



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



João Felipe Besegato

Avaliação de dispositivo de ultrassom associado à terapia fotodinâmica e vidros bioativos na remoção, descontaminação e remineralização de lesões artificiais de cárie em dentina

Araraquara

2021



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



João Felipe Besegato

Avaliação de dispositivo de ultrassom associado à terapia fotodinâmica e vidros bioativos na remoção, descontaminação e remineralização de lesões artificiais de cárie em dentina

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, na Área de Dentística Restauradora

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

Araraquara

2021

B554a	<p>Besegato, João Felipe</p> <p>Avaliação de dispositivo de ultrassom associado à terapia fotodinâmica e vidros bioativos na remoção, descontaminação e remineralização de lesões artificiais de cárie em dentina / João Felipe Besegato. -- Araraquara, 2021</p> <p>142 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara</p> <p>Orientadora: Alessandra Nara de Souza Rastelli</p> <p>1. Ultrassom. 2. Fotoquimioterapia. 3. Cárie dentária. I.</p> <p>Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

João Felipe Besegato

Avaliação de dispositivo de ultrassom associado à terapia fotodinâmica e vidros bioativos na remoção, descontaminação e remineralização de lesões artificiais de cárie em dentina

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências Odontológicas

Presidente e orientador: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

2º Examinador: Profa. Dra. Michelli Alexandra Chinelatti

3º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade

4º Examinador: Dra. Caroline Coradi Tonon

5º Examinador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 15 de dezembro de 2021.

DADOS CURRICULARES

João Felipe Besegato

NASCIMENTO: 16/10/1993 – São João – Paraná

FILIAÇÃO: Edilson Besegato e Suzana Brusamarello Besegato

2011 – 2015: Graduação em Odontologia

Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

2016 – 2018: Mestrado em Clínica Odontológica

Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil.

2018 – 2021: Doutorado em Ciências Odontológicas

Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP), Araraquara, São Paulo, Brasil.

*Dedico este trabalho à minha família, amigos e a todos aqueles que de alguma
maneira tornaram este sonho possível.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conceder o dom da vida, por não me deixar desanimar e me manter firme nos meus propósitos. Sem a graça divina, de nada valeria um título de doutor.

Aos meus pais, **Edilson Besegato e Suzana Besegato**, o meu mais sincero e genuíno agradecimento. Desde que saí de casa para estudar, encontrei dificuldades, amadureci, me tornei cirurgião-dentista, mestre e agora doutor. Entretanto, nenhuma dessas conquistas ou títulos seriam possíveis, ou fariam sentido, sem o apoio incondicional que recebo de vocês. Por diversas vezes vocês renunciaram ao conforto e estabilidade para prover a mim o melhor possível. Sendo assim, nenhuma palavra ou agradecimento serão capazes de expressar a minha gratidão por tudo isso. De qualquer forma, preciso dizer que todas as minhas conquistas são consequências dos princípios, exemplos e ensinamentos que recebi de vocês. Por isso, obrigado por serem vocês, cada um a seu modo. Espero um dia retribuir cada incentivo, motivação, subsídio, palavras de carinho e gestos de amor. Pai, mãe... eu amo vocês com todo o meu coração, todos os dias de minha vida. Obrigado por tudo e por tanto.

Ao meu irmão, **José Vitor Besegato**, que mesmo tão diferente de mim, sempre me apoiou, entendeu e incentivou minhas escolhas. Desejo que o mundo descubra e reconheça a pessoa maravilhosa que és e o coração enorme que tens. Seu irmão te ama e estará contigo em todos os momentos.

Aos meus avós, **Euclides, Izaías, Leonira e Realda**. Obrigado por entenderem minha ausência durante todo este período. E principalmente, obrigado por serem exemplos de humildade, generosidade, carinho e admiração.

À toda a minha **família**, que sempre me apoiou incondicionalmente. Sou eternamente grato a Deus por tê-los em minha vida.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli**, pela orientação deste trabalho, pela confiança em mim depositada e por me ensinar a importância do comprometimento, da dedicação e da autossuficiência.

Ao **Magnífico Reitor Prof. Dr. Pasqual Barreti e Vice-Reitora Profa. Dra. Maysa Furlan** da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, representada pelo diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e pela vice-diretora **Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**, por oferecer estrutura física e de pessoal, assim como condições adequadas para a realização de nossas atividades.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**, representado pela coordenadora Profa. Dra. Andreia Bufalino.

À **Seção Técnica de Pós-Graduação**, pela atenção, empenho e organização dispendida para cada um dos discentes. Agradeço em especial ao assistente administrativo **Sr. Cristiano Afonso Lamounier**, pela gentileza, educação, empatia e solicitude com quem trata todos os discentes, sendo um exemplo de servidor público e ser humano.

A todos os **servidores** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, que se empenham diariamente de maneira primorosa para fornecer um ambiente de trabalho adequado.

À assistente administrativa do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **Sra. Creusa Maria Hortenci**. Minha querida e amada Creusa, obrigado pela convivência diária, pelos conselhos e palavras de amparo, por zelar do Departamento como se fosse sua casa, e por cuidar dos alunos como se fossem seus filhos. Você estará eternizada em meu coração pela sua sensibilidade, empatia, e talento nato em acolher. Obrigado por tudo e por tanto. Te amo!

Aos docentes da disciplina de Dentística Restauradora, **Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli, Profa. Dra. Andrea Abi Rached Dantas, Prof. Dr. Edson Alves de Campos, Prof. Dr. José Roberto Cury Saad, Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de**

Andrade, Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior, pelas oportunidades e convívio diário ao longo deste período.

A **todos os docentes** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por compartilharem seus conhecimentos e contribuir para o meu crescimento técnico-científico. Agradeço em especial à **Profa. Dra. Josimeri Hebling, Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, Profa. Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Paulo Cerri**, por me ajudarem e me incentivarem em momentos marcantes do doutorado.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara**, representado pela chefe Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli.

À **Profa. Dra. Andrea Abi Rached Dantas**, pela confiança em meu trabalho, por me dar a oportunidade de ministrar aulas durante o doutorado, e principalmente, pela humildade e empatia com quem trata a todos.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade**, por estimular e dar oportunidades da prática clínica.

À **Dra. Caroline Coradi Tonon**, que mesmo distante, me ajudou sempre que possível e de quem tenho um grande carinho. Você vai longe, Carol. Espero um dia lhe encontrá-la pessoalmente. Obrigado por aceitar o convite de fazer parte de minha banca avaliadora.

Ao **Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza**, por aceitar fazer parte da banca avaliadora. Mesmo não o conhecendo pessoalmente, estou certo que seu conhecimento e competência irão contribuir significativamente para a melhoria deste trabalho. Muito obrigado.

À **Profa. Dra. Michelli Alexandra Chinelatti**, pela agradável colaboração durante as reuniões do grupo de pesquisa e por aceitar o convite de fazer parte de minha banca avaliadora. Mesmo não a conhecendo pessoalmente, saiba que tenho uma grande admiração e respeito pela professora.

Ao **Prof. Dr. Adilson César Abreu Bernardi**, pelas contribuições ao longo do doutorado, principalmente nas bancas de pré-qualificação e qualificação. Obrigado pela maneira humilde, acessível e gentil que sempre me tratou.

À **Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon**, pelas contribuições em minha banca de pré-qualificação.

À **Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro**, por gentilmente emprestar o dispositivo para análise de microcislamento.

Ao técnico **Diego**, por dobrar os fios ortodônticos utilizados para indução de lesão de cárie.

À **Dra. Paula Aboud Barbugli**, por todo o suporte técnico nas análises de microscopia confocal, pela atenção e disponibilidade em ajudar, e principalmente, pela agradável companhia.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, pela confiança em mim depositada e por toda a ajuda e amparo que me deu sem qualquer obrigação.

Ao **Prof. Dr. Márcio Grama Hoepfner**, por ser meu maior exemplo profissional e incentivador. Meu eterno orientador, que se faz presente mesmo longe e continua me dando todo o suporte mesmo após o mestrado. Obrigado por acreditar, desde muito cedo, em meu potencial no ambiente acadêmico. Jamais serei grato o suficiente por todos os ensinamentos e ajuda. Espero um dia ser um profissional, e ser humano, tão bom quanto o senhor.

Ao **Laboratório de Análise Histopatológica para cortes não descalcificados** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, por permitir acesso para realização das análises de microscopia de luz polarizada.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) da Universidade de São Paulo (USP)**. Agradeço em especial ao **Laboratório de Pesquisa em Dentística**, à **Profa. Dra. Regina Guenka**

Palma Dibb, e à servidora **Patrícia Marchi**, por permitirem a utilização do microdurômetro.

Ao **Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ-UNESP)** e ao **Laboratório Multiusuário de Análises Químicas**, em especial aos servidores **Naira Canevarolo Pesquero** e **Alberto Camilo Alécio**, por todo o suporte técnico oferecido durante as análises de FT-Raman.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, em especial ao **Laboratório CMAF (Ciência dos Materiais Aplicada à Farmácia)**, por permitir o acesso e fornecer subsídios para preparação das micelas poliméricas.

Ao **Prof. Dr. Marlus Chorilli**, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), por confiar em meu trabalho e estar sempre disposto a ajudar com sua gentileza e humildade.

À mestre **Amanda Letícia Polli Silvestre**, por me dar oportunidades de participar em seus trabalhos e por ter se tornado uma grande amiga.

Ao amigo **Gabriel Garcia de Carvalho**, por sanar muitas dúvidas durante os meus experimentos. Não tenho dúvidas do seu sucesso profissional, pois ele será consequência da sua competência e dedicação.

À amiga **Vivian Tellaroli Minhaco**, com quem tive o prazer de conhecer melhor durante os empréstimos da Biotable. Sua simpatia, educação e generosidade me fizeram ser um grande admirador de sua pessoa. Que sua vida seja repleta das melhores coisas que este mundo possa oferecer.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP)**, em especial ao **Laboratório de Bioquímica**, e à técnica **Larissa Grizzo**, pelo suporte técnico durante as análises de microrradiografia transversal.

Ao **Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP)**, pelo desenvolvimento, fornecimento e manutenção do dispositivo de ultrassom. Agradeço especialmente ao **Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT)**, e aos servidores **Thiago Moretti** e **Paulo Estevão**, por sempre prestarem apoio técnico quando necessário.

Ao **Laboratório de Materiais Vítreos (LaMav) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)**, pelo preparo e fornecimento dos vidros bioativos. Agradeço em especial à **Dra. Marina Trevelin Souza**, pela atenção, solicitude e gentileza de sempre. Foi um grande prazer conhecê-la Marina, mesmo que virtualmente.

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.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2013/07276-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Aos colegas e amigos de pós-graduação, por tornarem o doutorado mais leve e feliz. Agradeço em especial aos amigos **Camila Lebre, Diego Dantas, Eran Almeida, Joatan Costa, Jessica Katarine, Lucas Portela, Thais Piragine, Juliana Proença e Lorena Gutierrez**. Levarei cada um de vocês em meu coração, assim como os momentos marcantes e felizes que vivemos.

Aos amigos **César Cuniyochi** e **Keli Frondaroli**, pela inesperada, porém agradável amizade. Entre treinos e exercícios, vocês ouviram meus desabafos, me aconselharam, e se tornaram pessoas especiais em minha vida.

Aos **alunos da graduação**, com quem tive a oportunidade de aprender e ensinar.

À minha inseparável amiga de infância, **Luana Pires Pinheiro**, que mesmo longe se fez presente. Obrigado por ouvir meus desabafos e torcer pelas minhas conquistas desde sempre. Que nossa amizade perdure e se fortaleça ao longo do tempo.

Às amigas de longa data, **Laiane Navarro, Nathana Wendy e Gabriella Sieni**, por continuarem me incentivando e me ouvindo. Meus presentes da graduação que guardo em meu coração independentemente de onde estiver.

À minha querida amiga **Básia Rabelo Nogueira**. Dona de uma personalidade única e coração imenso, você soube me ouvir, apoiar e ajudar. Sentirei saudade da sua companhia diária e até mesmo das implicações mútuas que dividíamos. Saiba que você ganhou um amigo para a vida. Obrigado!

À fiel colega de pesquisa e grande amiga, **Priscila Borges Gobbo de Melo**. Ninguém conhece melhor os caminhos percorridos ao longo do doutorado do que você, com quem dividi praticamente tudo. Você viveu e sentiu na pele cada dificuldade que tivemos que enfrentar. Mas você também comemorou comigo cada conquista. Obrigado pelas milhares de horas ao meu lado no laboratório, escrevendo artigos, realizando análises e tendo a paciência e humildade de ensinar e aprender. Pri, você é um ser humano lindo. Sua generosidade, paciência, comprometimento e competência me encantam. Eu não conseguiria ter feito nada disso sem a sua ajuda e companhia. Por isso, desejo que em todos os lugares que passar, ou que todas as pessoas que encontrar, saibam reconhecer e aproveitar todas as suas qualidades e competências. Saiba que sou eternamente grato pela amizade que construímos. Obrigado por tudo e por tanto.

Ao meu grande amigo, **Aryvelto Miranda Silva**. Estivemos lado ao lado desde o primeiro dia do doutorado, literalmente. Até chegar a este agradecimento, vivemos muita coisa juntos, e me orgulho de cada uma delas. Juntos percorremos terrenos desconhecidos, e muitas vezes desafiadores, que eu jamais iria percorrer sozinho. Obrigado por cada incentivo e conselho, mas principalmente por estar ao meu lado em todos os momentos. Orgulho de quem você é e de tudo aquilo que ainda irá se tornar. Estarei sempre aqui por você. Obrigado!

Alguns laços são tão fortes, bonitos e intensos, que ao tentar explicar, conseguimos apenas agradecer. Por isso, meu mais sincero agradecimento às inseparáveis e queridas amigas, **Joissi Ferrari Zaniboni e Tatiane Miranda Manzoli**. Vocês já

sabem da minha gratidão e carinho por tudo o que fizeram e pelo tanto que nossa amizade representa para mim. Por isso, quando ouvirem meu nome, peço que se lembrem de cada risada no sofá, de cada festa, de cada desabafo coletivo, de cada momento compartilhado. E após lembrarem, tenham a certeza que boa parte desta conquista e desta etapa de minha vida, eu devo a vocês, minhas grandes amigas. Obrigado por cruzarem meu caminho. Amo vocês.

Por fim, o meu mais sincero agradecimento a cada um que me ajudou a chegar até aqui e me fez enxergar claramente que não importa **o que** você tem na vida, mas **quem** você tem na vida.

Obrigado!

“Construirás os labirintos impermanentes que sucessivamente habitarás. Todos os dias estarás refazendo o teu desenho. Não te fatigues logo. Tens trabalho para toda a vida... Somos sempre um pouco menos do que pensávamos. Raramente, um pouco mais.”

Cecília Meireles*

* Meireles C. Retrato natural. São Paulo: Editora Global; 1949.

Besegato JF. Avaliação de dispositivo de ultrassom associado à terapia fotodinâmica e vidros bioativos na remoção, descontaminação e remineralização de lesões artificiais de cárie em dentina [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do uso de aparelho de ultrassom na remoção de tecido cariado, da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) na descontaminação da dentina e da aplicação de materiais bioativos na remineralização dentinária, assim como as influências dessas terapias na resistência adesiva, em lesões artificiais de cárie induzidas por modelo biológico. Espécimes de dentina bovina (4x4x2 mm) foram obtidos e aleatorizados em grupos de acordo com o método de remoção do tecido cariado: fresa (FR) ou ultrassom (ULT); método de descontaminação: com ou sem a aplicação de TFDA; e a aplicação de vidros bioativos para remineralização dentinária (45S5 ou F-18). Sendo assim, os espécimes foram aleatorizados em 14 grupos: cárie dentária (controle); dentina hígida (controle); FR; FR+TFDA; ULT; ULT+TFDA; FR+45S5, FR+F-18; ULT+45S5, ULT+F-18; FR+TFDA+45S5; FR+TFDA+F-18; ULT+TFDA+45S5; ULT+TFDA+F-18. Após os tratamentos, os espécimes foram avaliados por meio de microradiografia transversal, microdureza longitudinal, FT-Raman e microscopia confocal. Os dados foram submetidos à avaliação dos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade. Para comparação entre os grupos, ANOVA dois fatores seguido de pós-teste de Tukey foram utilizados em nível de significância de 5%. A análise das imagens de microscopia confocal foi realizada qualitativamente. De acordo com os resultados, a média da microdureza superficial dos espécimes foi de $40,86 \pm 8,74$ KHN. A microradiografia transversal revelou que a profundidade média das lesões foi de $213,9 \pm 49,5$ μ m. Já a porcentagem de perda mineral foi de 4929,3 %vol. μ m. A microdureza longitudinal evidenciou uma tendência geral em que a microdureza de um mesmo grupo aumenta em função da profundidade, independentemente do grupo avaliado ($p < 0,05$). Os grupos removidos com FR (24,40 – 63,03 KHN) apresentam dureza maior em comparação aos removidos com ULT (20,01 – 47,53 KHN), independentemente da profundidade ($p < 0,05$). Em geral, a TFDA não promoveu efeito significativo na microdureza ($p > 0,05$). Não houve diferença entre FR associada com 45S5 ou F-18 ($p > 0,05$). No entanto, na associação entre ULT e os vidros bioativos, diferenças mostram que F-18 apresentou valores maiores em relação ao 45S5. Os dados de FT-Raman mostram que para o componente fosfato não foi observado nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Já para o componente carbonato, na profundidade de 200 μ m houve diferença entre os grupos FR+TFDA e ULT+TFDA+45S5 (0,0355 e 0,0003 respectivamente ($p < 0,05$)). Quanto às ligações C-H, diferença significativa foi observada entre os grupos FR e ULT+TFDA (0,1869 e 0,0457 respectivamente ($p < 0,05$)), na profundidade de 40 μ m. A microscopia confocal revelou a eficácia da TFDA em inativar bactérias residuais. Os resultados de resistência adesiva evidenciaram que não houve diferença entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Falha do tipo adesiva foi predominante para a maioria dos grupos. Pôde-se concluir que a remoção com ULT é mais conservadora em relação a FR e a TFDA é eficaz como estratégia de descontaminação. Ambos os vidros mostraram resultados similares, embora alguns grupos tenham evidenciado melhores resultados para o F-18. Nenhuma das terapias influenciaram negativamente a adesão de materiais resinosos à dentina. Sendo assim, a abordagem combinada das

diferentes estratégias parece ser promissora e minimamente invasiva no tratamento da lesão de cárie em dentina.

Palavras – chave: Ultrassom. Fotoquimioterapia. Cárie dentária.

Besegato JF. Evaluation of ultrasound device associated with photodynamic therapy and bioactive glasses in the removal, decontamination and remineralization of caries-like dentin [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy of an ultrasound device to remove caries dentin, antimicrobial photodynamic therapy (TFDA) to decontaminate dentin and the application of bioactive materials to remineralize the dentin, as well as the influences of these therapies on bonding strength in artificial caries lesions. Bovine dentin specimens (4x4x2 mm) were obtained and randomized into groups according to the removal methods of caries dentin: bur (FR) or ultrasound (ULT); decontamination method: with or without the application of TFDA; and the application of bioactive glasses for dentin remineralization (45S5 or F-18). Thus, specimens were randomized into 14 groups: dental caries (control); sound dentin (control); FR; FR + TFDA; ULT; ULT + TFDA; FR + 45S5, FR + F-18; ULT + 45S5, ULT + F-18; FR + TFDA + 45S5; FR + TFDA + F-18; ULT + TFDA + 45S5; ULT + TFDA + F-18. After treatments, the specimens were evaluated by transverse microradiography, cross-sectional microhardness, FT-Raman and confocal microscopy. Data were submitted to the assessment of the assumptions of normality and homoscedasticity. For comparison between groups, two-way ANOVA followed by Tukey's post-test were used at a significance level of 5%. The analysis of confocal microscopy was performed qualitatively. According to the results, the surface microhardness mean was 40.86 ± 8.74 KHN. Transverse microradiography revealed that the average depth of the lesions was 213.9 ± 49.5 μm . The percentage of mineral loss was 4929.3% vol. μm . Cross-sectional microhardness showed a trend in which the microhardness of the same group increases as a function of depth, regardless of the group ($p < 0.05$). Groups removed with FR (24.40 - 63.03 KHN) have greater hardness compared to those removed with ULT (20.01 - 47.53 KHN), regardless of depth ($p < 0.05$). In general, TFDA did not have a significant effect on microhardness ($p > 0.05$). There was no difference between RF associated with 45S5 or F-18 ($p > 0.05$). However, in the association between ULT and bioactive glasses, F-18 showed higher values compared to 45S5. FT-Raman data show that for the phosphate component, no statistically significant difference was observed ($p > 0.05$). For the carbonate component, at 200 μm depth there was a difference between FR+TFDA and ULT+TFDA+45S5 groups (0.0355 and 0.0003 respectively ($p < 0.05$)). The C-H bonding revealed a difference between FR and ULT+TFDA groups (0.1869 and 0.0457 respectively ($p < 0.05$)), at 40 μm depth. Confocal microscopy images showed the effectiveness of TFDA in inactivating residual bacteria. No differences among the experimental groups were observed after microshear bond strength test ($p > 0,05$). Adhesive failure was the most predominant failure mode. It can be concluded that ULT removal is conservative, preserving caries-affected dentin. TFDA is effective as a decontamination strategy prior restoration. Both bioactive glasses showed similar results, although some groups have shown better results for F-18. Any of the experimental treatments negatively affected the adhesion to dentin. In conclusion, the combing approach using ultrasound, TFDA and bioactive glasses is promising to provide a minimally invasive treatment.

Keywords: Ultrasonics. Photodynamic therapy. Dental caries.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVO	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1 Doença Cárie Dentária	27
3.2 Remoção de Tecido Cariado	29
3.3 Modelos Artificias de Indução de Cárie	32
3.4 Instrumentação Cavitária	34
3.5 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)	38
3.6 TFDA no Tratamento da Doença Cárie	41
3.7 Vidros Bioativos	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Delineamento Experimental	48
4.2 Fase Inicial	50
4.2.1 Obtenção e preparo dos espécimes de dentina bovina	50
4.2.2 Seleção das bactérias e preparo da suspensão bacteriana padronizada	51
4.2.3 Método de preparação das micelas poliméricas	52
4.2.4 Fotossensibilizador e fonte de luz a ser utilizada para TFDA	54
4.2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida (CBM)	54
4.2.6 Indução da lesão de cárie artificial	56
4.2.7 Microradiografia transversal (MT)	59
4.2.8 Métodos para remoção e descontaminação do tecido cariado	61
4.2.9 Aplicação de vidro bioativo como agente remineralizante	64
4.3 Fase Experimental	65
4.3.1 Microdureza Knoop longitudinal	65

4.3.2 Microscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman)	66
4.3.3 Microscopia confocal de varredura a laser (MC)	68
4.3.4 Preparo dos corpos de prova em resina composta	69
4.3.5 Resistência adesiva	73
4.3.6 Padrão de falha	73
4.4 Análise Estatística	74
5 RESULTADOS	75
5.1 Fase Inicial	75
5.1.1 Microdureza Knoop superficial	75
5.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida (CBM)	75
5.1.3 Microradiografia transversal	77
5.2 Fase Experimental	79
5.2.1 Microdureza Knoop longitudinal	79
5.2.2 FT-Raman	83
5.2.3 Microscopia confocal a laser	85
5.2.4 Resistência adesiva	100
5.2.5 Padrão de falha	101
6 DISCUSSÃO	107
7 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS	122
ANEXO	142

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar-dependente que resulta na desmineralização dos substratos dentários. A produção de ácidos pelos microrganismos presentes no biofilme bacteriano compromete o equilíbrio do processo de desmineralização e remineralização¹⁻³, resultando na destruição/dissolução da estrutura dentária. Por ser uma das doenças orais mais prevalentes⁴, a etiologia, prevenção, controle e tratamento da doença cárie deve ser estudada, a fim de identificar e investigar fatores e terapias que contribuam na diminuição de sua prevalência nas populações.

Aproximadamente 700 a 800 espécies de bactérias têm sido identificadas na microbiota oral, tornando a cavidade bucal o meio com maior diversidade microbológica do corpo humano⁵. Essa complexidade propicia o desenvolvimento de biofilme devido a fatores como potencial hidrogeniônico (pH), localização dos dentes e tipo de substrato⁶. Idealmente, o biofilme e suas interações com fatores internos e externos são melhores estudados em seu ambiente natural.

