. 2017;75:1259–67.
154. Schiborr C, Kocher A, Behnam D, Jandasek J, Toelstede S, Frank J. The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(3):516–27.
155. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787–809.
156. Shehzad A, Ha T, Subhan F, Lee YS. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr*. 2011;50(3):151–61.
157. Kocaadam B, Şanlıer N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(13):2889–95.
158. Cooksey CJ. Turmeric: old spice, new spice. *Biotech Histochem*. 2017;92(5):309–14.
159. Hope-Roberts M, Horobin RW. A review of curcumin as a biological stain and as a self-visualizing pharmaceutical agent. *Biotech Histochem*. 2017;92(5):315–23.

160. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic Med Chem.* 2009;17(8):2950–62.
161. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(13):3657–66.
162. Chen F, Liu XM, Rice KC, Li X, Yu F, Reinhardt RA, et al. Tooth-binding micelles for dental caries prevention. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(11):4898–902.
163. Chen F, Jia Z, Rice KC, Reinhardt RA, Bayles KW, Wang D. The development of dentotropic micelles with biodegradable tooth-binding moieties. *Pharm Res.* 2013;30(11):2808–17.
164. Liechty, W. B., Kryscio, D.R., Slaughter, B. V. and Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2010;1:149–73.
165. Capriotti K, Capriotti JA. Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2012;5(9):24–6.
166. Jamali Z, Hejazi SM, Ebrahimi SM, Moradi-Sardareh H, Paknejad M. Effects of LED-based photodynamic therapy using red and blue lights, with natural hydrophobic photosensitizers on human glioma cell line. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;21:50–4.
167. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000;(3):389–413.
168. Touma D, Yaar M, Whitehead S, Konnikov N, Gilchrest BA. A trial of short incubation, broad-area photodynamic therapy for facial actinic keratoses and diffuse photodamage. *Arch Dermatol.* 2004;140(1):33–40.
169. Alexiades-Armenakas MR, Geronemus RG. Laser-mediated photodynamic therapy of actinic keratoses. *Arch Dermatol.* 2003;139(10):1313–20.
170. Yin R, Hamblin M. Antimicrobial photosensitizers: drug discovery under the spotlight. *Curr Med Chem.* 2015;22(18):2159–85.
171. Carmona-Vargas CC, De Alves LC, Brocksom TJ, De Oliveira KT. Combining batch and continuous flow setups in the end-to-end synthesis of naturally occurring curcuminoids. *React Chem Eng.* 2017;2(3):366–74.
172. Limbago B. Clinical and laboratory standards institute standards development policies and process. *Clsi.* 2019;23(6):49.
173. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):1015–9.

174. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MAR, et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res.* 2013;47(2):162–70.
175. Momoi Y, Hayashi M, Fujitani M, Fukushima M, Imazato S, Kubo S, et al. Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy - evidence and consensus based report. *J Dent.* 2012;40(2):95–105.
176. Costa AR, Garcia-Godoy F, Correr-Sobrinho L, Naves LZ, Raposo LHA, de Carvalho FG, et al. Influence of different dentin substrate (caries-affected, caries-infected, sound) on long-term  $\mu$ TBS. *Braz Dent J.* 2017;28(1):16–23.
177. Corrêa FNP. Avaliação da dentina remanescente após remoção de cárie com instrumento cortante rotatório e métodos químicos-mecânicos, utilizando análise de microdureza, fluorescência laser e MEV [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.
178. Hara AT, Queiroz CS, Leme AFP, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res.* 2003;37(5):339–44.
179. Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, José Dionisio E, Afonso Rabelo Buzalaf M, Cardoso Oliveira R, Andrade Moreira Machado MA, et al. Curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy reduces the viability and vitality of infected dentin caries microcosms. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;24:102–8.
180. Lo ECM, Zhi QH, Itthagarun A. Comparing two quantitative methods for studying remineralization of artificial caries. *J Dent.* 2010;38(4):352–9.
181. Preston KP, Smith PW, Higham SM. The influence of varying fluoride concentrations on in vitro remineralisation of artificial dentinal lesions with differing lesion morphologies. *Arch Oral Biol.* 2008;53(1):20–6.
182. Pavan S, Xie Q, Hara AT, Bedran-Russo AK. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin- rich agent. *Caries Res.* 2011;45(5):443–7.
183. Okuyama K, Nakata T, Pereira PNR, Kawamoto C, Komatsu H, Sano H. Prevention of artificial caries: effect of bonding agent, resin composite and topical fluoride application. *Oper Dent.* 2006;31(1):135–42.
184. Bjørndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjældgaard M, Näsman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(3):290–7.
185. Contardo MS, Muñoz-Sandoval C, Giacaman RA. Sealing dentin caries with resin-modified glass ionomer decreases lesion progression and bacterial survival in an experimental model. *J Adhes Dent.* 2015;17(3):207–12.

186. Chinelatti MA, Tirapelli C, Corona SAM, Jasinevicius RG, Peitl O, Zanotto ED, et al. Effect of a bioactive glass ceramic on the control of enamel and dentin erosion lesions. *Braz Dent J*. 2017;28(4):489–97.
187. Maghsoudi A, Yazdian F, Shahmoradi S, Ghaderi L, Hemati M, Amoabediny G. Curcumin-loaded polysaccharide nanoparticles: optimization and anticariogenic activity against *Streptococcus mutans*. *Mater Sci Eng C*. 2017;75:1259–67.
188. Cusicanqui Méndez DA, Gutierrez E, Campos Chaves Lamarque G, Lopes Rizzato V, Afonso Rabelo Buzalaf M, Andrade Moreira Machado MA, et al. The effectiveness of curcumin-mediated antimicrobial photodynamic therapy depends on pre-irradiation and biofilm growth times. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;27:474–80.
189. Kaminaga Y, Nagatsu A, Akiyama T, Sugimoto N, Yamazaki T, Maitani T, et al. Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett*. 2003;555(2):311–6.
190. Ntovas P, Doukoudakis S, Tzoutzas J, Lagouvardos P. Evidence provided for the use of oscillating instruments in restorative dentistry: a systematic review. *Eur J Dent*. 2017;11(02):268–73.

## ANEXO A



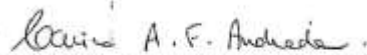
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **"USO DE ULTRASSOM ASSOCIADO À INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA NA REMOÇÃO DE LESÃO CARIOSA ARTIFICIAL EM DENTINA"**, registrada com o nº 33/2018, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Alessandra Nara Souza Rastelli** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 14/12/2018.

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica   |
| Vigência da autorização | Agosto/2020                          |
| Espécie/linhagem/raça   | Gado Nelore                          |
| Nº de animais           | 250 dentes                           |
| Peso/Idade              | 250 Kg/ 03 anos                      |
| Sexo                    | -                                    |
| Origem                  | Mondelli Indústria de Alimentos S/A. |

  
**Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**  
Coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 – ARARAQUARA – SP  
5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@foc.unesp.br - home page: <http://www.foc.unesp.br>

Scanned by CamScanner

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data da defesa.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 04 de agosto de 2020.**

**Priscila Borges Gobbo de Melo**