Diferentes modelos de indução de cárie podem ser utilizados, os quais apresentam diferentes padrões de desenvolvimento da lesão de cárie⁷. O método químico utilizando gel/solução ácida^{8,9} ou solução tampão¹⁰ é comumente empregado no desenvolvimento de cárie artificial. Entretanto, esse método não é capaz de reproduzir o processo de desenvolvimento natural da cárie, como a presença de biofilme⁷. Para promover ambiente ácido e simular de maneira mais fidedigna às condições naturais do desenvolvimento da lesão de cárie¹¹, emprega-se o uso de microrganismos produtores de ácidos na indução de lesões artificiais. Conhecido como modelo biológico, sua utilização é pertinente devido à conhecida importância de alguns microrganismos, em especial o *Streptococcus mutans*, no desenvolvimento da cárie primária e cárie recorrente¹². Ainda mais fiel às condições naturais, o biofilme de microcosmo produzido a partir dos microrganismos presentes na saliva humana, possibilita alto número de espécies e interações entre elas¹³. Além do mais, modelos desse tipo permitem avaliar o efeito antimicrobiano ou anticariogênico de substâncias e/ou terapias ainda em testes iniciais¹⁴, em ambiente controlado e exposto a menor variabilidade.

O conceito de *odontologia minimamente invasiva* somado ao conhecimento atual sobre a doença cárie possibilitou a transformação do paradigma em relação ao

seu tratamento restaurador. Portanto, a preservação máxima de estrutura dentária hígida e passível de remineralização com o intuito de manter a integridade pulpar por meio da remoção parcial do tecido cariado, se tornou o tratamento restaurador de escolha¹⁵. Dessa forma, a otimização dos métodos convencionais de prevenção de cárie e o desenvolvimento de novas estratégias são fundamentais para a promoção da saúde bucal¹⁶.

Os métodos conservadores de tratamento de lesão de cárie preconizam a remoção da dentina infectada e preservação da dentina afetada, passível de remineralização¹⁷. Clinicamente, a diferenciação entre esses dois tipos de substratos dentinários é muito subjetiva, principalmente em lesões mais profundas. Tal limitação é capaz de promover a remoção excessiva e desnecessária do tecido afetado¹⁸. Um método alternativo à remoção mecânica e invasiva dos microrganismos presentes na lesão seria a possibilidade de erradicação ou redução dos patógenos com potencial cariogênico¹⁸.

A descontaminação cavitária têm sido proposta com o intuito de inibir o crescimento e proliferação bacteriana após a remoção seletiva de tecido cariado¹⁹. A substância antibacteriana mais utilizada para tal finalidade é a clorexidina¹⁹, que além de inibir a atividade bacteriana é capaz de inibir as metaloproteinases da matriz dentinária, prevenindo a degradação da camada híbrida e melhorando a adesão ao longo do tempo²⁰. No entanto, o uso da clorexidina como desinfetante cavitário está atrelado há alguns efeitos indesejáveis que restringem sua aplicação clínica. Xerostomia, alteração do paladar, descoloração da língua, descamação da mucosa, sensação de queimação, pigmentação do elemento dentário, aumento da formação de cálculo e desenvolvimento de reações alérgicas²¹⁻²⁴ são algumas das limitações relacionadas ao uso da clorexidina na prática clínica.

Considerando as limitações da clorexidina, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) apresenta-se como uma opção promissora e viável como técnica antibacteriana sobre patógenos cariogênicos, principalmente em lesões profundas^{18,25-28}. A reação fotodinâmica é baseada na associação entre uma droga, conhecida como fotosensibilizador (FS), e uma fonte de luz em comprimento de onda específico capaz de levar a molécula do FS a um estado excitatório²⁹. A absorção dos fótons pelo FS induz uma série de reações envolvendo a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio³⁰. Essas espécies altamente reativas são tóxicas e causam danos às proteínas, lipídios, ácido nucleico e outros componentes celulares

de microrganismos, assumindo papel importante no dano e morte celular dos mesmos³¹. Dessa forma, acredita-se que seja improvável que a TFDA promova resistência antibiótica das bactérias, já que nos microrganismos os radicais livres e espécies reativas de oxigênio interagem com várias estruturas celulares por meio de diferentes vias metabólicas^{1,32}. Além disso, esta técnica é altamente seletiva, pois apenas as células que interagem com o FS e são expostas à fonte de luz serão danificadas e levadas à morte celular^{33,34}. Sendo assim, a TFDA pode ser utilizada como uma estratégia de descontaminação cavitária sem promover resistência bacteriana e os efeitos indesejáveis da clorexidina.

Embora os lasers sejam muito utilizados para a sensibilização dos FS²⁶, os diodos emissores de luz (LED) representam uma fonte de luz alternativa e viável^{26,27}. Os dispositivos de luz LED têm como vantagens menor custo, tecnologia mais simples e possibilidade de serem configurados para diferentes funções²⁶.

Em geral, os FS são classificados como derivados ou não das porfirinas. Na odontologia, os FS mais utilizados são o azul de metileno e azul de toluidina. Recentemente, o composto fenólico natural curcumina, membro da família das curcuminoídes, tem apresentado grande potencial como FS devido ao seu potencial de absorver luz no espectro azul^{36,37}. Entretanto, ainda é pouco conhecido se os radicais livres liberados na reação fotodinâmica são capazes de afetar negativamente a interface adesiva³⁸ quando da restauração de cavidades com materiais adesivos após a remoção de tecido cariado.

As fresas de corte acopladas em instrumentos rotatórios são amplamente utilizadas na prática clínica para remover tecido cariado. No entanto, a remoção com fresa tende a promover remoção excessiva de tecido³⁹, dificultando uma abordagem conservadora por meio de uma remoção precisa e controlada. Considerando essas limitações, dispositivos que utilizam energia ultrassônica também podem ser utilizados para remover tecido cariado⁴⁰, apesar de poucos estudos relatarem seu uso e eficácia. Sendo assim, esse estudo apresenta um protótipo de aparelho ultrassônico descariador, com o intuito de permitir e facilitar a remoção conservadora do tecido cariado de maneira mais precisa.

Ainda no contexto da necessidade de uma abordagem conservadora e ao mesmo tempo que promova sucesso no tratamento da cárie, materiais bioativos como os biovidros tem sido utilizados como agentes dessensibilizantes e remineralizantes^{16,41}. Embora tenham sido inicialmente desenvolvidos para auxiliar e

melhorar a regeneração óssea⁴², a similaridade de composição entre o tecido ósseo e os tecidos duros do dente, levam a suposição de que os vidros bioativos podem ser eficientes na regeneração de esmalte e dentina⁴¹. Entretanto, a eficácia da remineralização e o tempo necessário para que isso ocorra, ainda necessitam de investigação⁴³.

Considerando o cenário exposto, não existem informações na literatura atual em relação ao uso de um dispositivo ultrassônico descariador com o intuito específico de promover a remoção conservadora do tecido cariado. Além disso, estudos prévios têm avaliado a eficácia da TFDA como agente antimicrobiano no tratamento de cárie^{18,26,27}. Adicionalmente, a eficácia da remineralização dos materiais bioativos⁴³ no tratamento de cárie e suas influências na adesão de materiais restauradores à dentina ainda necessitam de investigações. Dessa forma, esse estudo possibilita obter informações relevantes sobre a eficácia e viabilidade dos tratamentos/terapias empregadas, assim como pode ser capaz de encorajar a realização de ensaios clínicos futuros.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia de diferentes abordagens, combinadas ou isoladas, para tratamento de lesões de cárie em dentina. Avaliou-se um dispositivo de ultrassom para remoção de dentina cariada, a TFDA como estratégia de descontaminação de dentina e a aplicação de vidros bioativos para remineralização dentinária. A influência dessas abordagens na dureza e composição da dentina, na viabilidade celular bacteriana e na resistência adesiva à dentina foram também avaliadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações inibitória mínima e bactericida máxima a fim de determinar a concentração de fotossensibilizador a ser utilizado na aplicação da TFDA;
- Avaliar a profundidade das lesões e a perda mineral promovida pela indução artificial de cárie por meio de microradiografia transversal;
- Analisar a dureza Knoop superficial dos espécimes de dentina com o intuito de padronizar e selecionar os espécimes a serem utilizados nos experimentos futuros;
- Avaliar o efeito da associação entre remoção com ultrassom, aplicação de TFDA e materiais bioativos na microdureza longitudinal da dentina após os diferentes tratamentos;
- Avaliar a capacidade de remineralização dos vidros bioativos por meio das alterações no conteúdo orgânico e inorgânico da dentina após os diferentes tratamentos de remoção, descontaminação e remineralização por meio da análise de FT-Raman;
- Avaliar o impacto da TFDA na viabilidade celular por meio de análise de microscopia confocal;
- Avaliar se o emprego dos métodos de remoção, descontaminação e remineralização da dentina afetada por cárie influencia a resistência adesiva 24 horas após a confecção de corpos de prova em resina composta por meio de testes de microcisalhamento;

- Avaliar o padrão de falha da interface adesiva sobre a superfície dentinária após a fratura dos corpos de prova de resina composta por meio de imagens de microscopia ótica e ilustrá-las com imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença Cárie Dentária

De acordo com o último levantamento global, a cárie em dentes permanentes é a doença humana mais prevalente no mundo⁴. Devido a isso e com o avanço do conhecimento acerca do processo saúde-doença, importantes mudanças de paradigma ocorreram em relação aos conceitos etiológicos e fatores determinantes da doença cárie⁵. Dessa forma, o conceito de doença infecciosa e transmissível e focado principalmente no *Streptococcus mutans* foi substituído por um paradigma que enfatiza a interação ecológica-bacteriana na patogênese da cárie⁵.

No final do século XIX aceitava-se que a doença cárie era causada pelo crescimento inespecífico da placa bacteriana, também chamada de hipótese da placa inespecífica⁴⁴. De acordo com essa hipótese, a quantidade de placa bacteriana presente na cavidade bucal era determinante nos níveis de patogenicidade da doença, desconsiderando os diferentes níveis de virulência existentes entre os microrganismos da placa⁴⁴. Nesse sentido, recomendava-se a maior remoção mecânica possível da placa bacteriana como estratégia principal de controle e prevenção da doença cárie⁴⁵. Em meados do século XX, estudos utilizando modelo animal revolucionaram os conceitos etiológicos da doença cárie, proclamando-a como doença transmissível e infecciosa^{46,47}. Posteriormente, Loesche⁴⁸ (1976) publicou a hipótese da placa específica, postulando que a doença cárie era uma “infecção” causada por bactérias específicas da placa dentária⁴⁸. Como resultado, o diagnóstico, a prevenção e o tratamento da doença cárie foi por décadas baseado e focado no controle das bactérias do grupo *Streptococcus*⁴⁸.

Com o avanço do conhecimento, os conceitos e hipóteses relacionados à doença cárie foram revistos, alterados ou até mesmo refutados por meio da condução de pesquisas e obtenção de novas evidências científicas. Dessa forma, o conceito da cárie como doença infecciosa e de etiologia bacteriana específica é hoje inaplicável para doenças ocasionadas por comunidades microbianas, como a cárie dentária⁵. Embora a relação entre *Streptococcus* e doença cárie seja importante e inegável, ela é mais uma relação de associação do que de causa^{5,49}, já que indivíduos apresentando altos níveis de *Streptococcus* não necessariamente desenvolverão lesões de cárie.

Sendo assim, os conceitos atuais de etiologia e patogênese incluem a cárie dentária no grupo de doenças complexas ou multifatoriais, sem apresentar agente e/ou mecanismo causal único⁵⁰. Dessa forma, seu tratamento e prevenção devem ir além de estratégias de eliminação de tipos específicos de bactérias ou de aumento da resistência dos substratos⁵⁰.

Atualmente a cárie dentária é definida como uma doença endógena, dinâmica, mediada por biofilme, açúcar-dependente^{51,52} e influenciada por fatores biológicos, comportamentais, psicossociais e ambientais⁵³. A doença cárie desenvolve-se quando microrganismos acidogênicos e acidúricos da microbiota oral beneficiam-se ecologicamente de outras espécies microbianas promovendo o desequilíbrio do biofilme e o início do processo de instalação da doença⁵¹. Análises moleculares e microbiológicas têm demonstrado que diversas espécies microbianas, além do *Streptococcus*, podem contribuir no desenvolvimento e progressão da doença cárie em diferentes estágios, como os *Lactobacillus*⁵⁴. Até mesmo espécies fúngicas como *Candida albicans* são capazes de promover o aumento da virulência do biofilme cariogênico⁵⁵.

O processo de desenvolvimento da doença cárie envolve mudanças do microambiente bucal, culminando em respostas biológicas adaptativas. Em resumo, o biofilme sobre a superfície dentária, quando em uma condição de simbiose, apresenta acidificação leve. Entretanto, a presença frequente de açúcares, provenientes principalmente da dieta, acidifica o microambiente bucal, tornando-o propício para a colonização de bactérias acidogênicas e acidúricas. Estas alterações, ao longo do tempo, contribuem para o desequilíbrio do processo de desmineralização e remineralização, no qual a perda mineral é acentuada, levando ao início da formação da lesão de cárie⁵⁶.

De acordo com os paradigmas atuais, vêm sendo consensual a adoção de medidas preventivas e de tratamento que vão além das convencionais, com o intuito não apenas de interromper o processo de disbiose do biofilme da placa bacteriana, mas que contribuam também para a manutenção de uma microbiota diversa, em equilíbrio e saudável^{57,58}.

3.2 Remoção de Tecido Cariado

Quando o processo de desenvolvimento da doença cárie não é interrompido por algum motivo, a formação da seqüela da doença (lesão de cárie) é inevitável. A partir deste momento, estratégias curativas com o intuito de remover o tecido cariado e restaurar a forma e a função do elemento tornam-se necessárias, aliadas, claro, ao controle dos demais fatores envolvidos no processo de instalação e desenvolvimento da doença.

Embora pareça tecnicamente simples, o procedimento de remoção do tecido cariado é permeado por inúmeros desafios clínicos que vão desde a subjetividade dos parâmetros de remoção até em como este tecido deve ser removido e em que ponto a remoção deve ser cessada^{59,60}.

Para entender as mudanças de paradigmas e a evolução dos métodos e técnicas de remoção, faz-se necessário regressar aos ensinamentos de um dos fundadores da odontologia moderna, Greene Vardiman Black, publicados há mais de um século. Segundo ele, todo o tecido deveria ser removido durante o preparo cavitário a fim de atingir tecido hígido. Além disso, nos casos de lesões profundas a exposição pulpar seria mais desejável ao invés de deixá-la coberta por tecido amolecido (de alguma forma alterado pela doença cárie), confirmando assim a visão curativa, invasiva e tecnicista da época frente ao tratamento restaurador⁶¹.

Durante décadas a filosofia de Black permaneceu sendo praticada. Entretanto, na década de 70, estudos de Fusayama *et al.*^{62,63} identificaram a presença de duas camadas morfológicamente distintas na dentina cariada. A camada mais interna da dentina, também chamada de dentina afetada, apresentava baixa quantidade de microrganismos e alta capacidade de remineralização^{64,65}. Em contrapartida, a camada mais superficial, ou dentina infectada, era altamente infectada por microrganismos viáveis e apresentava desnaturação e desorganização tecidual irreversíveis^{66,67}. Com base nestas distintas morfologias e características das duas camadas, a remoção apenas da zona infectada e preservação da zona afetada durante a remoção da lesão vem sendo preconizada até os dias atuais⁶⁶⁻⁶⁸. Esta estratégia foi crucial para a evolução e alteração de como os cirurgiões-dentistas removiam o tecido cariado. Entretanto, ainda hoje dúvidas permeiam os clínicos no que diz respeito a que ponto a remoção deve ser interrompida e os parâmetros para a distinção clínica entre dentina afetada e infectada.

Alicerçada nos princípios da odontologia de mínima intervenção⁶⁹, as recomendações atuais no manejo da doença cárie encorajam uma abordagem baseada na causa da doença e com o objetivo de manter a função do elemento dentário e promover a saúde do indivíduo. O manejo eficaz da doença cárie caracteriza-se pela detecção de lesões em estágio inicial e diagnóstico preciso por meio da avaliação do risco e da atividade de cárie a fim de evitar a ocorrência de novas lesões⁵⁹. A patogenicidade da cárie como doença dependente do biofilme deve ser levada em consideração no manejo da mesma, unindo esforços em ações de controle e prevenção do biofilme ao invés de ações puramente curativas⁷⁰.

Nos casos de lesões já cavitadas, o tratamento deve objetivar o controle e restauração destas lesões por meio de uma abordagem minimamente invasiva. De modo geral, o tratamento deve ser calcado na inativação/controle do processo de desenvolvimento da doença; preservação máxima da estrutura dentária; evitar que o ciclo restaurador se inicie e novas restaurações sejam necessárias; e preservação do elemento dentário em boca pelo maior tempo possível⁵⁹.

Durante a remoção do tecido cariado, recomenda-se que o cirurgião-dentista preserve ao máximo tecido não desmineralizado e também aquele passível de remineralização (dentina afetada)^{71,72}. Além disso, o preparo cavitário deve apresentar margens em dentina hígida e/ou em esmalte, a fim de promover selamento adequado da restauração, controlando a lesão e inativando os microrganismos. Ao longo de todo o procedimento clínico, técnicas de manejo do paciente são recomendadas para evitar dor, desconforto, estresse e ansiedade, capazes de interferir no prognóstico, colaboração e aceitação ao tratamento^{59,70}.

No que diz respeito as técnicas de remoção do tecido cariado, podemos citar como principais as seguintes: não seletiva, seletiva e “*step-wise*”^{59,70}. Durante a remoção não seletiva, ou também chamada de remoção completa, toda a extensão da cavidade é removida seguindo os mesmos parâmetros e critérios. Nesta técnica, remove-se todo o tecido cariado até atingir dentina hígida, dura e aparentemente livre de bactérias. No entanto, atualmente não se recomenda a remoção não seletiva devido ao grande número de evidências científicas que consolidam esta técnica como sendo invasiva e que promove remoção tecidual desnecessária^{59,68,70,73,74}.

As técnicas de remoção seletivas são as mais recomendadas e seguem os princípios de mínima intervenção e preservação máxima da estrutura dentária. De acordo com a profundidade da cavidade, este tipo de técnica pode variar de duas

formas. Para cavidades rasas e médias, recomenda-se remover as paredes circundantes da cavidade até atingir dentina dura e resistente a ação de instrumentos cortantes manuais, enquanto que uma remoção menos invasiva é realizada na parede de fundo com o intuito de promover uma dentina remanescente firme, removida em “lascas”⁷⁰.

No entanto, em casos de cavidades profundas, o risco de exposição pulpar no momento da remoção da dentina da parede de fundo torna-se iminente. Nestes casos, tecido amolecido é deixado sobre a câmara pulpar, e a remoção é feita apenas nas margens cavitárias. Esta estratégia visa evitar a exposição e irritação pulpar, proporcionando a vitalidade da polpa, enquanto as paredes circundantes da cavidade em dentina dura e/ou esmalte hígido promovem selamento adequado e melhor prognóstico restaurador⁷⁰. Estudos clínicos, revisões sistemáticas e meta-análises têm evidenciado que as técnicas de remoção seletiva são efetivas em diminuir clínica e consideravelmente os riscos de exposição pulpar^{68,75,76}.

A técnica “*step-wise*” consiste na remoção completa do tecido cariado em dois momentos distintos com o intuito de controlar a progressão da lesão isolando os microrganismos do microambiente oral por meio de uma restauração provisória. Desta forma, o risco de exposição pulpar torna-se menos susceptível, já que o período entre as sessões clínicas visa estimular reações do complexo dentina-polpa, como a formação de dentina terciária e esclerose dentinária^{77,78}, criando uma barreira biológica e protegendo a câmara pulpar.

Embora a técnica “*step-wise*” possa ser realizada de maneira seletiva ou não-seletiva dependendo da forma como o tecido dentinário sobre a câmara pulpar é removido, é difícil estabelecer como a maioria dos procedimentos utilizando esta técnica são realizados⁷⁷. Além disso, necessidade de retorno do paciente, aumento do tempo operatório, falha da restauração provisória e exposição pulpar acidental durante a segunda intervenção são algumas das limitações relatadas^{75,78,79}. Embora tenha eficácia, têm-se destacado que não há necessidade de um novo acesso cavitário para evitar a exposição pulpar, sendo recomendado a remoção seletiva em sessão única^{75,77,80}.

Em resumo, as atuais evidências científicas encorajam o uso de técnicas de remoção seletivas com o intuito de evitar exposição pulpar e propiciar tratamento minimamente invasivo^{68,75,77,80-82}. Entretanto, fatores como avaliação microbiológica, qualidade e longevidade da restauração e deposição da dentina, parecem ser

similares independentemente da técnica de remoção utilizada^{77,81}. Vale ressaltar que a remoção seletiva pode impactar na adesão dos materiais restauradores a dentina, visto que a dentina afetada por cárie possui resistência adesiva menor em comparação à dentina hígida^{83,85}. Desta forma, a avaliação clínica, crítica e individual de cada caso pelo cirurgião-dentista, assim como sua capacidade técnica, assumem papel fundamental na escolha e execução da técnica de remoção do tecido cariado, impactando direta ou indiretamente no prognóstico restaurador e controle da doença cárie.

3.3 Modelos Artificiais de Indução de Cárie

A complexidade fisiológica e as inúmeras interações químicas e microbianas da cavidade bucal, assim como as limitações éticas e robustez metodológica relacionadas à experimentação animal e à condução de ensaios clínicos, encorajaram o estudo e desenvolvimento de modelos laboratoriais capazes de simularem as condições clínicas *in vivo* por meio de ambientes *in vitro* controlados⁸⁶⁻⁹⁰.

No entanto, diversos fatores relacionados ao substrato utilizado (humano ou bovino; hígido ou desmineralizado; esmalte ou dentina), característica e profundidade das lesões formadas, severidade e frequência do desafio cariogênico e microbiota podem influenciar no desenvolvimento e progressão da lesão artificial, resultando em variabilidade nos resultados experimentais^{7,11}.

Diferentes modelos *in vitro* de indução de cárie podem ser empregados. Entretanto, cada modelo simula as condições naturais de forma distinta e parcial, resultando em diferentes padrões de desenvolvimento das lesões⁷. O modelo químico é considerado um modelo estático de indução⁷, empregando soluções ácidas para promover a queda do pH e a conseqüente desmineralização do tecido dentário. De modo geral, o modelo químico propõe-se a reproduzir os episódios de desmineralização e remineralização, de maneira relativamente simples e fácil^{7,11}, por não necessitarem de muitos aparatos de pesquisa. No entanto, o modelo químico torna-se limitado por não conseguir simular todas as condições e fatores envolvidos no processo natural de desenvolvimento da lesão de cárie. Presença de biofilme, saliva e degradação colagenolítica são algumas das situações em que o modelo químico é incapaz de reproduzir⁷.

Como tentativa de superar as limitações do modelo químico e reproduzir de maneira mais fidedigna as condições naturais, o modelo biológico foi proposto. Neste modelo, microrganismos acidogênicos são utilizados para indução da lesão de cárie baseados no conhecido e importante papel do *Streptococcus mutans* no desenvolvimento tanto de lesões primárias quanto recorrentes^{12,91}. Embora o modelo biológico não reproduza as interações com o ambiente oral, como: presença de fluoretos, aspectos dietéticos, e quantidade e qualidade da saliva, este modelo reproduz adequadamente o ambiente ácido produzido pelo biofilme cariogênico.

No entanto, mimetizar todos os aspectos e condições clínicas é o grande desafio dos modelos de indução⁹². Idealmente, o modelo escolhido deve simular o potencial cariogênico e as alterações microbianas causadas por variáveis físicas e fisiológicas durante o desenvolvimento do biofilme⁹², assim como a habilidade em responder aos tratamentos e medidas preventivas utilizados na prática clínica⁸⁸. Além disso, as condições de crescimento das cepas de microrganismos utilizadas devem ser padronizadas, reduzindo a variabilidade nos resultados devido à distinta capacidade de adaptação fisiológica dos microrganismos em diferentes condições⁹².

Modelos *in situ* também vêm sendo utilizados para a formação de lesões de cárie semelhantes às lesões naturais. O modelo *in situ* aparenta ser promissor pelo fato de conseguir reproduzir as trocas minerais, fatores de virulência microbiana, potencial cariogênico da dieta e componentes da saliva⁷.

Considerando as limitações inerentes, os modelos de indução permitem um delineamento experimental flexível, maior facilidade no trâmite das questões éticas e logísticas, menor custo quando comparado aos ensaios clínicos, obtenção de resultados em menor tempo e maior reprodutibilidade dos mesmos, permitindo comparações por outros centros de pesquisa⁹³.

Sendo assim, a utilização de modelos de indução de lesões de cárie é essencial principalmente no desenvolvimento de estudos pré-clínicos⁹². Devido aos diversos modelos de indução propostos na literatura, torna-se complexo definir qual o melhor método para testar hipóteses específicas de pesquisa. No entanto, recomenda-se a escolha de métodos mais simples quando da condução de estudos experimentais iniciais e de métodos mais complexos e fidedignos quando da condução de estudos finais pré-clínicos previamente aos estudos *in situ* e ensaios clínicos⁹².

Vale ressaltar que cada modelo de indução apresenta limitações e distinções na maneira como simulam a complexidade do meio bucal, reproduzindo apenas

parcialmente os inúmeros eventos que ocorrem em condições *in vivo*⁹². Dessa forma, tais limitações devem ser consideradas com cautela na metodologia de pesquisa, assim como na extrapolação dos resultados obtidos. Adicionalmente, análises de microdureza, sobretudo longitudinal, e FT-Raman tem sido utilizadas para avaliar as características microestruturas, químicas e orgânicas da dentina⁹⁴⁻¹⁰¹.

3.4 Instrumentação Cavitária

A remoção do tecido cariado pode ser realizada com o auxílio de diferentes instrumentos ou agentes. Convencionalmente, a lesão de cárie é removida de forma mecânica por meio de instrumentos cortantes manuais (curetas e escavadores) e/ou fresas acopladas em turbinas de alta e baixa rotação^{102,103}. No entanto, nem sempre esses instrumentos possibilitam a instrumentação cavitária e remoção do tecido cariado pelo cirurgião-dentista de maneira discriminada, seletiva e conservadora, respeitando os princípios de odontologia minimamente invasiva. Sendo assim, instrumentos e técnicas alternativas como fresas poliméricas, abrasão a ar e agentes químicos têm sido sugeridas para promover uma remoção mais conservadora¹⁰⁴, visto que uma remoção menos invasiva é capaz de promover menor alteração térmica, menor vibração e desconforto ao paciente, assim como remoção apenas da dentina infectada¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

A fresa é o instrumento mais utilizado na prática clínica para remoção de tecido cariado e instrumentação cavitária. A produção em escala industrial de fresas data-se de 1891 e revolucionou o mercado odontológico, sendo confeccionadas em ligas metálicas¹¹⁰. No entanto, o descobrimento do processo de endurecimento do aço com carboneto de tungstênio em 1917 revolucionaria a indústria metalúrgica. Quatro décadas depois, este método foi aplicado na fabricação de fresas odontológicas com eficiente capacidade de corte e maior resistência à corrosão^{110,111}. As fresas atuais contém micropartículas de carboneto de tungstênio unidas a uma matriz de níquel-cobalto em sua ponta ativa, que por sua vez contém lâminas de corte em formato espiral com ou sem cortes transversais^{110,111}.

Durante o preparo cavitário e remoção do tecido cariado, recomenda-se o uso de fresas esféricas de diâmetro compatível ao da lesão e início de sua remoção pela dentina periférica em direção ao centro da lesão. Além disso, fresas de maior diâmetro são preferíveis para evitar exposição pulpar acidental¹¹². Ainda hoje as fresas

acopladas em turbinas de baixa rotação permanecem como o método mais eficaz de remoção de lesão de cárie no que diz respeito ao tempo operatório dispendido¹⁰². Em relação as características da dentina residual após a remoção com fresa, estudo empregando microscopia eletrônica de varredura evidenciou uma superfície dentinária com rugosidade uniforme, *smear layer* homogênea e túbulos dentinários visivelmente obstruídos¹¹³. Contudo, estudo empregando método de diagnóstico por fluorescência, demonstrou que a remoção com fresa tende a promover remoção excessiva de tecido³⁹.

Posteriormente, as características intrínsecas e limitações das fresas de carboneto de tungstênio impulsionaram o desenvolvimento de fresas com capacidade de remoção menos invasiva e mais seletiva. Neste sentido, fresas “plásticas”, confeccionadas em polímero com dureza (~ 50KHN) superior a dentina cariada (0 – 30 KHN) e inferior a dentina hígida (70 – 90 KHN)¹⁰⁸. Desta forma, sugeria-se que as fresas poliméricas removeriam apenas dentina infectada, preservando dentina afetada, assim como dispensaria a necessidade de anestesia local durante o procedimento. No entanto, embora as fresas poliméricas tenham diminuído a administração de anestesia local, queixas de sensibilidade e dor durante o procedimento continuaram a serem relatadas por pacientes¹¹⁴, somado também a sua vida útil reduzida. Além disso, estudos evidenciaram que cavidade removidas com fresas poliméricas apresentaram maior ocorrência de cárie recorrente, diminuição da resistência adesiva e presença de remanescentes do tecido cariado na interface dente/restauração quando comparadas com fresas de carboneto de tungstênio^{108,115}.

A filosofia de odontologia minimamente invasiva continuou encorajando o desenvolvimento de métodos alternativos, dando surgimento aos métodos químico-mecânicos de remoção. Neste sentido, solubilizantes químicos foram empregados com o intuito de agir seletivamente na dentina cariada¹¹⁶, removendo-a por meio da desproteinização. O agente químico mais utilizado para tal finalidade foi a solução de hipoclorito de sódio tamponada com uma mistura de aminoácidos contendo ácido aminobutírico, cloreto de sódio e hidróxido de sódio¹¹⁶. Embora o hipoclorito de sódio seja considerado um agente desproteinizante inespecífico, sua capacidade de remover seletivamente a dentina cariada foi atribuída ao efeito tampão da mistura de aminoácidos. Esse tamponamento reduz a ação do hipoclorito de sódio na dentina hígida ao mesmo tempo que aumenta o efeito de degeneração colagenolítica no interior da dentina cariada¹¹⁷. Como consequência da ação do hipoclorito e o efeito

sobre o colágeno, as fibrilas colágenas tornam-se mais friáveis e suscetíveis à remoção com instrumentos manuais (curetas)¹¹⁸. No entanto, esta primeira tentativa de remoção químico-mecânica não foi bem aceita clinicamente devido à ineficácia de remoção, dificuldade de manipulação e aplicação do agente na cavidade, meia-vida curta, aumento do tempo operatório e de custos do procedimento¹¹⁹.

Para superar as limitações da técnica, uma nova formulação foi introduzida no mercado. O Carisolv consiste em um gel contendo 0,5% peso/volume de hipoclorito de sódio, 0.1M de mistura de aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina) e água¹¹². Sua utilização consiste na aplicação do gel na cavidade e posterior remoção do tecido cariado com instrumentos manuais. O método tem sido eficaz na remoção de cárie e obtendo boa aceitação pelos pacientes, principalmente pediátricos^{120,121}. No entanto, sua utilização continua promovendo o aumento do tempo clínico em comparação com fresas convencionais, já que se repete a aplicação do gel e posterior remoção com curetas até que todo o tecido cariado seja removido¹²².

Embora o Carisolv apresente eficácia, grandes quantidades de bactérias residuais têm sido relatadas¹²³. No entanto, a viabilidade bacteriana aparenta ser baixa, visto que Carisolv apresenta atividade antibacteriana devido a formação de compostos a base de cloramina. Inclusive, Carisolv reduziu a quantidade de bactérias viáveis na dentina residual em comparação com a remoção com fresas convencionais^{120,124}.

Os sistemas de abrasão a ar para preparo cavitário utilizam energia cinética de partículas abrasivas (em geral de óxido de alumínio) para promover o desgaste da estrutura dentária de maneira conservadora, sendo utilizados principalmente para remoção de manchas nos dentes e preparo de cavidades rasas. Fatores como tipo e tamanho das partículas abrasivas, velocidade da partícula, ângulo de contato com a estrutura dentária e características intrínsecas do substrato em questão podem influenciar diretamente a eficácia de desgaste do sistema. No entanto, a principal desvantagem da abrasão a ar reside na sua maior eficiência em remover dentina hígida ao invés de dentina cariada¹²⁵. A menor eficiência de desgaste do tecido cariado é atribuída à sua consistência macia que parece absorver a energia das partículas, reduzindo o impacto e sua capacidade de desgaste¹¹². Embora ainda remova dentina hígida, o risco de remoção desnecessária foi reduzido devido à diferença na taxa de remoção entre dentina cariada e hígida¹²⁶.

A remoção de cárie por meio de dispositivos de ultrassom é baseada no uso de pontas de desgaste acopladas em dispositivos de alta frequência, os quais oscilam na região ultrassônica (25 – 40 kHz)¹²⁷. O tempo operatório dispendido para o preparo cavitário utilizando ultrassom é similar à instrumentação manual com curetas, porém maior em comparação com fresas convencionais³⁹. Com relação a eficiência de remoção, tem sido relatado que a sono-abrasão tende a proporcionar um preparo insuficiente da cavidade. Aparentemente a oscilação da ponta de corte é transferida como uma pequena vibração na superfície da estrutura dentária resultando em compactação do tecido cariado ao invés do corte³⁹. No entanto, outros estudos sugerem que a utilização de dispositivos de ultrassom promove uma remoção mais conservadora, facilidade de acesso, baixo ruído e alteração térmica e maior conforto ao paciente^{128,129}.

Com relação a morfologia da dentina residual após sono-abrasão, nenhuma alteração química ou estrutural foi encontrada, assemelhando-se às características da dentina residual após preparo com fresas convencionais¹³⁰. Além disso, avaliação topográfica de superfície evidenciou pequena ou até mesmo nenhuma formação de *smear layer*^{113,131}, o que pode favorecer procedimentos adesivos dependendo do sistema adesivo utilizado.

Vale ressaltar que a manipulação dos dispositivos de ultrassom requer conhecimento e habilidade do operador, sendo imprescindível a utilização por meio de movimentos firmes, constantes e exercendo leve força física^{111,132}. Esses procedimentos minimizam ou eliminam ruído, vibração, calor e pressão^{133,134}. Além do mais, estudo prévio relatou que dispositivos de ultrassom promovem aumento similar da temperatura pulpar em comparação com fresas convencionais em alta rotação. No entanto, o tempo necessário para preparo da cavidade utilizando ultrassom foi quatro vezes maior¹³⁵.

Embora minimamente invasivo, algumas limitações são associadas aos dispositivos de ultrassom, como: aparente ineficiência em remover tecido cariado amolecido¹³⁶, sendo necessária a utilização adicional de instrumentos manuais^{137,138}; custo elevado do dispositivo de ultrassom e das pontas ultrassônicas¹³⁷; e a imprescindível necessidade de treinamento do operador previamente à utilização do dispositivo.

Atualmente há uma escassez de estudos com o intuito de desenvolver e investigar a eficiência de dispositivos de ultrassom com a finalidade de remoção de

tecido cariado. Além disso, uma revisão sistemática apontou a necessidade de estudos bem conduzidos a fim de aprimorar as recomendações de instrumentos oscilatórios, como os dispositivos de ultrassom, para a remoção de tecido cariado¹³⁹.

3.5 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA)

De acordo com o exposto anteriormente, a cárie dentária é uma doença progressiva, biofilme-açúcar-dependente e que caso não controlada, pode resultar na perda mineral do esmalte e consequente cavitação do elemento dentário⁵³. O biofilme consiste em uma complexa comunidade microbiana multiespécies envolta por uma matriz extracelular e desempenha papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença^{140,141}. As comunidades bacterianas do biofilme da placa são aderidas a superfície e revestidas pela altamente hidratada matriz extracelular de polissacarídeos, que torna os microrganismos tolerantes às terapias antibacterianas convencionais¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Relata-se que o *Streptococcus mutans* desempenha papel importante na virulência do biofilme cariogênico por meio da sua capacidade de adesão às superfícies¹⁴⁵, formação do biofilme¹⁴⁶, uso da sacarose para criação de ambiente ácido¹⁴⁷ e síntese de polissacarídeos extracelulares por ação de enzimas glicosiltransferases^{148,149}. Esses fatores contribuem para a manutenção da integridade e estabilidade da estrutura do biofilme, dificultando o seu controle e inativação. Além do mais, considerando a importância do biofilme na patogenicidade da doença cárie, estratégias adicionais de controle do biofilme podem potencializar o efeito e melhorar o prognóstico terapêutico.

Com o advento da odontologia minimamente invasiva e os conhecimentos acerca da etiologia da doença cárie, têm sido preconizado o foco na prevenção da progressão de lesões não cavitadas e no controle do biofilme cariogênico, encorajando a busca por terapias complementares no tratamento da doença cárie¹⁵⁰. Desta forma, o uso de agentes como clorexidina, triclosan e óleos essenciais vêm sendo proposto com o objetivo de promover efeito antimicrobiano, reduzindo a quantidade de microrganismos cariogênicos no microambiente oral¹⁵¹. No entanto, o desenvolvimento de mecanismos de resistência antimicrobiana tem limitado a utilização e eficácia destes agentes na prática clínica^{25,152}.

Com o intuito de superar as limitações relacionadas aos agentes antimicrobianos convencionais, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) tem sido proposta como terapia alternativa para o controle de biofilme cariogênico por meio de abordagem não invasiva e sem promover resistência bacteriana¹⁵³.

Embora seu uso em odontologia seja relativamente recente, a descoberta da TFDA aconteceu no longínquo início dos anos 1900¹⁵⁴, sendo utilizada principalmente como terapia oncológica¹⁵⁵. No entanto, a preocupação com a crescente de casos de resistência antimicrobiana no início dos 1990 reacendeu o interesse em pesquisa na TFDA, redescobrimo seu potencial terapêutico e expandindo sua aplicação em diferentes áreas e finalidades¹⁵⁶.

A TFDA é baseada na aplicação local e sistêmica de um composto fotossensível, chamado de fotossensibilizador, que se acumula no tecido alvo. Esta molécula de fotossensibilizador absorve luz em comprimento de onda específico, que por sua vez desencadeia um processo de destruição/agressão seletiva de células¹⁵⁷, geralmente envolvendo moléculas de oxigênio e estresse oxidativo. Resumidamente, a TFDA consiste na interação entre três componentes (fotossensibilizador, fonte de luz e oxigênio), resultando em reações foto-físicas e fotoquímicas com alta capacidade oxidativa podendo causar danos às proteínas, lipídios, ácido nucléico e outros componentes celulares de microrganismos, assumindo papel importante no dano e morte celular¹⁵⁸. Além disso, a TFDA apresenta benefícios que incluem o controle e inativação instantâneos de bactérias de maneira segura, não invasiva e sem apresentar riscos de toxicidade e/ou de distúrbios sistêmicos^{36,159}.

A reação fotodinâmica pode ocorrer por diferentes vias dependendo da forma como o fotossensibilizador interage com a célula alvo. O estresse oxidativo resultado da reação pode ocorrer direta ou indiretamente. As reações diretas (tipo I e II) dependem necessariamente da presença de oxigênio, diferentemente das reações indiretas (tipo III e IV)¹⁶⁰.

Durante a TFDA, o fotossensibilizador é excitado por meio da absorção de fótons emitidos pelas fontes de luz, fazendo com que a molécula seja convertida de seu estado original para um estado singlete excitado. Após essa conversão inicial, a molécula de fotossensibilizador pode retornar ao seu estado original pela liberação de fluorescência ou calor por meio de uma conversão interna, ou pode ainda converter-se para um estado ainda mais excitado (estado tripleto) por meio de uma conversão entre os sistemas. Quando atinge o estado excitado tripleto, a molécula de

fotossensibilizador pode também retornar ao seu estado original por meio da emissão de fosforescência ou dar origem a duas reações que terão como produto final espécies reativas de oxigênio^{155,156,161-164}.

Na reação tipo I, a molécula de fotossensibilizador em seu estado excitado interage com moléculas e tecidos vizinhos. Essa reação ocorre por meio da transferência de elétrons, formando radicais superóxidos (O_2^-). Esses radicais podem sofrer reações químicas de redução e transformar-se em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula altamente reativa e que funcionará como precursora de radicais livres hidroxila. Sendo assim, a formação dos radicais hidroxila é resultante do processo oxidativo ocasionado pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)^{155,156,161-163}. Na sequência, esses radicais livres poderão interagir com qualquer biomolécula presente nas regiões circundantes e causar a morte celular¹⁶⁵.

Em contrapartida, na reação tipo II, a energia do fotossensibilizador em seu estado tripleto excitado é diretamente transferida para um estado tripleto de oxigênio (3O_2) ocasionando a geração de oxigênio singleto (1O_2)¹⁵⁵. Esta molécula de 1O_2 é altamente reativa e pode interagir com diferentes moléculas no interior da célula^{166,167}. Desta forma, a reação tipo II causa uma reação rápida e indiscriminada em todos os tipos de biomoléculas, tornando inviável o desenvolvimento de mecanismos de defesa pelas células alvo, ocasionando assim a morte celular¹⁶⁸. Após o ciclo de absorção e geração de radicais livres se completar, o fotossensibilizador retorna para o seu estado original e estará novamente disponível para ser absorvido pelos fótons e dar início a um novo ciclo, fazendo com que uma única molécula de fotossensibilizador possa originar milhares de moléculas de 1O_2 antes de ser destruído¹⁵⁵. As reações do tipo I e II podem ocorrer concomitantemente e o equilíbrio entre ambas as reações é diretamente influenciado pelos substratos intracelulares, pelas características dos fotossensibilizadores utilizados e pela concentração de oxigênio presente no ambiente celular.

As reações tipo III e IV não dependem do oxigênio, pois promovem dano ou morte celular pela ativação direta do fotossensibilizador. Na reação tipo III, o fotossensibilizador em seu estado excitado tripleto interage com radicais livres promovendo eventos citotóxicos no interior da célula. Já na reação tipo IV, o fenômeno chamado de “foto-isomeria” ocorre, o qual consiste em um rearranjo intramolecular após a excitação do fotossensibilizador que auxilia na sua ligação e interação com a célula alvo¹⁶⁰.

3.6 TFDA no Tratamento da Doença Cárie

A TFDA em odontologia tem sido empregada para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, câncer bucal, diagnóstico de alterações malignas em lesões orais, desinfecção da cavidade bucal e lesões de cárie^{18,30,31,169-176}. Além das inúmeras aplicações clínicas, a TFDA é considerada uma técnica relativamente simples, apresentando vantagens que incluem: amplo espectro de ação (fotossensibilizadores agem sobre diversos microrganismos); efeito antibacteriano; poucos efeitos colaterais; e ausência de resistência ao tratamento¹⁷⁰.

No que diz respeito à efetividade da TFDA no tratamento da doença cárie, os resultados são promissores e sugerem a TFDA como terapia complementar principalmente no manejo de lesões profundas¹⁸. Considerando que bactérias podem persistir na cavidade e contribuir na progressão de lesões mesmo após a remoção^{177,178} e restrição de nutrientes¹⁷⁹, a TFDA pode ser efetiva para a inativação dessas bactérias e prevenção de cárie recorrente^{180,181}.

Uma revisão sistemática seguida de meta-análise teve como objetivo avaliar o efeito da TFDA sobre microrganismos envolvidos na etiologia e desenvolvimento da doença cárie. De acordo com os 34 estudos incluídos, os resultados evidenciaram que o microrganismo mais avaliado foi o *Streptococcus mutans* (82%). Em relação aos parâmetros da TFDA, a fonte de luz mais utilizada foi o LED vermelho em comprimento de onda variando entre 625 a 670 nm. Já o fotossensibilizador mais utilizado foi o azul de metileno, enquanto que o tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos. Com relação ao efeito da TFDA sobre os microrganismos, apenas 11 dos 34 estudos relataram redução da viabilidade celular maior ou igual a 99,9%. Sendo assim, os resultados evidenciam o desafio existente em inativar microrganismos organizados na forma de um biofilme. Além disso, a falta de padronização nos protocolos de aplicação da TFDA dificultou a execução da meta-análise e sugerem a necessidade de definição de protocolos específicos para TFDA. Deve-se ressaltar que a maioria dos artigos incluídos tratavam-se de estudos *in vitro* apresentando risco alto ou moderado de viés, sendo necessário cautela na interpretação dos resultados obtidos. Por fim, os autores evidenciaram que a TFDA vem sendo sugerida como uma opção promissora para potencializar a desinfecção oral de microrganismos relacionados à doença cárie. Adicionalmente, destacou-se a importância da realização de ensaios clínicos

controlados e randomizados a fim de confirmar os resultados obtidos em condições *in vivo* para uma melhor qualidade e confiabilidade de evidência científica¹⁸².

Diferentes modelos de biofilme podem ser utilizados durante investigações envolvendo TFDA. No entanto, uma revisão de literatura apontou que, de maneira geral, biofilmes multi-espécies são mais tolerantes à ação da TFDA devido a sua complexidade e espessura. Já para biofilmes mono-espécies, o efeito da TFDA é mais pronunciado, sendo efetivo em reduzir a contagem de colônias de *Streptococcus mutans*¹⁸³.

Idealmente um fotossensibilizador deve ser de fácil síntese, baixo custo e apresentar estabilidade de armazenamento. Além disso, o pico de absorção do fotossensibilizador deve estar na região entre 650 e 800 nm, já que acima de 800 nm a energia fornecida não é suficiente para promover a excitação do oxigênio¹⁸⁴. Não apresentar toxicidade intrínseca e no escuro, assim como ser eliminado rapidamente dos tecidos para evitar qualquer efeito foto-tóxico¹⁸⁵ são características cruciais para viabilizar a aplicação clínica.

A falta de padronização nos protocolos de aplicação da TFDA motivou a condução de uma revisão sistemática a fim de determinar qual fotossensibilizador apresenta maior potencial antibacteriano contra um biofilme cariogênico. De acordo com os 12 estudos incluídos, os fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidino (aplicados com tempo de incubação e de irradiação de 5 minutos) apresentam os melhores resultados de redução bacteriana. Os dados expressos em logaritmo (log) de base 10 evidenciaram que a curcumina e o Photogem[®] também apresentaram redução significativa da viabilidade bacteriana em comparação aos grupos controles ($p = 0,042$). No entanto, os dados de redução de log apontaram que a redução para *Streptococcus mutans* não foi significativa para nenhum dos fotossensibilizadores avaliados ($p = 0,679$). Embora a falta de padronização metodológica dos estudos tenha dificultado a definição de qual fotossensibilizador apresenta maior eficiência antibacteriana, os estudos sugerem que azul de metileno, azul de toluidino, curcumina e Photogem[®] apresentaram melhores resultados em relação à redução de espécies bacterianas envolvidas na doença cárie¹⁵¹.

Diferentes fotossensibilizadores são utilizados na TFDA, tanto de origem sintética como natural. Embora os fotossensibilizadores sintéticos apresentem maior estabilidade, a utilização de compostos naturais tem sido aceita e amplamente estudada devido à menor possibilidade de interação medicamentosa e efeitos

colaterais^{27,33,37,186-189}. Neste sentido, a curcumina apresenta-se como um fotossensibilizador em potencial, principalmente no tratamento de infecções orais³⁰. Muito conhecida como tempero culinário, a curcumina é um composto extraído da *Curcuma longa L.* e possui importantes propriedades terapêuticas, incluindo: anti-inflamatórias, antissépticas, antivirais e antitumorais^{30,190-195}. Além disso, a curcumina não tem apresentado toxicidade contra diversas culturas celulares e modelos animais²⁷. Seu pico de absorção concentra-se no comprimento de onda azul (300 – 500 nm) com absorção máxima em 430 nm, podendo exercer efeito foto-tóxico em concentrações na escala de micromolar e sendo um fotossensibilizador indicado para o tratamento de infecções locais e superficiais presentes na cavidade oral e pele^{30,196}. Somado a isso, a curcumina apresenta vantagens como baixo custo, síntese simples e adequada efetividade²⁷. No entanto, baixa biodisponibilidade na cavidade oral, rápida degradação e baixa estabilidade em meio aquoso são relatados como características que restringem sua aplicação clínica¹⁹⁷⁻²⁰³. Para superar essas limitações do fotossensibilizador, o uso de sistemas de liberação de droga utilizando nanotecnologia tem sido relatado como promissor²⁰⁴⁻²⁰⁶.

Considerando a gama de fotossensibilizadores existentes, a curcumina destaca-se na odontologia, principalmente no tratamento da doença cárie. Estudos prévios apontam sua efetividade contra microrganismos cariogênicos organizados em uma estrutura de biofilme ou presentes em lesões artificiais de cárie^{27,172}. Em um estudo in vitro, lesões artificiais de cárie foram induzidas por modelo biológico contendo *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em espécimes de dentina humana. Para a aplicação da TFDA, diferentes concentrações de curcumina foram testadas (0,75; 1,5; 3,0; 4,0 e 5,0 g/L) e fotoativadas com luz LED azul (450 nm) em dose de luz de 5,7 J/cm². As porcentagens de sobrevivência de *S. mutans* e *L. acidophilus* evidenciaram que as concentrações de 0,75, 1,5 e 3,0 g/L não foram suficientes para promover uma redução significativa dos microrganismos ($p > 0,05$). Em contrapartida, a concentração de 5,0 g/L promoveu uma redução significativa de aproximadamente 70% ($p < 0,05$). Nenhum efeito tóxico foi observado para a curcumina na ausência de luz, excluindo a possibilidade de toxicidade intrínseca do composto. Concluiu-se que a curcumina possui efeito foto-tóxico para os microrganismos testados, embora a concentração máxima tenha sido necessária para promover efeito significativo¹⁷².

Outro estudo propôs-se a avaliar o efeito da TFDA mediada por curcumina contra *S. mutans* e *L. acidophilus* organizados na forma de biofilme ou em lesões artificiais de cárie. Novamente diferentes concentrações de curcumina foram testadas 0,75; 1,5; 3,0; 4,0 e 5,0 g/L) e irradiadas com LED azul (5,7 J/cm²). Os resultados de viabilidade celular evidenciaram que na fase de biofilme todas as concentrações de curcumina sob irradiação promoveram reduções significativas de viabilidade ($p < 0,05$). No entanto, quando os microrganismos estavam presentes nas lesões de cárie, apenas a maior concentração de curcumina (5,0 g/L) foi capaz de promover efeito antibacteriano. Nenhum efeito foi observado para curcumina no escuro. Sendo assim, pôde-se concluir que a dificuldade de penetração da luz e difusão do fotossensibilizador na lesão de cárie tornam os microrganismos menos suscetíveis à TFDA em comparação à fase de biofilme, sendo necessário uma concentração maior de fotossensibilizador²⁷.

A TFDA como método alternativo de desinfecção da cavidade a fim de erradicar ou minimizar a viabilidade bacteriana da dentina afetada por cárie previamente à restauração têm demonstrado resultados favoráveis¹⁸¹. No entanto, os impactos da TFDA na adesão dos diferentes materiais restauradores ao substrato dentinário ainda são incertos, conflitantes e merecem investigações mais aprofundadas. Em geral, os testes de resistência adesiva como o de microcissalhamento são utilizados para avaliar a adesão dos materiais após diferentes tratamentos de superfície²⁰⁷. Empregando estes testes, resultados divergentes foram relatados nos quais evidenciaram diminuição da resistência adesiva a dentina afetada por cárie de diferentes materiais restauradores (cimento de ionômero de vidro modificado por resina e resina composta)^{208,209}.

Embora haja divergência nos achados relacionados aos impactos da TFDA na adesão, quando a TFDA é mediada por curcumina, nenhum efeito significativo nos valores de resistência adesiva foi encontrado^{180,181}, sugerindo a curcumina como um fotossensibilizador adequado para desinfecção e descontaminação cavitária. No entanto, estudos que avaliem o efeito da TFDA na integridade da camada híbrida a longo prazo são cruciais para confirmar os resultados.

Desta forma, as evidências científicas demonstram um potencial promissor da curcumina como fotossensibilizador para a TFDA no tratamento da doença cárie. Toxicidade intrínseca do composto na ausência de luz não vem sendo relatada. Além disso, a TFDA mediada por curcumina parece não afetar negativamente a adesão de

materiais restauradores à dentina, embora estudos com azul de metileno tenham provocado uma diminuição dos valores de resistência adesiva. Relata-se ainda que as características das lesões de cárie podem dificultar a ação e efetividade da curcumina. Ademais, é consenso na literatura que a falta de ensaios clínicos ou envolvendo modelos animais limita a comprovação e confirmação dos resultados *in vitro* em condições mais fidedignas, sendo essencial para a que a aplicação da TFDA mediada por curcumina seja indicada como uma opção clínica viável.

3.7 Vidros Bioativos

Os biomateriais e suas funções têm evoluído significativamente nos últimos anos. Inicialmente, a primeira geração de biomateriais calcava-se no princípio da inércia biológica, objetivando o desenvolvimento de materiais que não desencadeassem qualquer tipo de resposta biológica no hospedeiro²¹⁰. Nesse contexto, metais resistentes à corrosão e insolúveis, assim como polímeros não tóxicos eram os materiais de escolha. No entanto, todo material biologicamente inerte apresenta a limitação de incompatibilidade na interface existente entre o material e o tecido vivo²¹⁰.

Os princípios da engenharia tecidual e o desenvolvimento de biomateriais foram revolucionados no ano de 1969. Naquele ano, desenvolveu-se o vidro bioativo, sendo o primeiro material com capacidade de ligação óssea e alta capacidade de adesão^{211,212}. Desde então, uma mudança de paradigma ocorreu, priorizando não mais a inércia, mas a interação biológica do material para com os tecidos. Dessa forma, o desenvolvimento de materiais que pudessem interagir de maneira benéfica com o tecido do hospedeiro a fim de conduzir e/ou estimular processos de reparo e regeneração tornaram-se prioridade²¹³.

A partir de então, houve crescimento de materiais bioativos, principalmente vítreos e cerâmicos, incluindo vidros bioativos modificados, cálcio fosfato^{214,215}, hidroxiapatita²¹⁶⁻²¹⁸ e silicato de cálcio²¹⁹⁻²²¹. Diferentes estudos têm objetivado investigar o mecanismo de ação e a alta bioatividade destes materiais. Em geral, a capacidade de adesão dos vidros bioativos é atribuída à liberação de íons pelo material, formando hidroxiapatita com deficiência de cálcio que ligar-se-á no colágeno tecidual²¹¹, podendo ocorrer de forma gradual²²². Além disso, esses mesmos íons também podem funcionar como reguladores de genes que expressam fatores de

crescimento e estimulam a atividade osteogênica de células secretoras de matriz óssea²¹¹.

Devido as suas características, a aplicação de vidros bioativos foi concentrada em abordagens de reparação e regeneração óssea e cartilaginosa, desenvolvimento de *scaffolds* e revestimento de implantes²²³⁻²³⁰. Após sua aplicação e efetividade na área de regeneração óssea, os vidros bioativos expandiram sua aplicabilidade para o campo da odontologia. A perda mineral de esmalte e/ou dentina decorrente de doenças como a cárie e erosão dentária representa um grande desafio clínico. Em face disto, os vidros bioativos emergiram como uma alternativa de tratamento promissora, visto que os íons liberados e a consequente formação de hidroxiapatita possibilitaram sua indicação como material capaz de promover a remineralização dos tecidos dentários²¹³.

Atualmente os vidros bioativos são incorporados em dentifrícios e apresentam eficácia comprovada contra sensibilidade dentária^{231,232} e capacidade remineralizante do esmalte^{233,234}. Além disso, partículas de vidro bioativo também estão sendo incorporadas em cimentos de ionômero de vidro, compósitos de base resinosa e sistemas adesivos²³⁵⁻²⁴⁰, com o objetivo de obstruir túbulos dentinários expostos, melhorar a adesão à dentina e, mais importante, remineralizar a dentina.

No entanto, no que diz respeito ao tecido dentinário, os desafios para os vidros bioativos promoverem a remineralização tecidual são maiores devido às diferenças estruturais e de composição em comparação ao esmalte²¹³. É amplamente conhecido que o esmalte dentário é composto essencialmente de mineral apatita (96% em peso), fazendo com que o conteúdo mineral determine as propriedades e comportamentos mecânicos do tecido. Por outro lado, a dentina além de apresentar menor porcentagem de mineral (70% em peso), é composta também de matriz colágena, proteínas e água²¹³. Ademais, a estrutura dentinária consiste de uma morfologia peculiar, na qual o seu conteúdo mineral está envolto em um arcabouço de fibrilas colágenas, sendo depositado de maneira extra e intrafibrilar. Portanto, as propriedades mecânicas da dentina não dependem apenas da quantidade de mineral existente, mas principalmente na disposição desses minerais dentro do arcabouço de colágeno²⁴¹. Pelos motivos supracitados, a capacidade dos vidros bioativos em remineralizar dentina não é comparável ao esmalte.

Vale ressaltar também que a incorporação de partículas de vidro bioativo em materiais resinosos e sistemas adesivos é complexa, visto que a presença de

monômeros ácidos podem reagir com as partículas²⁴². Além disso, o efeito da incorporação de vidro bioativo na resistência adesiva dos materiais resinosos tem demonstrado resultados controversos²⁴²⁻²⁴⁴, o que pode ser justificado pela incompatibilidade dos monômeros ácidos e das partículas de vidro²⁴⁵. Nesse contexto, a aplicação direta de vidro bioativo em suspensão aquosa ou em gel na dentina, previamente à aplicação do sistema adesivo, tem apresentado resultados mais adequados em termos de resistência adesiva^{244,245}. A aplicação direta do vidro bioativo permite uma maior difusão das partículas no interior da dentina, promovendo um contato íntimo entre o vidro e a dentina hígida (encontrada abaixo da zona mais desmineralizada) sendo essencial para induzir o processo de remineralização^{246,247}. Vale destacar que a presença de vidros bioativos na interface adesiva pode controlar/inibir o crescimento bacteriano^{245,248-250} devido ao aumento do pH local, assim como prevenir a ocorrência de cárie recorrente²⁵¹.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Este trabalho consiste em um estudo laboratorial (*in vitro*) randomizado, tendo como variáveis dependentes a: avaliação da profundidade das lesões artificiais de cárie por meio de microradiografia transversal; análise da viabilidade celular por meio de microscopia confocal; análise estrutural da dentina por meio de testes de dureza longitudinal; avaliação química da dentina por meio de espectroscopia FT-Raman; e avaliação da resistência adesiva e padrão de falha por meio de testes de microcisalhamento e imagens de MEV. A variável independente do estudo foi o método de remoção (fresa ou ultrassom), descontaminação (aplicação de TFDA), e remineralização (aplicação de vidros bioativos) da dentina cariada.

Espécimes de dentina bovina foram aleatorizados em diferentes grupos de estudo de acordo com o método de remoção, descontaminação e/ou remineralização da dentina afetada. Os métodos de remoção foram: fresa esférica (FR) e dispositivo de ultrassom (ULT). Para descontaminação, foi aplicado TFDA mediada por curcumina. Já os vidros bioativos utilizados foram o Bioglass® 45S5 e F-18. A associação destas terapias totalizou 14 grupos de estudos: dentina hígida (controle); cárie dentária (controle); FR; FR+TFDA; ULT; ULT+TFDA; FR+45S5; FR+F-18; ULT+45S5; ULT+F-18; FR+TFDA+45S5; FR+TFDA+F-18; ULT+TFDA+45S5; ULT+TFDA+F-18. A Tabela 1 ilustra os grupos de estudos.

Tabela 1 – Grupos de estudo.

Grupo	Método de remoção	Método de descontaminação	Aplicação de vidro bioativo
Lesão de cárie	-	-	-
Dentina hígida	-	-	-
FR	Fresa esférica	-	-
FR+TFDA	Fresa esférica	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	-
ULT	Ultrassom	-	-
ULT+TFDA	Ultrassom	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	-
FR+F-18	Fresa esférica	-	F-18 durante 5 minutos sobre a dentina
FR+TFDA+F-18	Fresa esférica	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	F-18 durante 5 minutos sobre a dentina
FR+45S5	Fresa esférica	-	45S5 durante 5 minutos sobre a dentina
FR+TFDA+45S5	Fresa esférica	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	45S5 durante 5 minutos sobre a dentina
ULT+F-18	Ultrassom	-	F-18 durante 5 minutos sobre a dentina
ULT+TFDA+F-18	Ultrassom	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	F-18 durante 5 minutos sobre a dentina
ULT+45S5	Ultrassom	-	45S5 durante 5 minutos sobre a dentina
ULT+TFDA+45S5	Ultrassom	TFDA (curcumina associada ao DMSO e irradiada com LED azul)	45S5 durante 5 minutos sobre a dentina

Fonte: Elaboração própria.

4.2 Fase Inicial

Nesta fase foram realizados o preparo dos espécimes, assim como experimentos com o intuito de estabelecer protocolos e concentrações a serem utilizadas nas etapas experimentais subsequentes.

4.2.1 Obtenção e preparo dos espécimes de dentina bovina

Incisivos bovinos sem defeitos e/ou trincas de esmalte visíveis em estereomicroscópio (aumento de 10x) foram utilizados para a obtenção dos espécimes de dentina (Figura 1A). Sendo assim, este estudo foi submetido à apreciação ética pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP e devidamente aprovado sob o número de registro 27/2018. Após o aceite pelo CEUA, o estudo foi iniciado (ANEXO).

Os dentes bovinos foram armazenados em solução de timol a 0,1% durante 24 horas. Após, o esmalte da face vestibular da coroa foi removido, a fim de obter blocos de dentina bovina com dimensões de 4x4x2 mm e 13x7x2 mm (Figura 1B-C), utilizando máquina de cortes de precisão (IsoMet 1000 Precision Cutter, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) sob constante refrigeração. Após a obtenção dos espécimes, os mesmos foram submetidos à avaliação da dureza Knoop superficial com o intuito de padronizar a dureza dentinária e evitar possíveis vieses de amostra. Para tanto, foi utilizado microdurômetro com indentador do tipo Knoop (HNV-2, Shimadzu, Japão), com carga de 10 gramas durante 10 segundos²⁵². Três indentações foram realizadas em cada espécime, preferencialmente no centro da superfície dentinária. Após o término das mensurações, obteve-se a média geral de dureza, sendo incluído no estudo somente os espécimes que apresentaram dureza entre 10 KHN a mais ou a menos em relação à média. Em seguida os espécimes foram armazenados em água destilada e geladeira até o início dos experimentos.

Figura 1 – Espécimes de dentina.



A) Coroas de incisivos bovinos. B) Espécimes de dentina bovina cortados nas dimensões de 4x4x2 mm e C) 13x7x2 mm.

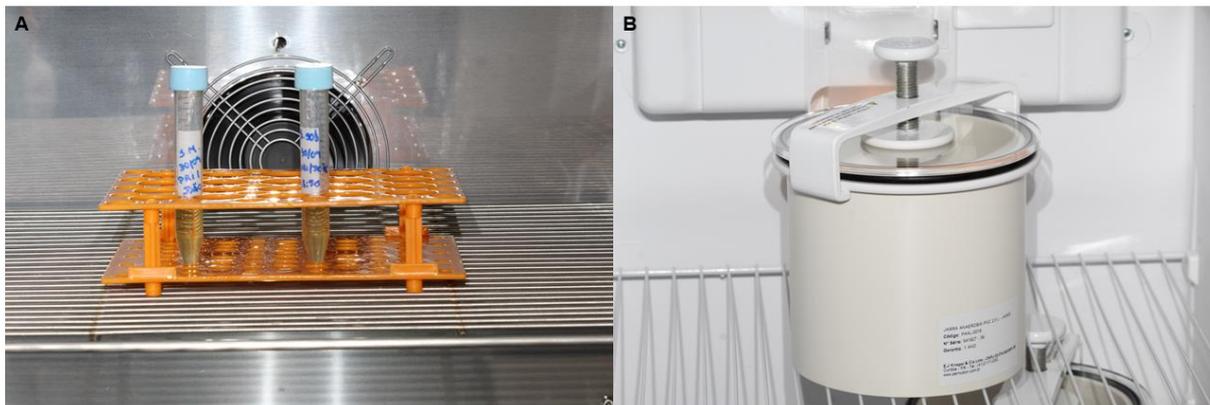
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.2 Seleção das bactérias e preparo da suspensão bacteriana padronizada

Cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) foram fornecidas pela Fundação FioCruz (Departamento de Microbiologia, Laboratório de Materiais de Referência, Setor de Bactérias de Referência localizado na Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e utilizadas para preparar as suspensões bacterianas com absorbância padronizada. As bactérias foram reativadas e cultivadas em placas de Petri contendo ágar de infusão cérebro-coração (BHI, KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil, Lote número: 082417507) para cultivo do *S. mutans* e ágar de Man Rogosa e Sharpe (MRS, Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA, Lote número: 3224118) para cultivo do *L. acidophilus*. Após, em tubo Falcon de 15 mL, contendo 5 mL de BHI caldo para *S. mutans* (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA, Lote número: 3141047) e 5 mL de MRS caldo para *L. acidophilus* (Lactobacilli MRS Broth, Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, USA, Lote número: 3127071), três a cinco colônias de cada bactéria foram inoculadas e incubadas em condições de aerobiose por 18 – 24 horas a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) no caso de *S. mutans* e em atmosfera de

microaerofilia no caso de *L. acidophilus* (Figura 2) para serem utilizadas nos experimentos de obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), assim como na indução da cárie artificial.

Figura 2 – Crescimento das bactérias.



A) Tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de BHI caldo e cepas de *Streptococcus mutans* incubados em condições de aerobiose. B) Tubos Falcon contendo cepas de *Lactobacillus acidophilus* incubados em atmosfera de microaerofilia com auxílio de jarra de anaerobiose. Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após o crescimento, a cultura dos tubos foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Excelsa II, Fanem, Mod. 206 BL, número de série: RAM047321), obtendo-se o precipitado de biomassa. O sobrenadante foi então descartado e a biomassa resuspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada) até atingir a absorbância padronizada de ~ 0.08 (*S. mutans*) e ~ 0.6 (*L. acidophilus*) lida em espectrofotômetro UV-Visível (Modelo VM-5, Bel Photonics, número de série: HC1509041) em comprimento de onda de 600 nm, turvação aproximada de 0.5 da escala de Mc Farland com quantidade de células na ordem de 10^8 células bacterianas/mL²⁷.

4.2.3 Método de preparação das micelas poliméricas

A preparação das micelas poliméricas foi realizada por meio da técnica de evaporação do solvente ou “filme polimérico”, utilizando o copolímero Pluronic® F-127 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Lote número: SLBS1853V). Em um balão de diluição de fundo redondo, adicionou-se 50 mL de curcumina a 0,5% para cada 600 mg de Pluronic® F-127, sendo estes dissolvidos em 30 mL do solvente clorofórmio.

Agitação manual foi realizada durante cerca de 2 minutos para assegurar uma homogeneização/dissolução da solução. As nanopartículas foram produzidas utilizando um evaporador rotatório (Buchi Switzerland, Modelo: RV 10D, número de série: 07324380) com uma bomba de vácuo a 78 kPa, agitação de 55 rpm., água do banho (50°C) e uma coluna de refrigeração a cerca de 8°C (Figura 3). O balão de diluição foi então corretamente encaixado no agitador e imerso na água do banho, durante cerca de 30 minutos. Após a evaporação total do clorofórmio, observa-se que o fundo do balão se torna baço, indicando a precipitação e solidificação de um filme polimérico. Este filme foi então reidratado para obtenção da solução micelar por meio da adição de 30 ml de água ultrapura (Milli-Q) a 30°C em cada balão. Em seguida, os balões foram submetidos a agitação magnética com 700 rpm durante 30 minutos (IKA, Modelo: C-MAG HS 7 S3, número de série:07350934) para promover a formação das micelas. Por fim, as soluções foram submetidas à dispersão por meio de um dispersor do tipo mecânico (IKA ULTRATURRAX® T 18 basic, número de série: 03364795) durante 2 minutos na velocidade 4 de rotação do dispersor, equivalente a 15.500 rpm.

Figura 3 – Evaporador rotatório utilizado para obtenção das micelas de Pluronic® F-127 por meio do método de evaporação do solvente.

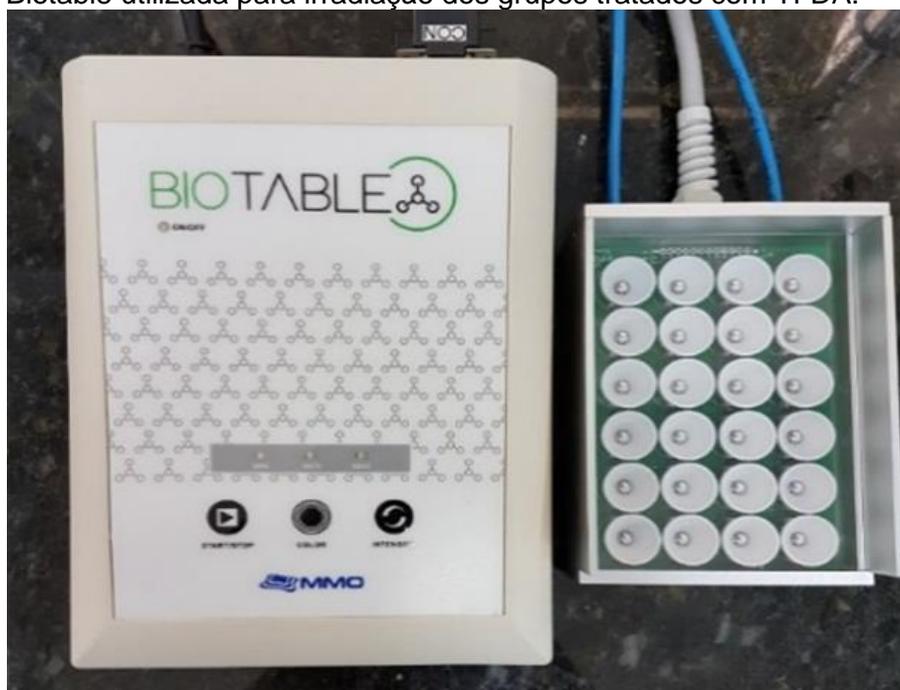


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.4 Fotossensibilizador e fonte de luz a ser utilizada para TFDA

O fotossensibilizador utilizado foi a curcumina sintetizada pelo LQBO – Laboratório de Química Bio-Orgânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, de acordo com o método descrito por Carmona-Vargas et al. 2017²⁵³, associada ou não as micelas de Pluronic® F-127. A fonte de luz utilizada foi um equipamento emissor de luz LED (Biotable, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) em comprimento de onda de 460 nm (Figura 4). O equipamento consiste de 24 LEDs que promovem a irradiação uniforme e simultânea de todos os orifícios de uma mesma placa de 24 poços. A dose de luz utilizada foi de 15 J/cm², irradiância de 22 mW/cm² e tempo total de irradiação de 11 minutos e 36 segundos²⁰⁴.

Figura 4 – Biotable utilizada para irradiação dos grupos tratados com TFDA.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida (CBM)

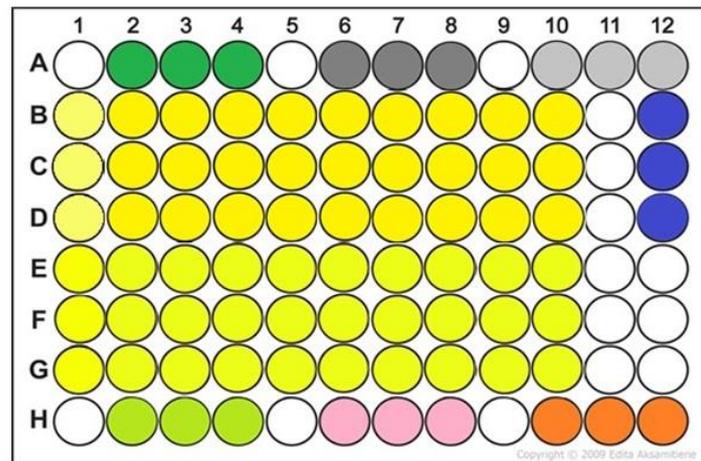
Para determinar a concentração do fotossensibilizador a ser utilizado nos experimentos de indução de cárie, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida máxima (CBM). Para tanto, dez poços (n = 10) de cada grupo, controle e experimental, foram utilizados para determinar as

concentrações por meio do método da microdiluição em caldo e coloração com resazurina de acordo com as normas da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) de 2013 e Elshick^{254,255} et al. 2016. A determinação da CIM e CBM foi realizada utilizando o fotossensibilizador curcumina incorporado ao dimetilsulfóxido (DMSO; Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha, Lote número: SHBF7360V) ou às micelas poliméricas (Pluronic[®] F-127, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lote número: SLBS1853V). Após a determinação da CIM e da CBM, a melhor concentração de curcumina foi utilizada para os experimentos futuros, sendo ela solubilizada em DMSO à 1% ou incorporada ao Pluronic[®] F-127. Para tanto, cada poço de uma placa de cultura celular de 96 poços contendo 100 µL de MRS Broth ou 100 µL de BHI caldo + sacarose a 1% recebeu 100 µL de curcumina incorporada ao 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 µM (Figura 5). Em seguida, preparou-se as suspensões bacterianas conforme descrito anteriormente e adicionadas em cada poço contendo curcumina a quantidade de 30 µL de *S. mutans* e 30 µL de *L. acidophilus*, obtendo-se a concentração final na ordem de 1x10⁵ células/mL. Para que pudéssemos obter 1x10⁵ células/mL, a partir da suspensão bacteriana obtida a 1x10⁸ células/mL (D.O. de 0.08-0.1 para *S. mutans* e ~0.6 para *L. acidophilus*), 1000µL de cada suspensão foi pipetada em tubo Falcon contendo 10 mL de PBS, obtendo-se finalmente a diluição de 10⁷ UFC/mL. Foram utilizados dois grupos controles em relação à inibição bacteriana, sendo eles: clorexidina a 0,12% (controle positivo) e meio de cultura sem suspensão bacteriana (controle negativo). As placas foram incubadas em estufa a 37°C (±1°C) durante 24 horas em condições de aerobiose para *S. mutans* e em atmosfera de microaerofilia para *L. acidophilus*.

Decorrido o período de incubação, 30 µL de resazurina estéril a 0,015% (m/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, lote número: MKBT9691V), foi pipetada em cada poço com o objetivo de verificar por meio de leitura visual em quais poços houve ou não crescimento bacteriano²⁵⁵. Após a pipetagem da solução contendo resazurina, as placas foram incubadas por 2-4 horas, sob agitação de 75 rpm (Incubadora de agitação orbital, QUIMIS, Modelo: Q816M22, número de série: 16052406). Em seguida, realizou-se a leitura visual, na qual a coloração azul-roxa representa ausência de crescimento e a coloração rosa-violeta representa presença de crescimento bacteriano. Dos orifícios que não mostraram crescimento visível, ou seja, DO 600nm ≤ 0.05, foi pipetado 10 µL e posteriormente plaqueados em meio de cultura

específico para crescimento de *S. mutans* (BHI ágar) e *L. acidophilus* (MRS ágar) e então incubados à 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 48 horas em estufa bacteriológica (Modelo: Q316M5, QUIMIS, número de série: 16042092) em condições de aerobiose para *S. mutans* e em atmosfera de microaerofilia para *L. acidophilus*. A CIM foi definida como a menor concentração de 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) (Figura 5).

Figura 5 – Desenho esquemático de uma placa de 96 poços ilustrando os grupos avaliados nos experimentos de determinação da CIM e CBM para cultura planctônica (em suspensão) de *S. mutans* e *L. acidophilus*.



- 200µL de curcumina + DMSO
- 200µL de curcumina + micelas de Pluronic® F-127
- 100µL de curcumina + DMSO + 100µL de BHI caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus*
- 100µL de curcumina + micelas + 100µL de BHI caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus*
- 50µL de BHI caldo + 50µL de MRS caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus* + luz
- 50µL de BHI caldo + 50µL de MRS caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus* + Pluronic® F-127 + luz
- 50µL de BHI caldo + 50µL de MRS caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus* + Pluronic® F-127 sem luz
- 50µL de BHI caldo + 50µL de MRS caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus* + sem luz
- 50µL de BHI caldo + 50µL de MRS caldo + 25µL de *S. mutans* + 25µL de *L. acidophilus* + clorexidina
- 75µL de BHI caldo + 75µL de MRS caldo
- 180µL de resazurina

Fonte: Elaboração própria.

4.2.6 Indução da lesão de cárie artificial

Inicialmente as superfícies laterais dos espécimes foram isoladas com verniz ácido-resistente (Colorama CEIL Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6), a fim

promover a desmineralização e formação das lesões apenas na superfície vestibular dos espécimes. Para que a agregação dos microrganismos na superfície dentária não fosse influenciada pela ação da gravidade, os espécimes ficaram suspensos individualmente no interior de cada poço de uma placa de 24 poços. Para tanto, os espécimes foram incluídos em lamínulas circulares de vidro com o auxílio de silicone de condensação de consistência leve e em seguida fixados em fio ortodôntico, de modo que os espécimes ficassem suspensos nos poços (Figura 7). Após, o conjunto espécime, lamínula e fio ortodôntico foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos e transferidos para placas com 24 poços contendo 2 mL de suspensão indutora de cárie (Figura 8). Essa suspensão foi preparada com suplementação de BHI (BHI 3,7 g/100 mL, extrato de levedo 0,5 g/100 mL, glicose 1g/100 mL e sacarose P.A. 2g/100 mL). A cada 50 mL dessa suspensão foram adicionados 5 mL de *S. mutans* (10^8 UFC) e 5 mL de *L. acidophilus* (10^8 UFC), com o intuito de promover o crescimento bacteriano. Os espécimes foram mantidos a 37°C, em condições de microaerofilia em três períodos de tempo diferentes (7, 10 ou 14 dias) a fim de determinar o período mínimo necessário para a formação de lesões artificiais com profundidade adequada para os experimentos futuros. A suspensão indutora foi renovada a cada 48 horas.

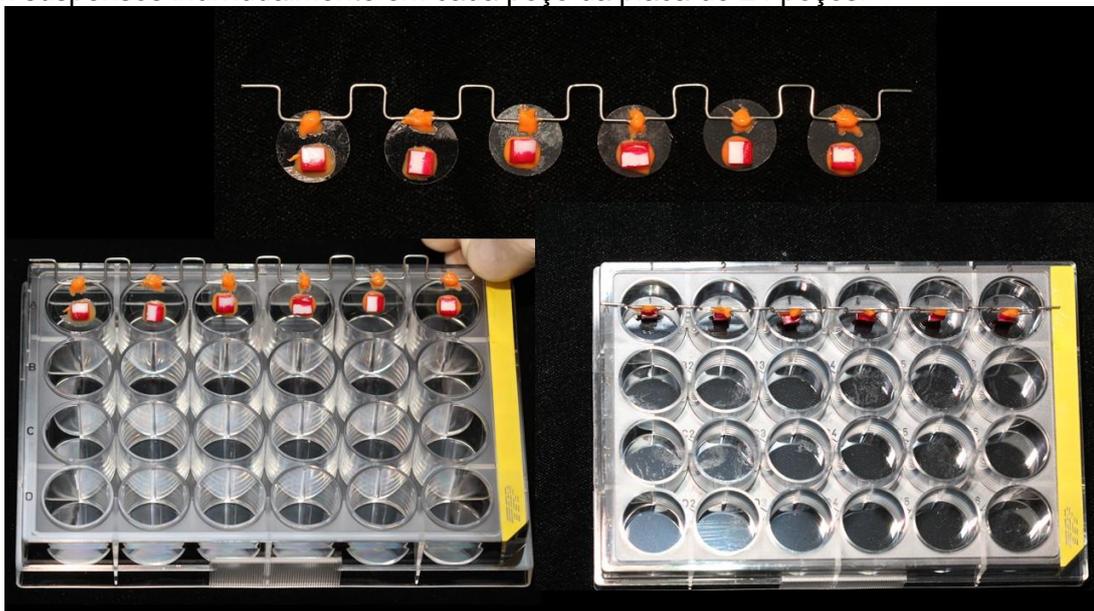
Nesta etapa, a profundidade das lesões foi avaliada por meio de microscopia de luz polarizada. Para tanto, após a indução de acordo com os diferentes tempos, foram obtidos *slices* de aproximadamente 100 µm de espessura com o auxílio de micrótomo para processamento histológico (EXACT Technologies Inc, Toronto, ON, Canadá) pertencente ao Laboratório de Análise Histopatológica para Cortes não Descalcificados e Laboratório de Microscopia de Luz Polarizada da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Os *slices* de dentina foram fixados em lâminas de vidro (26 x 76 mm, Exacta, Perfecta Lab, São Paulo, SP, Brasil) e avaliados em microscópio de luz polarizada (Leica DM2500 – Leica Microsystem, São Paulo, SP, Brasil, número de série: 332354-032011), com objetivas de aumento em 10x e 20x. Foi utilizado o software Leica Application Suite v3.8 para análise das imagens. A profundidade das lesões foi mensurada preferencialmente na área central de cada lesão²⁵⁶.

Figura 6 – Laterais do espécime de dentina sendo isoladas por meio da aplicação de verniz ácido-resistente a fim de evitar contato com a suspensão indutora de cárie e a consequente desmineralização do tecido.



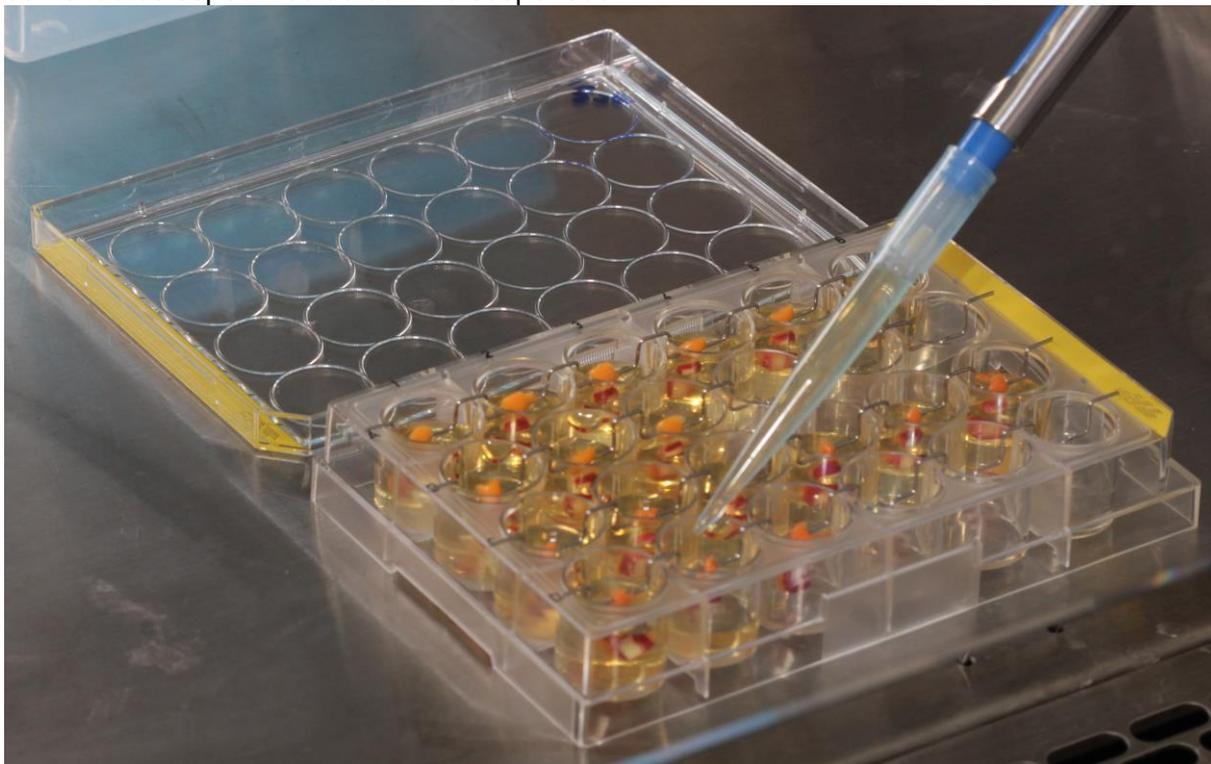
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 7 – Sistema contendo lamínula circular de vidro, espécime de dentina e fio ortodôntico, fixos com o auxílio de silicone de condensação de consistência leve. Note como os espécimes ficam suspensos individualmente em cada poço da placa de 24 poços.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 8 – Pipetagem de 2 mL da suspensão indutora da lesão de cárie em cada poço contendo os espécimes de dentina suspensos.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.7 Microradiografia transversal (MT)

A avaliação da perda mineral e profundidade das lesões de cárie artificiais foi realizada por meio de imagens de MT, a qual é considerada padrão ouro para essa finalidade. Os espécimes imediatamente após a indução artificial de cárie foram seccionados longitudinal e perpendicularmente ao centro da superfície dentinária cariada com auxílio de máquina de cortes de precisão e disco diamantado dupla face (Buehler Wafering Blade, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA), na velocidade de 300 rpm, sob refrigeração com água para a obtenção de *slices* de aproximadamente 500 μm de espessura. A fim de atingir a espessura apropriada de 100 μm para análise de MT, realizou-se o polimento manual utilizando-se lixas de carboneto de silício de diferentes granulações (#600 e #1200, Wetordry™, 3M™, St. Paul, MN, EUA). A espessura dos *slices* foi verificada por meio de micrometro digital (MDC Lite 293-821-30, Mitutoyo Sul Americana Ltda., Suzano, SP, Brasil). Previamente à obtenção das microradiografias, os espécimes foram armazenados em recipientes plásticos em ambiente úmido por

meio de gaze estéril umedecida em água destilada estéril com o intuito de evitar a desidratação e fratura dos slices de dentina durante a exposição aos raios-X.

Os *slices* foram fixados em matriz transparente em combinação com meia fatia “step-wedge” de alumínio (14 fatias, ~ 30 µm de espessura, 99,9% de Al) para calibração, utilizando filmes radiográficos de alta resolução e velocidade (Motion Picture Fine Grain Positive Film 71337", FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japão) de acordo com as orientações do fabricante. Os filmes foram expostos à fonte de raios-X de cobre e níquel (CuKa – $\lambda = 0,154$ nm) operando com voltagem de 20 kV e amperagem de 20 mA por 13 minutos. A distância entre o filme e a fonte de radiação foi de 42 cm.

A análise do filme exposto foi realizada por meio de microscópio de transmissão de luz com objetiva de 20x de aumento (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Germany) e câmera CCD (XC-77CE, Sony, Tóquio, Japão) acoplado a um computador para aquisição dos dados e com software específico para os cálculos (TMR 1.25e, Inspektor Research BV, Amsterdam, Holanda) (Figura 9).

Foram calculados a perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade da lesão (μm) dos espécimes. O ΔZ (%vol. μm) é o resultado da diferença entre a porcentagem de conteúdo mineral de dentina hígida, desmineralizada e remineralizada, em relação à profundidade da lesão. Enquanto que a mensuração da profundidade é definida pela distância entre a superfície da lesão (0%) até a profundidade em que a dentina apresenta conteúdo mineral igual ou superior a 95%⁹⁴.

Considerando o coeficiente de absorção linear do alumínio (131,5), do material orgânico e água (11,3) e da hidroxiapatita (260,5), a porcentagem de volume mineral (%VOL) foi calculada por meio da fórmula descrita por Angmar et al.²⁵⁷.

$$\%VOL = \frac{100 (131,5 ta - 11,3 tf)}{(260,5 - 11,3)tf}$$

Onde *ta* significa a espessura da fatia e *tf* representa a espessura do porta amostra (*step-wedge*).

Figura 9 – Câmera do sistema para microradiografia transversal.



Fonte: Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB), Universidade de São Paulo (USP).

4.2.8 Métodos para remoção e descontaminação do tecido cariado

Após o desenvolvimento das lesões de cárie artificiais, os espécimes foram lavados com água destilada e aplicou-se solução corante (Revelacárie, ASFER, Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil, Lote número: 2450) para a identificação visual da dentina afetada e infectada, de acordo com os critérios descritos por Momoi²⁵⁸ et al (2012). A solução foi aplicada sobre a superfície da dentina cariada por 10 segundos, seguido de lavagem com jato de água por 10 segundos, de acordo com as recomendações do fabricante. A dentina foi identificada como: afetada (dentina amolecida com coloração rosa-claro) ou infectada (dentina amolecida com coloração rosa-escuro)⁶⁷.

A remoção ou descontaminação da dentina infectada foi realizada de acordo com os diferentes grupos testados e executada por um único operador a fim de evitar variabilidade interoperadores. Os espécimes foram fixados em placa de vidro com auxílio de cera utilidade para estabilizá-los e facilitar a remoção. Após a remoção, sonda exploratória estéril e análise visual foram utilizadas para avaliar a remoção da dentina afetada. Nova aplicação do evidenciador de dentina cariada foi realizada para confirmação da remoção completa da dentina infectada.

Para padronizar a pressão de penetração durante os procedimentos de remoção, o operador pressionou a fresa acoplada em motor de baixa rotação e a ponta acoplada no dispositivo de ultrassom contra a plataforma de uma balança

eletromagnética (BL320H, Shimadzu Corporation, Barueri, SP, Brasil, número de série: D477710288). Sem visualizar o monitor digital da balança, o operador foi instruído a aplicar a força normalmente utilizada por ele durante a prática clínica de remoção de cárie e a força em gramas foi registrada em tempos diferentes. A força média aplicada foi de 103 g, estando de acordo com a força comumente relatada na literatura^{259,260}. O campo operatório foi iluminado com luz artificial, sendo considerada adequada pelo operador para visualização e realização dos procedimentos. Os experimentos foram realizados em condições assépticas.

As técnicas de remoção consistiram de:

- Técnica convencional: remoção da dentina infectada com auxílio de fresa esférica de aço (AR 7, JET Carbide Burs, American Burrs, Palhoça, SC, Brasil), acoplada em peça de mão em baixa rotação (LB100, Beltec Ind. E Com. de Equipamentos Odontológicos, Araraquara, SP, Brasil, número de série: LB1-0132680). Os parâmetros de remoção consistiram em 15000 rpm, potência de 40 W e frequência de 0,06 kHz.

- Ultrassom descariador: remoção da dentina infectada com auxílio de dispositivo ultrassom desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – IFSC/USP. Uma ponta esférica diamantada (E3D, Helse Dental Technology, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil, Lote: 17080618) foi acoplada ao ultrassom, sendo utilizada sob constante refrigeração com água destilada estéril (Figura 10). Potência de 30 W e frequência de 27,5 kHz foram utilizadas.

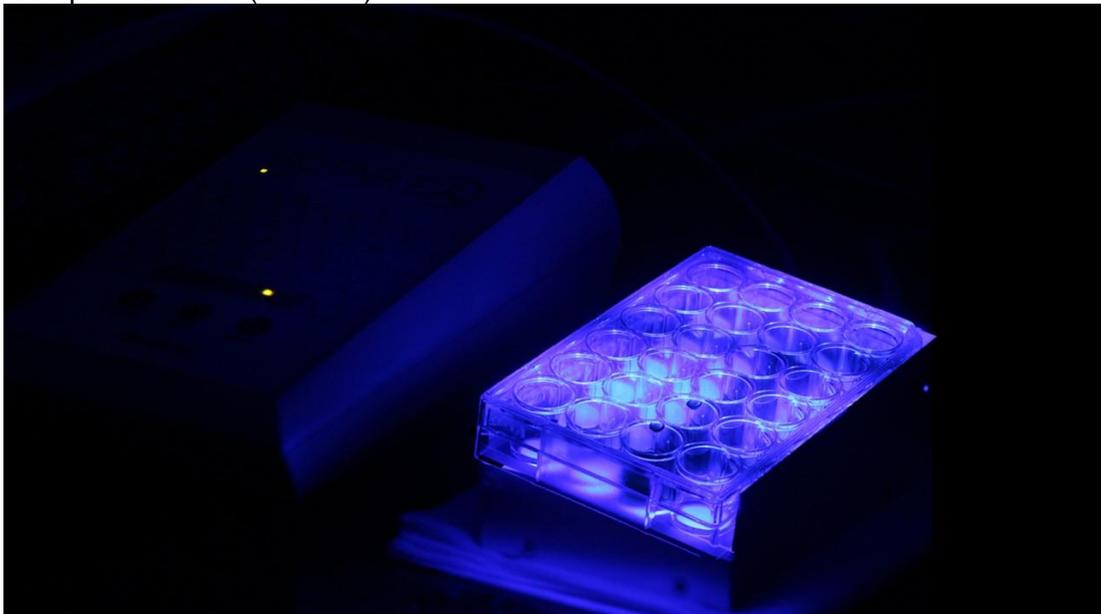
Para os grupos que receberam TFDA como estratégia de descontaminação da dentina afetada, a solução contendo o fotossensibilizador (curcumina em DMSO) permaneceu em contato com a dentina por 5 minutos na ausência de luz (tempo pré-irradiação). Em seguida, os espécimes foram irradiados uniformemente e simultaneamente com LED azul (Biotable, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 11) em comprimento de onda de 460 nm com dose de luz de 15 J/cm², irradiância de 22 mW/cm² e tempo de irradiação de 11 minutos e 36 segundos²⁰⁴.

Figura 10 – Ponta diamantada acoplada em dispositivo de ultrassom.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 11 – Placa de 24 poços contendo os espécimes e a solução de curcumina sendo irradiada por LED azul (Biotable).



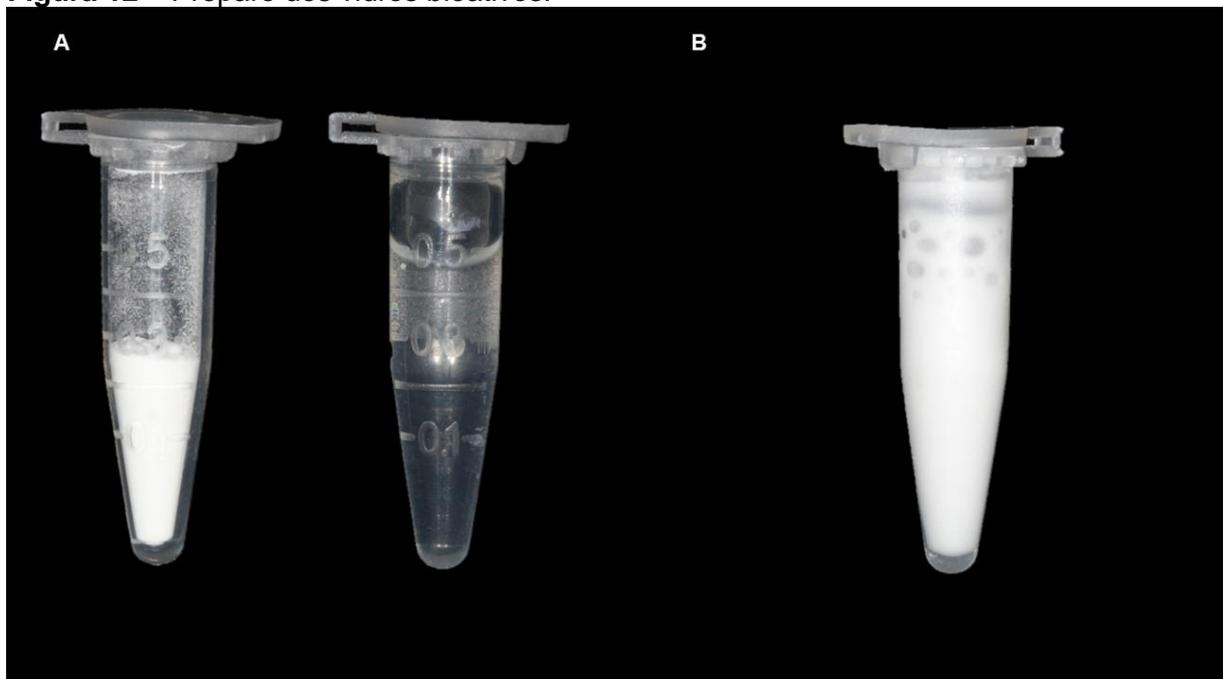
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.9 Aplicação de vidro bioativo como agente remineralizante

Com o intuito de promover remineralização da dentina afetada foram aplicados os agentes bioativos Bioglass® 45S5 e F-18 fornecidos pelo Laboratório de Materiais Vítreos – LaMAV do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

A composição dos vidros bioativos são: 45S5 ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$) e F-18 ($\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{CO}_3\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$). Os pós dos vidros bioativos foram incorporados em gel de celulose na concentração de 25% (0,175 mg de pó em 0,500 mg de gel) (Figura 12) a fim de facilitar a aplicação dos vidros sobre a superfície dentinária (Figura 13). Ambos os vidros bioativos foram moídos em jarro de Ágata no moinho Pulverisette (FRITSCH GmbH - Milling and Sizing, Idar-Oberstein, Alemanha) e passados em peneiras de Nylon a fim de obter partículas de tamanho menor que 45 micrometros. Os vidros foram aplicados com o auxílio de microaplicador (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), mantendo os mesmos em contato com a dentina durante 5 minutos^{8,43}. Em seguida, a superfície foi lavada com água destilada durante 30 segundos.

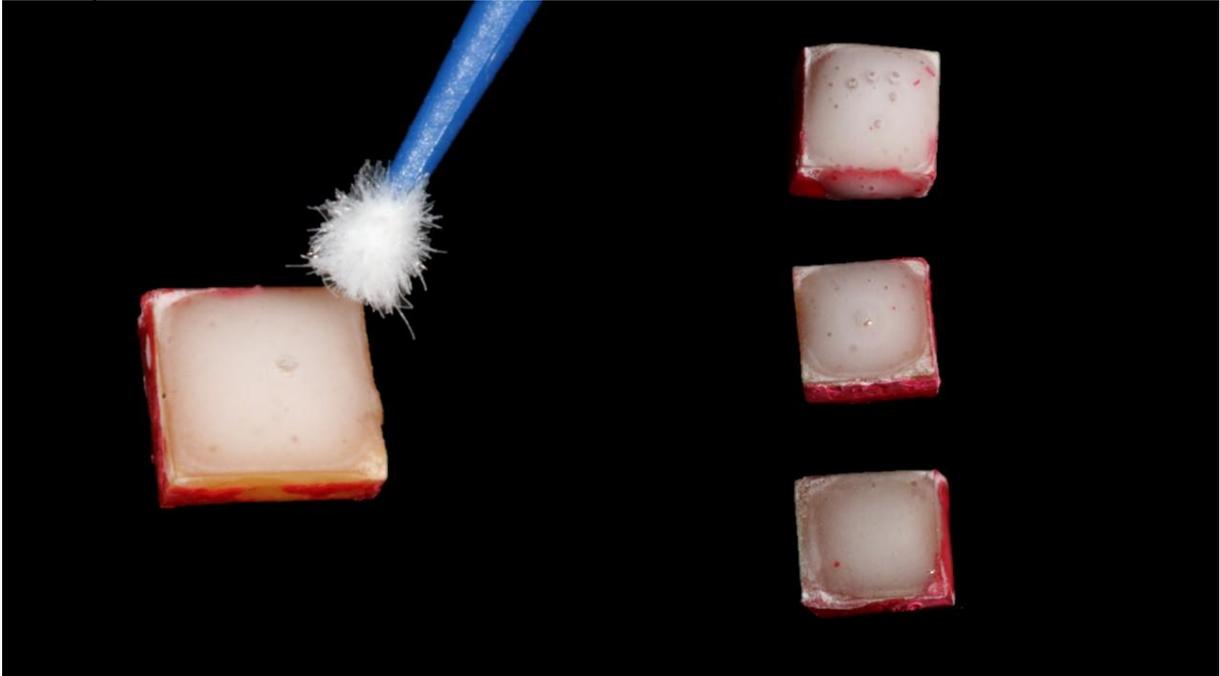
Figura 12 – Preparo dos vidros bioativos.



A) Microtubos do tipo *ependorf* contendo o pó do vidro bioativo (45S5 ou F-18) e o gel de celulose separadamente. B) Aspecto final após a incorporação do pó de vidro bioativo no gel de celulose. Note o aspecto homogêneo da mistura.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 13 – Aplicação do vidro bioativo sobre a superfície dentinária com auxílio de microaplicador.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após os tratamentos, os espécimes foram avaliados quanto à perda mineral e alterações nos componentes orgânicos e inorgânicos, por meio de análises de microdureza Knoop longitudinal (DL), microradiografia transversal (MT) e FT-Raman.

4.3 Fase Experimental

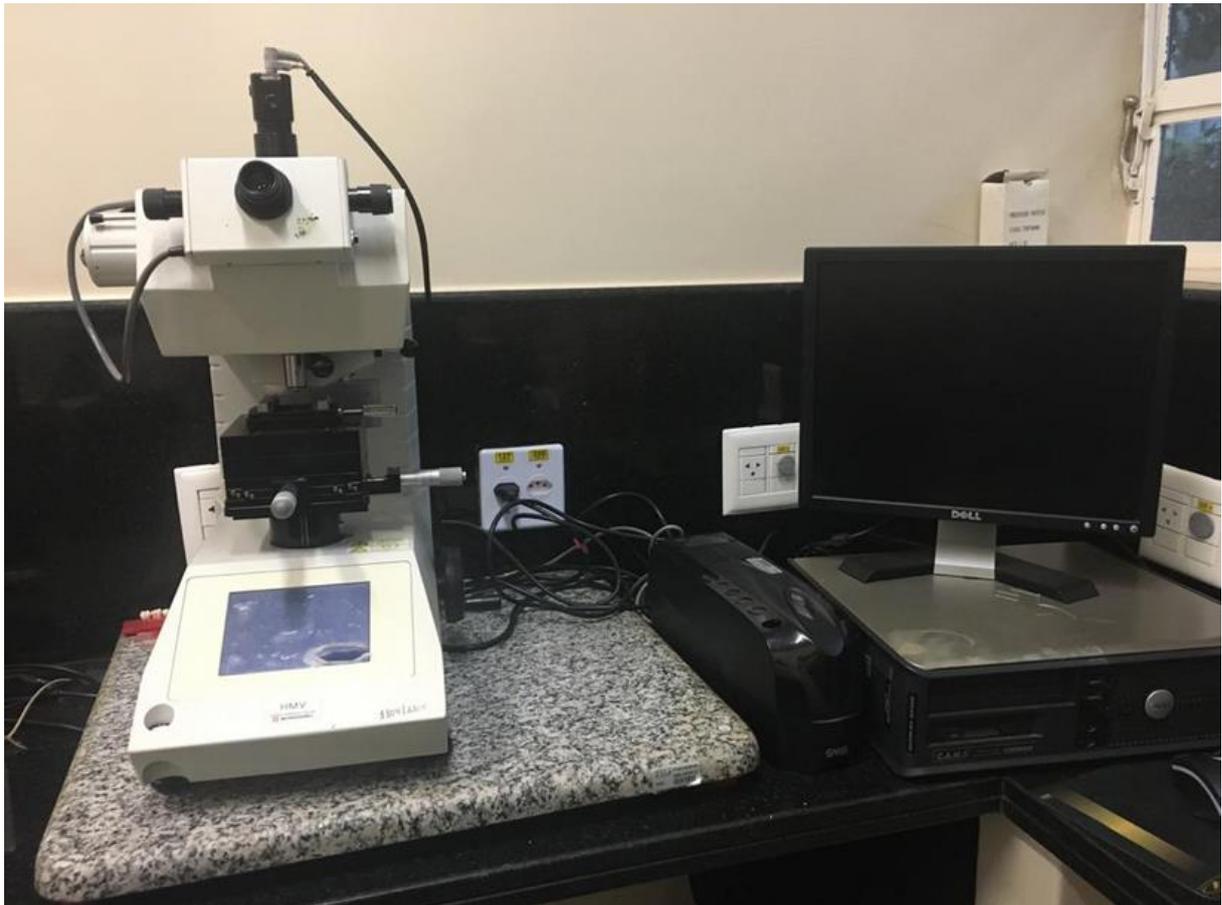
Nesta fase, diferentes métodos de análises foram empregados com o intuito de avaliar a eficácia e influência dos tratamentos nas propriedades mecânicas, químicas, biológicas e na resistência adesiva da dentina.

4.3.1 Microdureza Knoop longitudinal

Dez espécimes ($n = 10$) de cada grupo foram avaliados quanto à microdureza longitudinal da dentina após a indução da lesão de cárie e realização dos diferentes tratamentos. Os espécimes de dentina foram cortados ao meio em ângulo de 90° com a superfície vestibular com auxílio de máquina de cortes de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração constante. Microdurômetro do tipo Knoop (HMV-2, Shimadzu, Japão) (Figura 14) foi utilizado para as mensurações

utilizando-se carga de 10 gramas durante 10 segundos. Foram realizadas 10 indentações por espécime, distribuídas em 2 colunas distantes aproximadamente 100 μm entre si. Portanto, duas indentações foram realizadas nas seguintes profundidades: 40, 80, 120, 160 e 200 μm . O referencial para mensuração da profundidade foi a superfície externa da lesão de cárie.

Figura 14 – Microdurômetro com indentador do tipo Knoop localizado no Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP, da Universidade de São Paulo – USP.



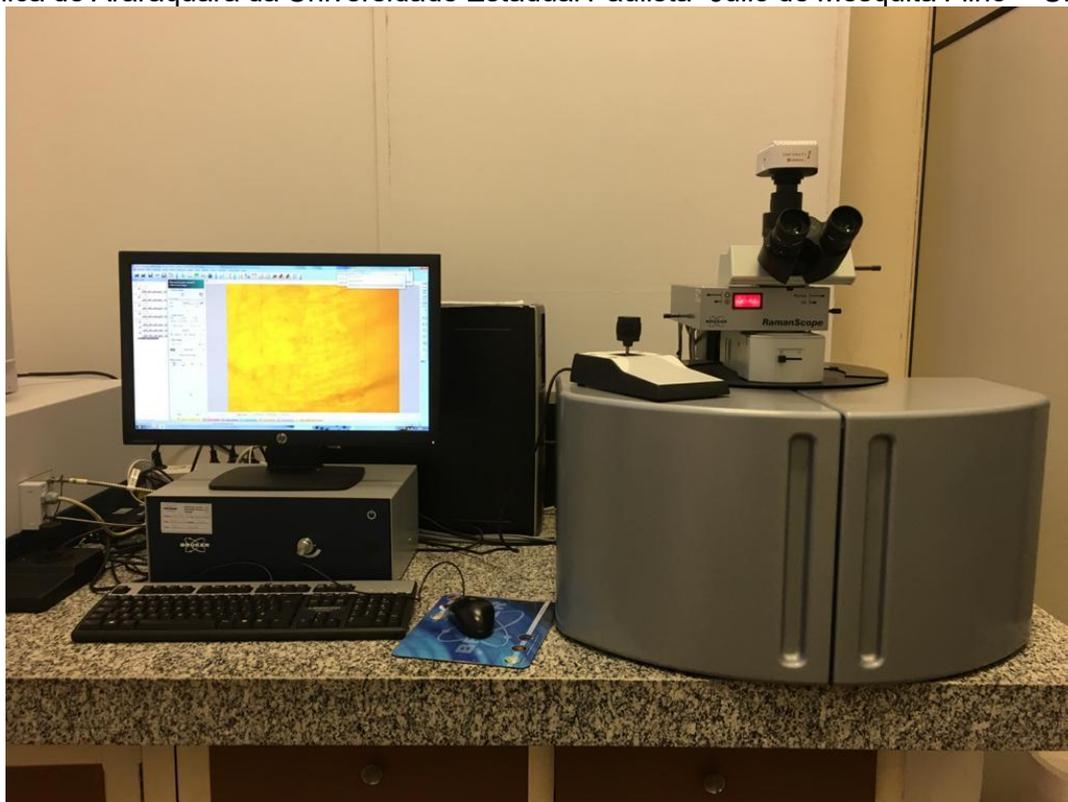
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.2 Microscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman)

As avaliações dos componentes orgânicos e inorgânicos presentes na dentina foram realizadas após os tratamentos, de acordo com cada grupo ($n = 6$). Foi utilizado o Microscópio Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) modelo Raman Scope III (Bruker Optics Inc., Karlsruhe, Alemanha, número de série: DE84716930) do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de

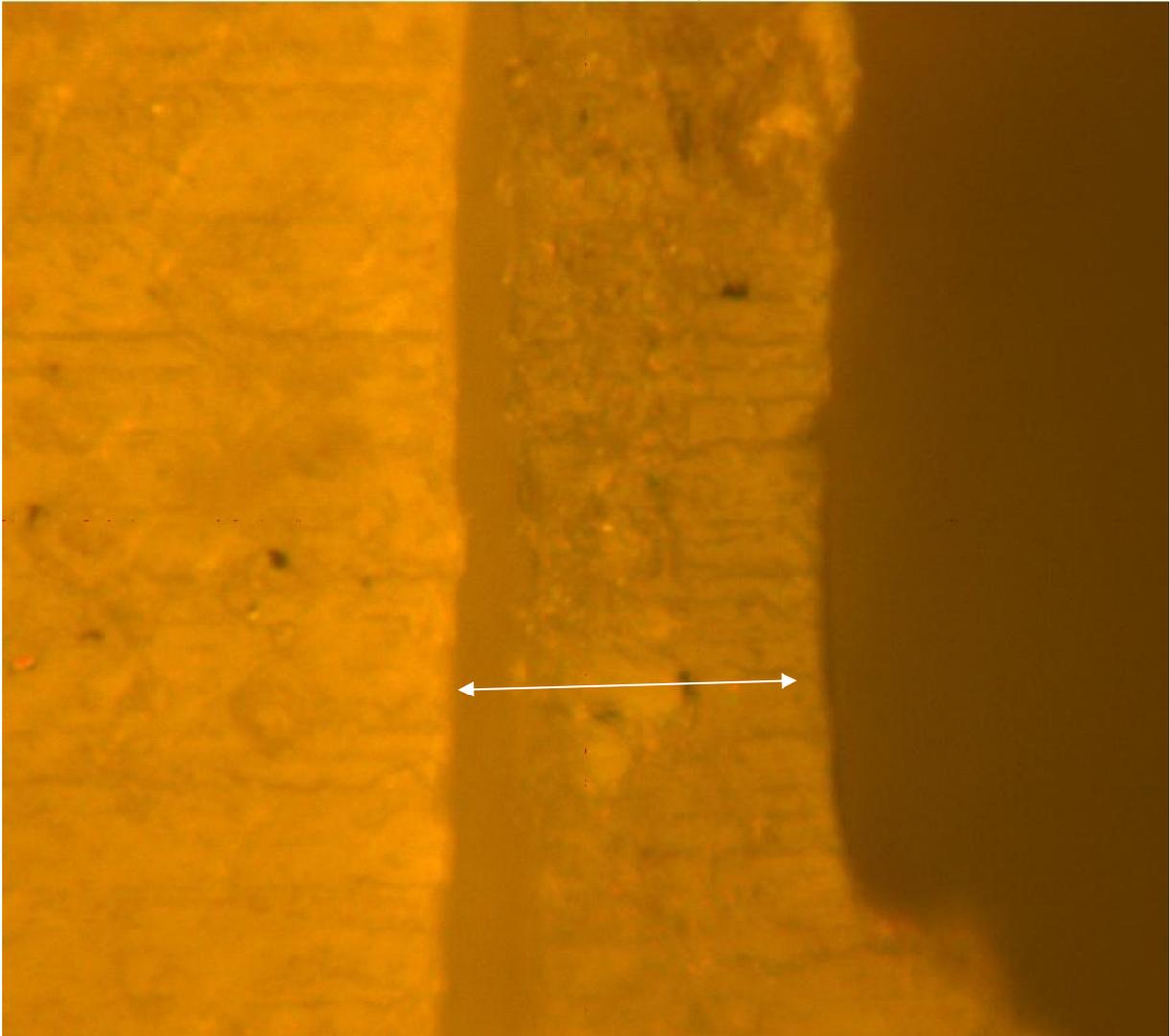
Mesquita Filho” – UNESP (Figura 15). O microscópio apresenta detector de germânio e laser em comprimento de onda de 1064 nm com potência máxima de 1000 mW. Os espécimes de dentina foram excitados por laser de Nd: YAG refrigerado a ar ($\lambda = 1064,1$ nm) com potência de 200 mW. Resolução espectral foi fixada em 4 cm^{-1} . Para cada espécime de cada grupo, um espectro na profundidade de $40\ \mu\text{m}$ e outro na profundidade de $200\ \mu\text{m}$ foram coletados por 150 varreduras para cada área (Figura 16). Alterações nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina foram analisados comparando-se as áreas integradas dos picos Raman centrados em 350 a 542 cm^{-1} (fosfato), 870 a 1125 cm^{-1} (carbonato) e 2750 a 3100 cm^{-1} (ligações CH). As áreas integradas dos picos foram calculadas pelo software LabSpec 6 Spectroscopy Suite (Horiba Instruments Brasil Ltda., Jundiaí, SP, Brasil)⁷.

Figura 15 – Microscópio Raman com transformada de Fourier localizado no Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 16 – Imagem representativa de espécime analisado no microscópio Raman com transformada de Fourier. Seta indica a dentina afetada por cárie.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.3 Microscopia confocal de varredura a laser (MC)

As análises foram realizadas utilizando o microscópio de fluorescência confocal com Airyscan (LSM 800, Carl Zeiss, Alemanha, número de série: 120L-80034) do Laboratório de Microscopia de Fluorescência Confocal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP. Os espécimes de dentina foram imersos em 1000 μ L de água destilada contendo o corante LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 30 minutos e lavados duas vezes com PBS durante 2 minutos para posterior análise. Este corante consiste em um kit composto por dois corantes que devem ser misturados previamente ao uso, sendo

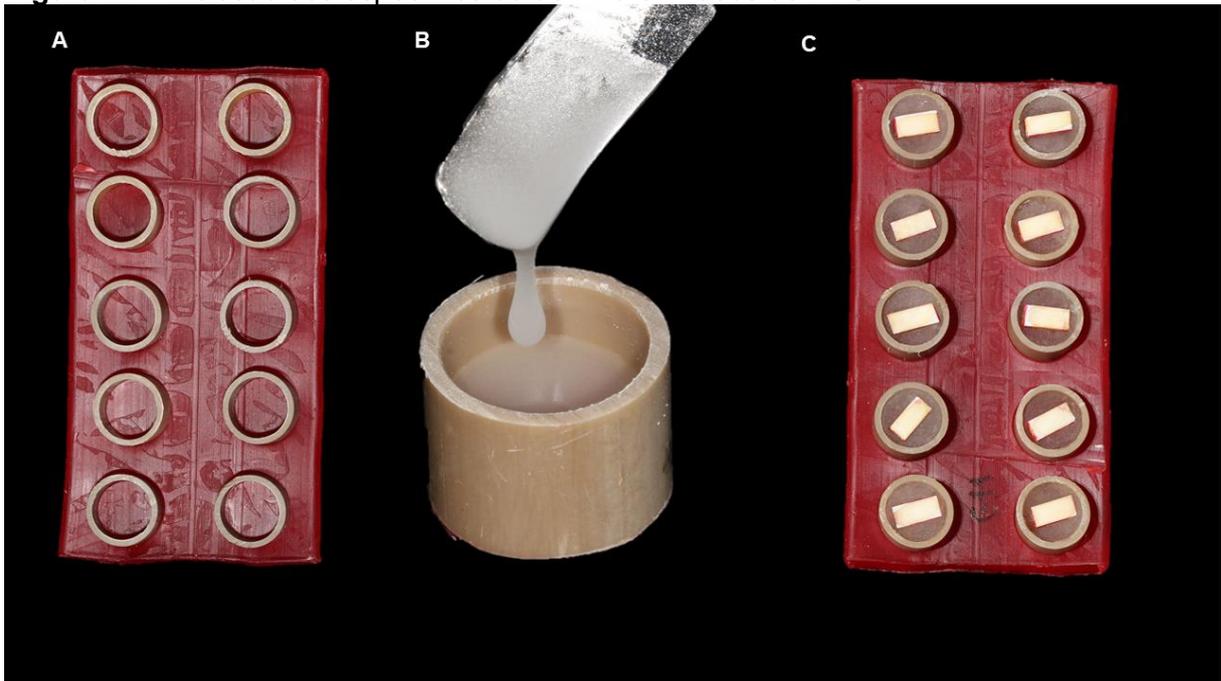
eles: SYTO 9 (1µL) e iodeto de propídio (IP, 1µL) para cada 1000µL. SYTO 9 cora as bactérias de verde (marcador para ácido nucléico), enquanto o IP penetra nas membranas danificadas corando-as de vermelho, permitindo identificar, dessa forma as células viáveis (verdes) e não viáveis (vermelha). Foram utilizadas objetivas de 20x e 63x com faixa de excitação em 488 nm (SYTO) e um filtro de passagem de 505 nm e excitação em 561nm (IP) com filtro de passagem em 610 nm foram usados para detectar fluorescência.

Para verificar a viabilidade celular em profundidade nos túbulos dentinários, os espécimes foram cortados longitudinalmente após os tratamentos com auxílio de uma máquina de corte de precisão sob irrigação (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), a fim de obter *slices* de 500 µm de espessura. Em seguida, os *slices* de dentina foram polidos manualmente com o auxílio de lixas de carboneto de silício (#600, #1200 e #1500, Wetordry™, 3M™, St. Paul, MN, EUA) até atingirem espessura de aproximadamente 200 µm. Após, os espécimes foram imersos em solução de rodamina B à 0,1% e armazenados a 37°C ± 1°C durante 12 horas²⁶¹. Em seguida, os espécimes foram removidos da solução, lavados com PBS duas vezes e corados com o kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) conforme mencionado anteriormente. Utilizou-se objetivas de 10x com faixa de excitação de 656 – 700 nm para a rodamina B. Para o IP e SYTO 9, os mesmos parâmetros anteriores foram utilizados.

4.3.4 Preparo dos corpos de prova de resina composta

Os espécimes dentina nas dimensões de 13x7x2mm após os diferentes tratamentos foram incluídos em tubos de PVC contendo resina acrílica autopolimerizável (Figura 17). Em seguida, dois corpos de prova de resina composta foram confeccionados sobre o substrato dentinário.

Figura 17 – Inclusão dos espécimes de dentina em tubos de PVC.

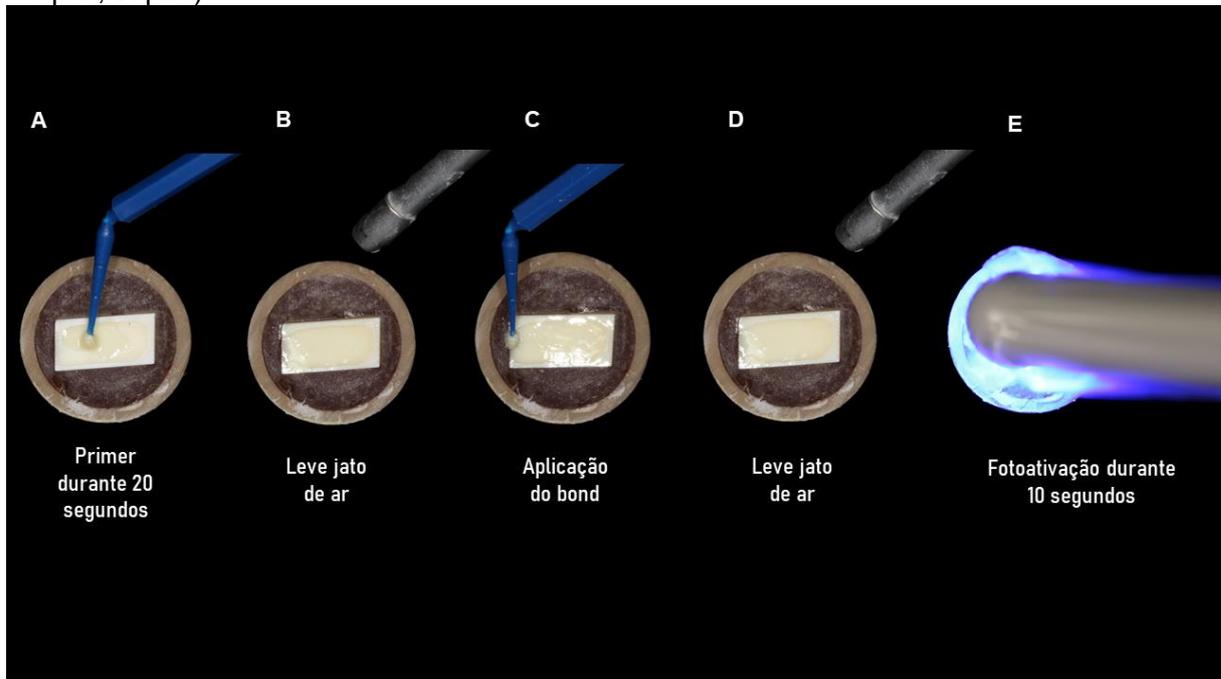


A) Tubos de PVC estabilizados em placa de cera utilidade. B) Preenchimento dos tubos de PVC com resina acrílica autopolimerizável. C) Espécimes de dentina bovina acomodados sobre a resina acrílica ao nível da superfície do tubo de PVC.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para tanto, aplicou-se em toda a superfície da dentina, após os tratamentos de remoção/descontaminação/remineralização, adesivo autocondicionante de dois passos (Clearfil SE Bond, Kuraray Noritake Dental Inc., Tóquio, Japão). Primeiramente aplicou-se o primer com auxílio de microaplicador e após 20 segundos, leve jato de ar foi aplicado. Em seguida, aplicou-se o bond seguido de leve jato de ar e fotoativação durante 10 segundos (Figura 18).

Figura 18 – Estratégia adesiva aplicada na superfície dentinária dos espécimes utilizando adesivo autocondicionante de dois passos (Clearfil SE Bond, Kuraray Noritake Dental Inc., Tóquio, Japão).

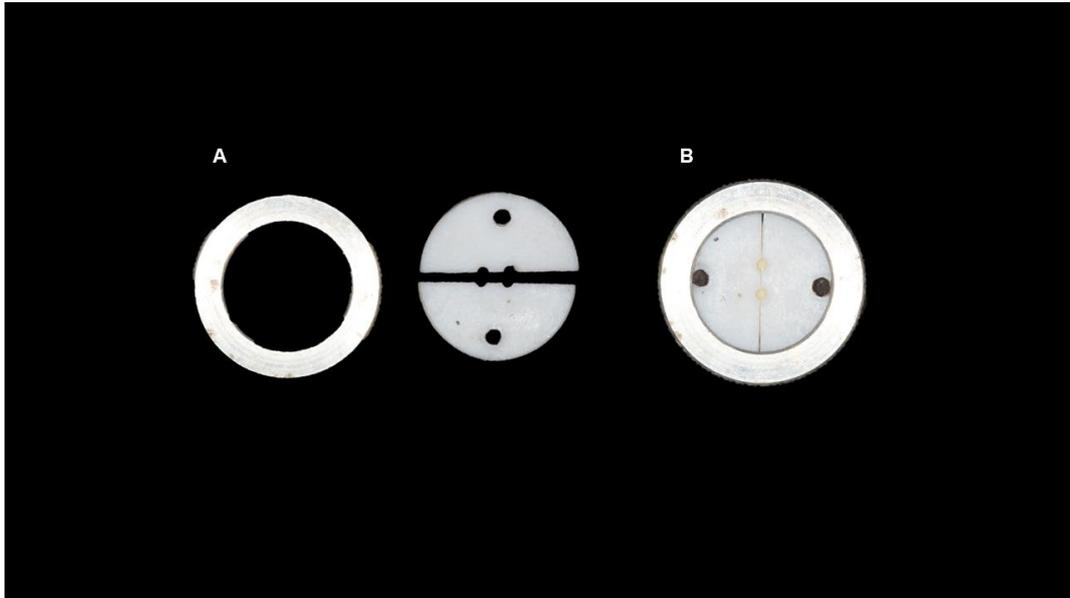


A) Aplicação de primer. B) Jato de ar. C) Aplicação do *bond*. D) Jato de ar. E) Fotoativação durante 10 segundos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Finalizado a hibridização da dentina, foram confeccionados dois cilindros de resina composta (Filtek™ Z350 XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA, Lote número: 1929400076) com o auxílio de uma matriz bipartida de teflon e espátula de inserção (Figura 19). Durante a inserção da resina composta, tomou-se cuidado para compactação da mesma na superfície dentinária, a fim de evitar possíveis bolhas e/ou falhas no incremento (Figura 20A). Após, os cilindros de resina composta foram fotoativados durante 40 segundos utilizando fotoativador a base de luz LED (LED Radian Plus, SDI, Austrália) emitindo irradiância de 1200 mW/cm² (Figura 20B).

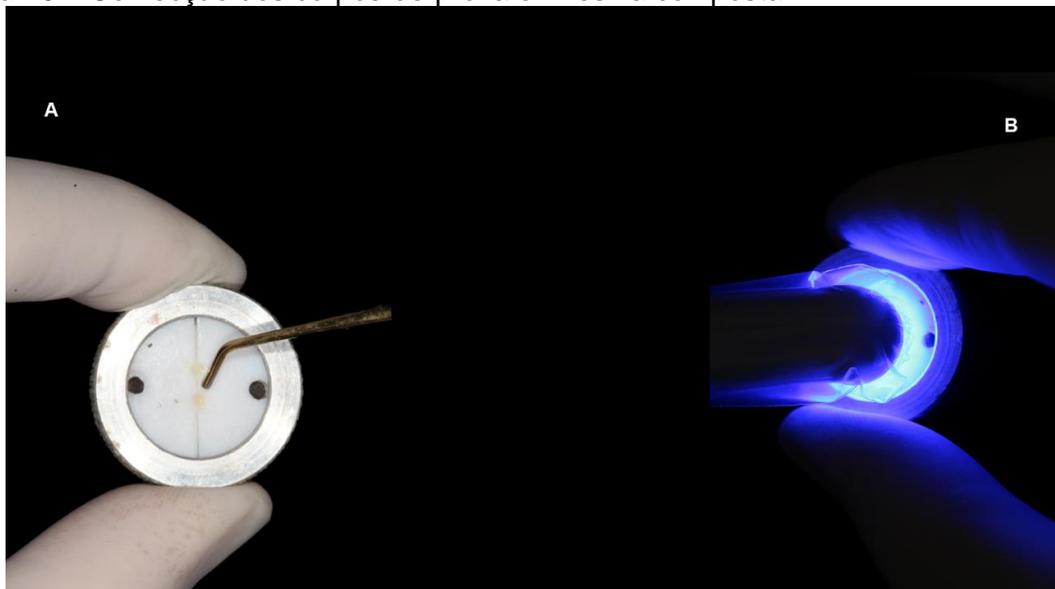
Figura 19 – Sistema de matriz utilizado para confecção dos corpos de prova de resina composta.



A) A matriz consiste de um anel metálico e um disco de teflon bipartido contendo dois orifícios. B) Disco de teflon bipartido unido sobre a superfície dentinária com o auxílio do anel metálico, formando os orifícios preenchidos posteriormente com resina composta.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 20 – Confecção dos corpos-de-prova em resina composta.

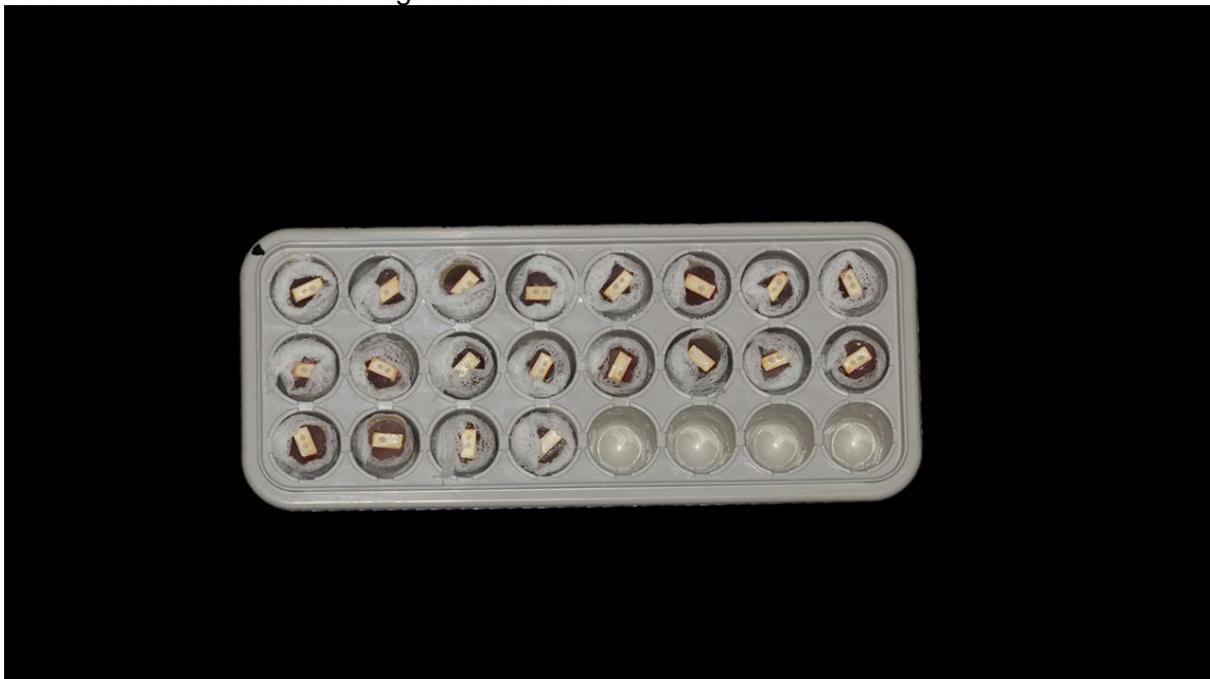


A) Inserção da resina composta no interior dos orifícios da matriz de teflon com auxílio de espátula. B) Fotoativação dos incrementos de resina composta durante 40 segundos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Finalizado a confecção dos corpos de prova, os espécimes incluídos nos tubos de PVC foram armazenados em estufa a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e em ambiente úmido por meio de gaze esterilizada umedecida em água destilada durante 24 horas (Figura 21).

Figura 21 – Espécimes de dentina contendo os corpos de prova de resina composta armazenados em recipiente plástico e ambiente úmido por meio da utilização de gaze esterilizada umedecida com água destilada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.5 Resistência adesiva

A avaliação da resistência adesiva empregou a metodologia de ensaio de microcisalhamento descrito por Shimada²⁶² et al (2002). Para tanto, os espécimes de dentina incluídos nos tubos de PVC foram acoplados em máquina de ensaio universal (EMIC DL2000, São José dos Pinhais, PR, Brasil), equipada com célula de carga de 500 N. Em seguida, cada corpo de prova de resina composta foi envolvido por um fio metálico (0.2 mm de diâmetro) alinhado cuidadosamente de modo que a carga fosse aplicada o mais próximo possível da interface de união. A carga foi aplicada com velocidade de 0,5mm/min até a falha dos corpos de prova. O resultado foi dado pela força (F) máxima (expressa em N) dividida pela área (A) de união (expressa em mm²) e expresso em MPa, por meio da fórmula $MPa = F/A$.

4.3.6 Padrão de falha

Após o teste de microcisalhamento e a falha dos espécimes, a interface resina composta/adesivo/dentina foi verificada com auxílio de um estereomicroscópio (Modelo Leica M80, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha, número de série:

5670986) em aumento de 4x com o objetivo de determinar o modo de falha e classificá-lo dentre os seguintes tipos: 1) adesiva, ao nível da interface de união, podendo haver presença de falha coesiva no adesivo; 2) coesiva em dentina, ruptura deste substrato; 3) coesiva na resina composta, ruptura da resina composta; 4) mista, associação de falha adesiva e coesiva na dentina e ou na resina composta. Posteriormente, 3 espécimes serão aleatoriamente selecionados e avaliados por microscópio eletrônico de varredura (JSM 7500F, JEOL, Tóquio, Japão, número de série: SM17510027), utilizando 15kV e aumento de 100x, 2000x e 5000x. Para os diferentes períodos de avaliação, os espécimes serão desidratados em soluções de etanol por 20 minutos em diferentes concentrações (50, 60, 70, 80 e 90%). Posteriormente, permanecerão por 60 minutos em etanol a 100%. Os espécimes serão secos à temperatura ambiente durante 12 horas e na sequência fixados em “stubs” de alumínio e revestidos por liga de ouro-paládio (Desk II, Denton Vacuum, Moorestown, NJ, EUA) para então serem fotografados.

4.4 Análise Estatística

Inicialmente os dados foram submetidos à avaliação dos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade por meios dos testes de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Considerando que todos os grupos de estudo apresentaram distribuição normal ($p \geq 0,05$), análise paramétrica dos dados de DL, FT-Raman e resistência adesiva foi possível de ser realizada. Sendo assim, aplicou-se análise de variância (ANOVA) dois fatores (tratamento e profundidade) seguida de comparações múltiplas entre os grupos por meio do pós-teste de Tukey para os dados de DL e FT-Raman. Entretanto, os dados de resistência adesiva apresentaram heteroscedasticidade ($p \geq 0,05$). Sendo assim, ANOVA um fator seguido de pós teste de Games-Howell foi utilizado.

Todas as análises foram realizadas em nível de significância de 5%. Os softwares estatísticos SPSS version 22 (IBM Corporation, Nova York, NY, EUA) e GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) foram utilizados para a análise dos dados e confecção de gráficos. Os dados de MC, padrão de falha e MEV foram analisados qualitativamente, enquanto que os dados de MT foram submetidos apenas a obtenção da média aritmética.

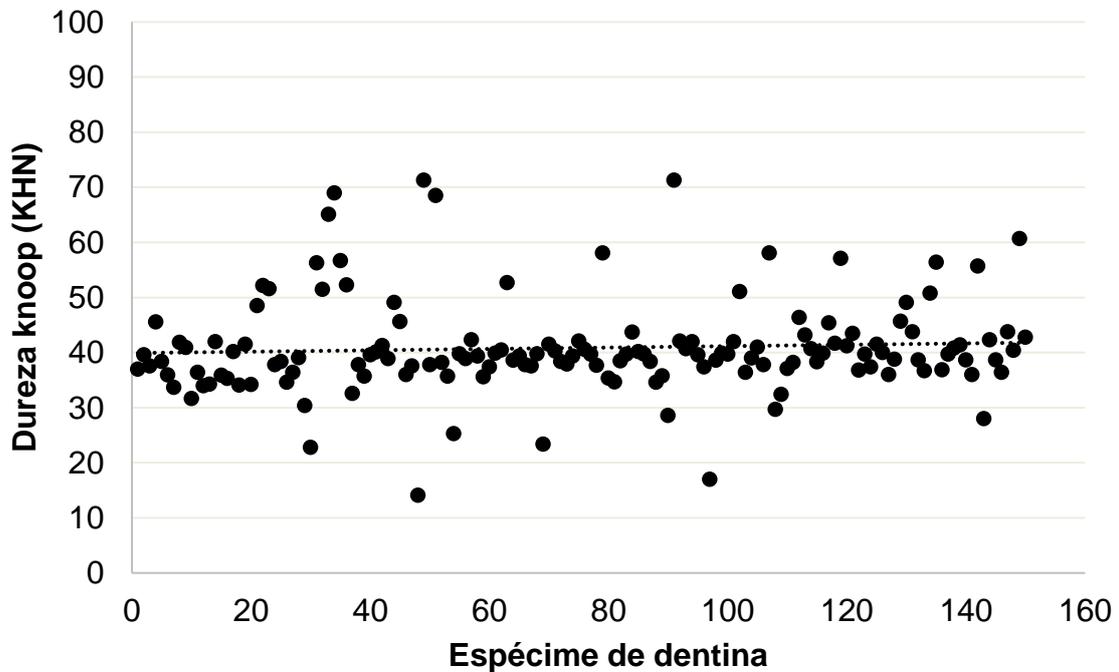
5 RESULTADOS

5.1 Fase Inicial

5.1.1 Microdureza Knoop superficial

Obteve-se a média aritmética das três indentações para cada espécime, sendo incluídos no estudo somente os espécimes que apresentaram dureza entre 10 KHN a mais ou a menos em relação à média geral. De acordo com os resultados, a média geral obtida foi de 40,86 KHN com desvio padrão de 8,74 KHN (Figura 22).

Figura 22 – Diagrama de dispersão da dureza Knoop superficial dos espécimes de dentina (N = 160).



Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida (CBM)

Para a determinação da CIM e CBM, foi utilizado a resazurina para indicar em quais poços houve inativação celular por meio de análise visual. Sendo assim, os poços corados em violeta/laranja indicam presença de células viáveis, ou seja, o tratamento realizado não foi capaz de inativar os microrganismos presentes em sua

forma planctônica. Em contrapartida, os poços corados em azul indicam ausência de células viáveis e sugerem que o tratamento inativou os microrganismos. Desta forma, a CIM é definida como a menor concentração capaz de inativar as células, ou seja, a menor concentração que apresentou mudança de coloração para azul após reagir com a resazurina.

Após a conclusão dos experimentos, observou-se que o grupo contendo os meios de cultura (BHI e MRS caldo) e os microrganismos seguidos de irradiação de luz apresentaram viabilidade celular e demonstram que a irradiação de luz sozinha não é capaz de promover efeito antibacteriano. Nos grupos tratados apenas com micelas de Pluronic® F-127 também não foi observada inativação bacteriana, evidenciando que as micelas por si só não são capazes de promover qualquer efeito de inativação contra as células, independentemente da presença ou ausência de irradiação. O grupo contendo apenas os meios de cultura indicou ausência de células viáveis e comprova que não houve contaminação dos meios durante o experimento. Já o grupo controle positivo, nos quais os microrganismos em cultura planctônica foram tratados com clorexidina à 0,12%, observou-se coloração azul dos poços e indicam inativação dos microrganismos. Este resultado já era esperado, visto que a clorexidina é considerada *padrão ouro* como agente antibacteriano.

Observou-se também que apenas um grupo de tratamento não exibiu mudança de coloração, sendo ele respectivo ao grupo tratado com curcumina na concentração de 270 µM associada ao DMSO e irradiada por LED azul. Sendo assim, a CIM foi definida como 270 µM. Entretanto, os grupos tratados com curcumina incorporada às micelas de Pluronic® F-127 não apresentaram inativação bacteriana em nenhuma das concentrações avaliadas, tornando impossível a determinação da CIM.

Para determinar a CBM, as suspensões dos poços que não apresentaram mudança de coloração foram plaqueadas em meios de cultura apropriados para cada microrganismo (BHI ágar para *S. mutans* e MRS ágar para *L. acidophilus*). Após 72 horas, a concentração que exibisse nenhum crescimento seria considerada a CBM. Após o plaqueamento, ambas, CIM e CBM, foram definidas como 270 µM, visto que esta concentração foi a mínima que promoveu inativação, mas que ao mesmo tempo foi capaz de reduzir o inóculo em 99,9%. Portanto, os experimentos futuros envolvendo aplicação de TFDA foram realizadas com curcumina na concentração de 270 µM e associada ao solvente DMSO.

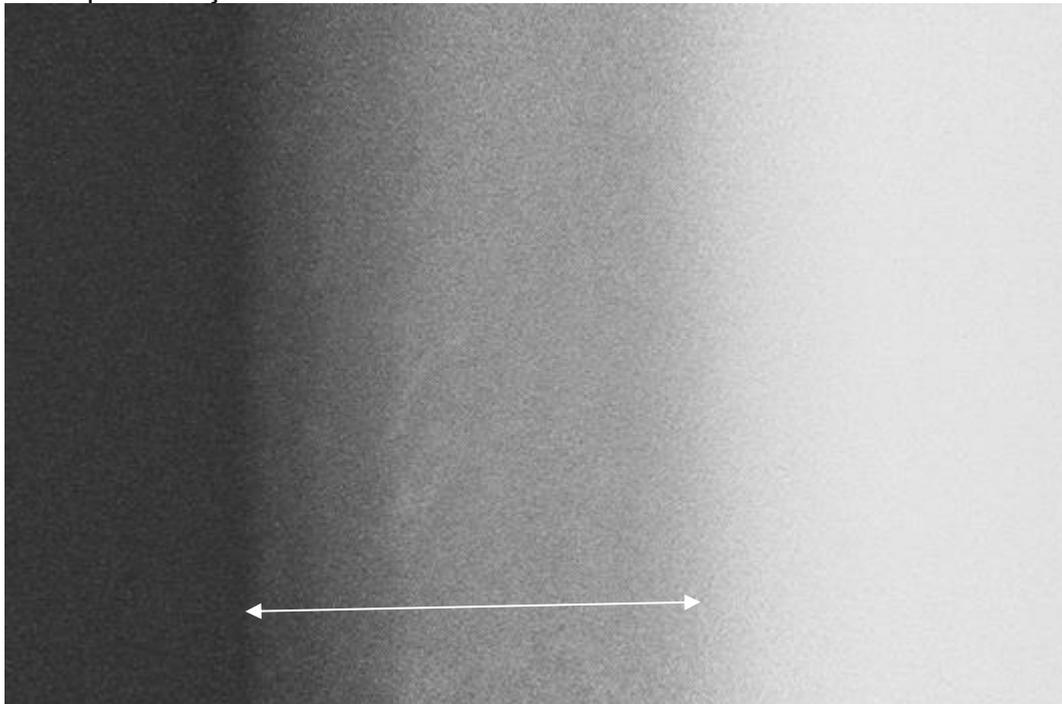
5.1.3 Microradiografia transversal

No presente estudo a análise de microradiografia transversal teve como objetivo confirmar a formação das lesões de cárie, assim como mensurar a profundidade das mesmas. Além disso, a microradiografia transversal foi útil para investigar a padronização na formação das lesões a fim de evitar possíveis vieses relacionados às lesões.

A Figura 23 confirma que o protocolo de indução artificial de cárie foi capaz de formar uma lesão de cárie, visto que se observa uma extensa zona radiolúcida sugestiva de tecido dentinário desmineralizado proveniente da indução artificial de lesão de cárie.

Quinze amostras foram avaliadas a fim de obter uma média das lesões formadas. Sendo assim, a profundidade média das lesões foi de $213,9 \pm 49,5 \mu\text{m}$. Já a porcentagem de perda mineral foi de $4929,3 \text{ \%vol.}\mu\text{m}$ (Tabela 2).

Figura 23 – Imagem representativa de microradiografia transversal da dentina após indução artificial de cárie. A seta indica a zona radiolúcida resultante do processo de desmineralização ocasionado pela indução artificial de lesão de cárie.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da perda mineral (vol%. μm) e profundidade das lesões (μm) dos espécimes de dentina após indução artificial de cárie durante 7 dias e avaliação por meio de microradiografia transversal (n = 15).

Espécime	Perda mineral ΔZ (%vol.μm)	Profundidade (μm)	R ($\Delta Z/\mu\text{m}$)
1	5710	229,4	24,9
2	5520	198,6	27,8
3	5610	265,3	21,1
4	4530	200,8	22,6
5	5090	251,2	20,3
6	4500	220,0	20,5
7	4850	270,2	18,0
8	2050	102,0	20,1
9	4410	176,4	25,0
10	6200	267,4	23,2
11	3790	145,7	26,0
12	4840	207,6	23,3
13	5610	170,4	32,9
14	5010	243,3	20,6
15	6220	260,6	23,9
Média	4929,3	213,9	23,3
Desvio padrão	1049,3	49,5	3,7

Fonte: Elaboração própria.

Sendo assim, a microradiografia transversal confirmou que o protocolo de indução e o tempo de 7 dias foram adequados para a formação das lesões e evidenciou uma profundidade suficiente para a realização dos experimentos futuros.

5.2 Fase Experimental

5.2.1 Microdureza Knoop longitudinal

De acordo com a Tabela 3, os dados de microdureza da dentina após os diferentes tratamentos revelam uma tendência geral em que a microdureza dos espécimes de um mesmo grupo aumenta em função da profundidade, independentemente do grupo avaliado ($p < 0,05$). Sendo assim, observa-se

microdureza menor nas profundidades iniciais e um aumento gradativo dos valores, até atingir microdureza maior na profundidade final (200 μm).

Quando se compara os diferentes tipos de tratamentos em uma mesma profundidade, os valores diferem de acordo com o grupo. O grupo controle representado pela lesão de cárie sem qualquer tipo de tratamento apresentou os menores valores de microdureza (8,49 – 15,93 KHN). Tal resultado já era esperado, visto que a perda mineral ocasionada pelo processo de formação da lesão de cárie diminuiria drasticamente em relação à uma dentina hígida. Ademais, o grupo de dentina hígida apresentou um dos maiores valores de microdureza independentemente da profundidade (37,58 – 53,67 KHN), sendo de fato o valor mais alto para as profundidades de 40 e 80 μm (37,58 e 44,98 KHN, respectivamente).

Em relação aos métodos de remoção das lesões de cárie, os resultados explicitam que os grupos removidos com FR (24,40 – 63,03 KHN) apresentam dureza maior em comparação aos removidos com ULT (20,01 – 47,53 KHN), independentemente da profundidade avaliada ($p < 0,05$) ou da associação com métodos de descontaminação e agentes remineralizantes.

Quando os métodos de remoção foram associados à TFDA como método de descontaminação dentinária, observou-se que a TFDA não promoveu nenhum efeito significativo na microdureza ($p > 0,05$), exceto entre os grupos ULT e ULT+TFDA na profundidade de 200 μm (47,53 e 53,31 KHN, respectivamente; $p < 0,05$).

A associação entre remoção com FR e vidros bioativos evidenciou que não houve diferença entre 45S5 e F-18 ($p > 0,05$) independentemente da profundidade. No entanto, na associação entre ULT e os vidros bioativos, os resultados revelam diferenças pontuais em determinadas profundidades ($p < 0,05$) nas quais o vidro F-18 apresentou valores maiores em relação ao vidro 45S5.

Nos grupos onde associou-se métodos de remoção, descontaminação e agentes bioativos, também foram observadas diferenças pontuais ($p < 0,05$) que sugerem uma dureza maior para os grupos que receberam a aplicação do agente bioativo F-18. Comparando-se os grupos FR+TFDA+F-18 e FR+TFDA+45S5, apenas na profundidade de 40 μm não foi observado diferença significativa (27,78 e 26,41, respectivamente; $p > 0,05$). Nas demais profundidades, o grupo FR+TFDA+F-18 apresentou microdureza superior à FR+TFDA+45S5 ($p < 0,05$). De maneira similar, ULT+TFDA+F-18 apresentou maiores valores em comparação a ULT+TFDA+45S5

nas profundidades de 40 (17,75 e 14,78 KHN), 120 (36,41 e 32,51 KHN) e 200 μm (49,04 e 45,76 KHN) ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Média \pm desvio padrão da dureza Knoop longitudinal (KHN) da dentina em diferentes profundidades (μm) ($n = 10$). ANOVA dois fatores seguido de pós teste de Tukey. Legendas: FR (fresa), ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5), F-18 (vidro bioativo F-18).

Grupos	Profundidade (μm)				
	40	80	120	160	200
Lesão de cárie	8,49 \pm 1,26 ^{E,f}	10,97 \pm 2,00 ^{D,g}	11,98 \pm 1,64 ^{CD,h}	13,78 \pm 1,15 ^{BC,h}	15,93 \pm 1,74 ^{A,g}
Dentina hígida	37,58 \pm 3,96 ^{D,a}	44,98 \pm 1,40 ^{C,a}	47,70 \pm 2,73 ^{B,a}	49,60 \pm 2,32 ^{AB,bc}	53,67 \pm 4,38 ^{A,cde}
FR	24,40 \pm 2,67 ^{A,bc}	38,92 \pm 3,50 ^{B,b}	49,61 \pm 6,29 ^{C,ab}	57,12 \pm 5,06 ^{D,a}	63,03 \pm 4,63 ^{E,a}
FR+TFDA	26,13 \pm 2,64 ^{A,b}	39,50 \pm 4,49 ^{B,b}	51,65 \pm 3,94 ^{C,a}	58,46 \pm 5,27 ^{D,a}	64,77 \pm 6,16 ^{E,a}
ULT	20,01 \pm 4,00 ^{A,d}	30,51 \pm 7,12 ^{B,cde}	35,17 \pm 4,43 ^{C,ef}	40,67 \pm 4,28 ^{D,efg}	47,53 \pm 4,83 ^{E,ef}
ULT+TFDA	20,38 \pm 2,13 ^{A,cd}	28,76 \pm 3,07 ^{B,de}	36,32 \pm 1,87 ^{C,e}	44,105 \pm 2,75 ^{D,de}	53,31 \pm 2,47 ^{E,cd}
FR+F-18	24,69 \pm 2,11 ^{A,b}	32,70 \pm 1,37 ^{B,c}	40,73 \pm 1,35 ^{C,c}	49,07 \pm 1,71 ^{D,bc}	55,41 \pm 1,79 ^{E,cd}
FR+TFDA+F-18	27,78 \pm 1,95 ^{A,b}	37,65 \pm 1,54 ^{B,b}	43,62 \pm 1,50 ^{C,b}	50,03 \pm 1,87 ^{D,b}	58,40 \pm 2,11 ^{E,ab}
FR+45S5	24,48 \pm 1,63 ^{A,b}	32,63 \pm 1,63 ^{B,cd}	39,05 \pm 1,60 ^{C,cd}	47,39 \pm 1,00 ^{D,cd}	56,61 \pm 1,02 ^{E,bc}
FR+TFDA+45S5	26,41 \pm 1,27 ^{A,b}	33,58 \pm 1,55 ^{B,c}	39,02 \pm 1,15 ^{C,cd}	43,26 \pm 1,17 ^{D,e}	52,40 \pm 1,77 ^{E,d}
ULT+F-18	17,34 \pm 1,65 ^{A,d}	23,68 \pm 2,34 ^{B,f}	35,1 \pm 1,30 ^{C,ef}	37,59 \pm 1,95 ^{D,g}	43,63 \pm 3,88 ^{E,f}
ULT+TFDA+F-18	17,75 \pm 1,90 ^{A,d}	25,41 \pm 2,11 ^{B,ef}	36,41 \pm 2,16 ^{C,de}	42,39 \pm 1,58 ^{D,ef}	49,04 \pm 1,34 ^{E,e}
ULT+45S5	13,64 \pm 0,92 ^{A,e}	23,44 \pm 2,44 ^{B,f}	30,87 \pm 2,11 ^{C,g}	37,07 \pm 1,58 ^{D,g}	45,97 \pm 2,95 ^{E,f}
ULT+TFDA+45S5	14,78 \pm 2,17 ^{A,e}	23,32 \pm 2,21 ^{B,f}	32,51 \pm 2,13 ^{C,fg}	39,49 \pm 2,93 ^{D,fg}	45,76 \pm 3,35 ^{E,f}

* Letras maiúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significante entre as profundidades de um mesmo grupo ($p \leq 0,05$). ** Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significante entre os grupos em uma mesma profundidade ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.2.2 FT-Raman

A análise de FT-Raman foi realizada com o intuito de verificar as alterações nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina após os diferentes tratamentos. Três picos foram analisados, centrados nas áreas relacionadas ao fosfato, carbonato e ligações CH. Os dados foram analisados dentro de um mesmo pico, a fim de verificar diferenças entre os grupos, e entre as duas profundidades de um mesmo grupo. A média e desvio padrão da área integral dos diferentes picos e profundidades estão apresentadas na Tabela 4.

Para o componente fosfato não foi observado nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos assim como entre as profundidades. Portanto, os tratamentos promoveram o mesmo efeito no que diz respeito a quantidade identificada de fosfato.

Já para o componente carbonato, algumas diferenças pontuais foram observadas. Na profundidade de 200 μm houve diferença entre os grupos FR+TFDA e ULT+TFDA+45S5, apresentando área integral de 0,0355 e 0,0003 respectivamente ($p < 0,05$). Desta forma o grupo FR+TFDA apresentou maior quantidade de carbonato após o tratamento. As demais comparações não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Quando as ligações C-H foram avaliadas, novamente diferenças pontuais foram observadas. Diferença estatística significativa foi observada entre os grupos FR e ULT+TFDA, com área integral de 0,1869 e 0,0457 respectivamente ($p < 0,05$), na profundidade de 40 μm . Não foi observada nenhuma diferença significativa nas demais comparações intra e intergrupo ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Média \pm desvio padrão da área integral dos diferentes picos e profundidades (n = 6). Legendas: FR (fresa), ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5), F-18 (vidro bioativo F-18).

Grupos	Picos do Raman					
	Fosfato (350 – 542 cm ⁻¹)		Carbonato (870 – 1125 cm ⁻¹)		Ligações C-H (2750 – 3100 cm ⁻¹)	
	40 μ m	200 μ m	40 μ m	200 μ m	40 μ m	200 μ m
Lesão de cárie	0.0079 \pm 0.0108 ^{A,a}	0.0032 \pm 0.0220 ^{A,a}	0.0108 \pm 0.0152 ^{A,a}	0.0046 \pm 0.0068 ^{AB,a}	0.0178 \pm 0.0242 ^{AB,a}	0.0035 \pm 0.0338 ^{A,a}
Dentina hígida	0.0136 \pm 0.0083 ^{A,a}	0.0186 \pm 0.0141 ^{A,a}	0.0303 \pm 0.0187 ^{A,a}	0.0150 \pm 0.0175 ^{AB,a}	0.0389 \pm 0.0160 ^{AB,a}	0.0283 \pm 0.0278 ^{A,a}
FR	0.0275 \pm 0.0249 ^{A,a}	0.0574 \pm 0.0331 ^{A,a}	0.2472 \pm 0.1242 ^{A,a}	0.2516 \pm 0.1343 ^{AB,a}	0.1869 \pm 0.0841 ^{A,a}	0.2154 \pm 0.1143 ^{A,a}
FR+TFDA	0.0096 \pm 0.0527 ^{A,a}	0.0106 \pm 0.0301 ^{A,a}	0.0148 \pm 0.0312 ^{A,a}	0.0355 \pm 0.0541 ^{A,a}	0.2163 \pm 0.4294 ^{AB,a}	0.4988 \pm 0.9863 ^{A,a}
ULT	0.0373 \pm 0.0254 ^{A,a}	0.0128 \pm 0.0088 ^{A,a}	0.0284 \pm 0.0282 ^{A,a}	0.0480 \pm 0.0350 ^{AB,a}	0.0399 \pm 0.0431 ^{AB,a}	0.0365 \pm 0.0187 ^{A,a}
ULT+TFDA	0.0242 \pm 0.0163 ^{A,a}	0.0284 \pm 0.0077 ^{A,a}	0.0271 \pm 0.0069 ^{A,a}	0.0341 \pm 0.0185 ^{AB,a}	0.0457 \pm 0.0064 ^{B,a}	0.0660 \pm 0.0971 ^{A,a}
FR+F-18	0.0063 \pm 0.0190 ^{A,a}	0.0095 \pm 0.0195 ^{A,a}	0.0062 \pm 0.0220 ^{A,a}	0.0215 \pm 0.0213 ^{AB,a}	0.0102 \pm 0.0416 ^{AB,a}	0.0081 \pm 0.0471 ^{A,a}
FR+TFDA+F-18	0.0128 \pm 0.0156 ^{A,a}	0.0029 \pm 0.0202 ^{A,a}	0.0158 \pm 0.0210 ^{A,a}	0.0049 \pm 0.0432 ^{AB,a}	0.0035 \pm 0.0384 ^{AB,a}	0.0089 \pm 0.0096 ^{A,a}
FR+45S5	0.0097 \pm 0.0199 ^{A,a}	0.0046 \pm 0.0148 ^{A,a}	0.0066 \pm 0.0257 ^{A,a}	0.0004 \pm 0.0303 ^{AB,a}	0.0091 \pm 0.0518 ^{AB,a}	0.0045 \pm 0.0453 ^{A,a}
FR+TFDA+45S5	0.0286 \pm 0.0186 ^{A,a}	0.0118 \pm 0.0199 ^{A,a}	0.0118 \pm 0.0139 ^{A,a}	0.0102 \pm 0.0154 ^{AB,a}	0.0043 \pm 0.0207 ^{AB,a}	0.0343 \pm 0.0514 ^{A,a}
ULT+F-18	0.0034 \pm 0.0329 ^{A,a}	0.0111 \pm 0.0139 ^{A,a}	0.0123 \pm 0.0174 ^{A,a}	0.0248 \pm 0.0360 ^{AB,a}	0.0205 \pm 0.0400 ^{AB,a}	0.0196 \pm 0.0278 ^{A,a}
ULT+TFDA+F-18	0.0036 \pm 0.0173 ^{A,a}	0.0030 \pm 0.0260 ^{A,a}	0.0147 \pm 0.0339 ^{A,a}	0.0008 \pm 0.0327 ^{AB,a}	0.0123 \pm 0.0520 ^{AB,a}	0.0078 \pm 0.0040 ^{A,a}
ULT+45S5	0.0138 \pm 0.0150 ^{A,a}	0.0097 \pm 0.0100 ^{A,a}	0.0126 \pm 0.0376 ^{A,a}	0.0125 \pm 0.0207 ^{AB,a}	0.0022 \pm 0.0694 ^{AB,a}	0.0319 \pm 0.0401 ^{A,a}
ULT+TFDA+45S5	0.0077 \pm 0.0312 ^{A,a}	0.0105 \pm 0.0196 ^{A,a}	0.0068 \pm 0.0296 ^{A,a}	0.0003 \pm 0.0160 ^{B,a}	0.0233 \pm 0.0243 ^{AB,a}	0.0279 \pm 0.0754 ^{A,a}

* Letras maiúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significativa entre os grupos na mesma profundidade de um mesmo pico ($p \leq 0,05$). ** Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significativa entre o mesmo grupo em profundidades diferentes de um mesmo pico ($p \leq 0,05$). *** ANOVA dois fatores seguido de teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.3 Microscopia confocal a laser

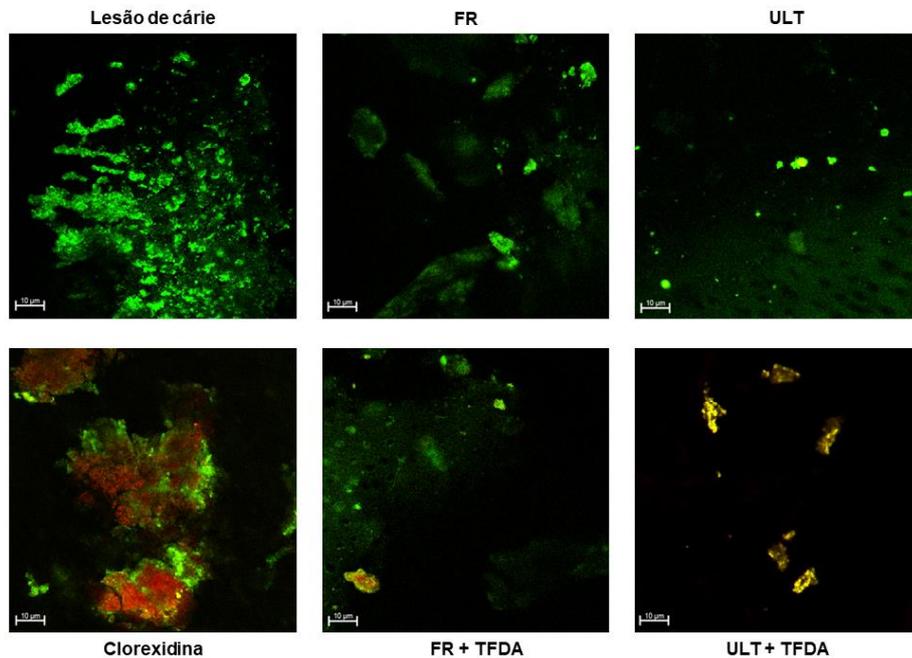
As imagens de microscopia de fluorescência confocal objetivaram ilustrar o efeito da TFDA sobre a viabilidade celular da lesão de cárie em dentina. O corante LIVE/DEAD® Baclight™ Bacterial Viability cora as células em verde e vermelho. As células em verde indicam células viáveis, enquanto que as células em vermelho indicam células não viáveis. Sendo assim, é possível observar que a imagem da dentina cariada sem qualquer tratamento evidencia grande quantidade de fluorescência verde, indicando presença de células viáveis, o que já era esperado, visto que nenhum tratamento antimicrobiano ou de remoção da lesão foi realizado (Figura 24).

O grupo controle positivo que consistia na aplicação de clorexidina 0,12% sobre a dentina foi utilizado, haja vista a conhecida e consagrada eficácia da clorexidina como agente antimicrobiano. A Figura 24 evidencia que a clorexidina apresentou efeito antibacteriano significativo, já que foi observada predominância da fluorescência vermelha, indicando inativação dos microrganismos.

A imagem da superfície dentinária após remoção com FR nos mostra a diminuição na quantidade de microrganismos presentes. Porém, estes microrganismos permanecem viáveis devido à fluorescência na cor verde. O mesmo acontece com os espécimes removidos com ULT, onde a quantidade de microrganismos residuais também diminuiu (Figura 24).

Em relação à aplicação da TFDA, independentemente do método de remoção empregado (FR ou ULT), a TFDA foi capaz de promover inativação das bactérias. As imagens dos espécimes que receberam aplicação de TFDA apresentaram maior quantidade de células coradas em vermelho. No entanto, a predominância de fluorescência vermelha é maior para o grupo ULT+TFDA, sugerindo que a remoção com ULT parece facilitar e aprimorar o efeito da TFDA (Figura 24).

Figura 24 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal da superfície dentinária utilizando o corante LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability contendo SYTO 9 e iodeto de propídio. Aumento de 63x.



FR (fresa), ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

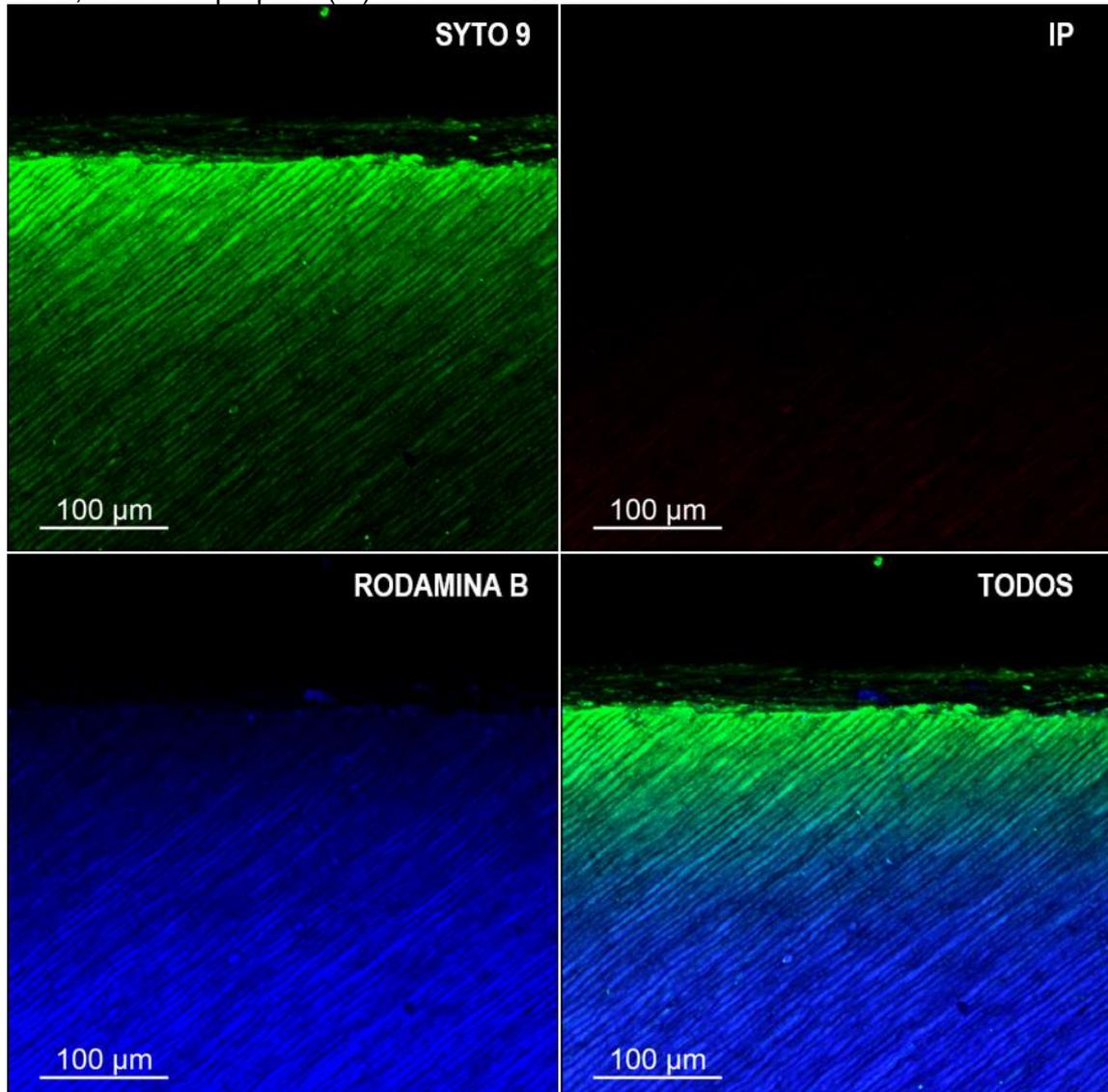
Com o intuito de avaliar a viabilidade bacteriana em profundidade, os espécimes de dentina foram cortados longitudinalmente (Figuras 25 a 38). Utilizou-se SYTO 9 para corar as bactérias viáveis em verde, iodeto de propídio para corar bactérias inviáveis em vermelho e rodamina B para corar a dentina em azul. Adicionalmente, uma imagem contendo a sobreposição dos três corantes foi obtida a fim de ilustrar a viabilidade bacteriana nos túbulos dentinários.

As imagens do grupo controle negativo (Figura 25) também evidenciaram a predominância de fluorescência na cor verde, indicando a presença majoritária de bactérias viáveis. Pouca ou nenhuma fluorescência vermelha foi observada. A Figura 26 ilustra o grupo controle positivo tratado com clorexidina à 0,12%. Predominância de fluorescência vermelha foi observada, confirmando mais uma vez o potencial antibacteriano da clorexidina.

Em geral, os grupos removidos com FR (Figuras 27 a 32) apresentaram menor carga bacteriana residual em comparação aos grupos removidos com ULT (Figuras 33 a 38). Entretanto, independentemente do método de remoção, a aplicação de TFDA promoveu uma maior inativação bacteriana (Figuras 28, 30, 32, 34, 36, e 38) em comparação aos grupos que não receberam TFDA. As imagens dos grupos que

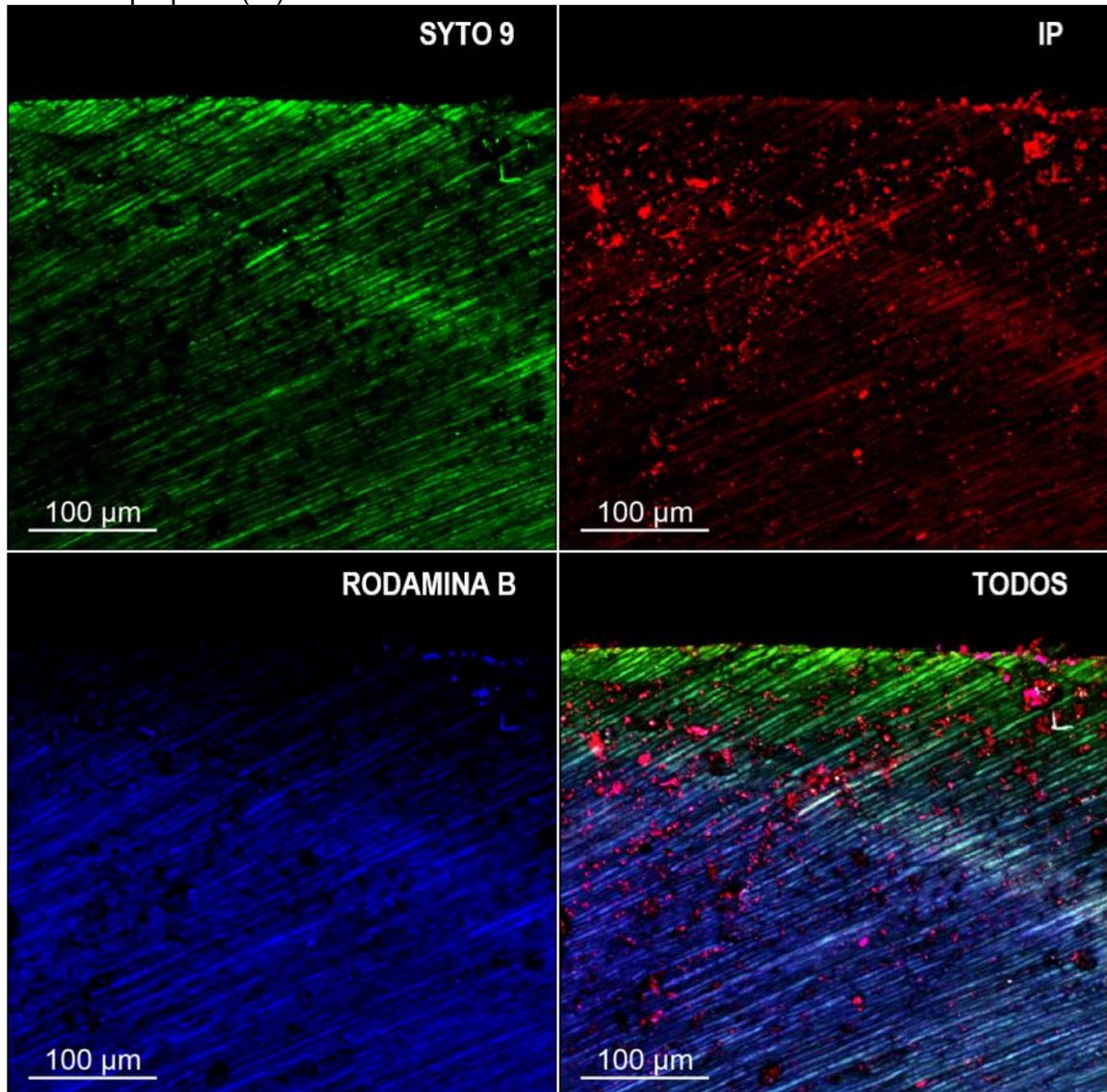
receberam a aplicação dos vidros bioativos (Figuras 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, e 38) sugerem que os mesmos não exerceram efeito significativo na inativação bacteriana, independentemente do tipo de vidro bioativo e da associação com os métodos de remoção e da TFDA.

Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo controle negativo (lesão de cárie) cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



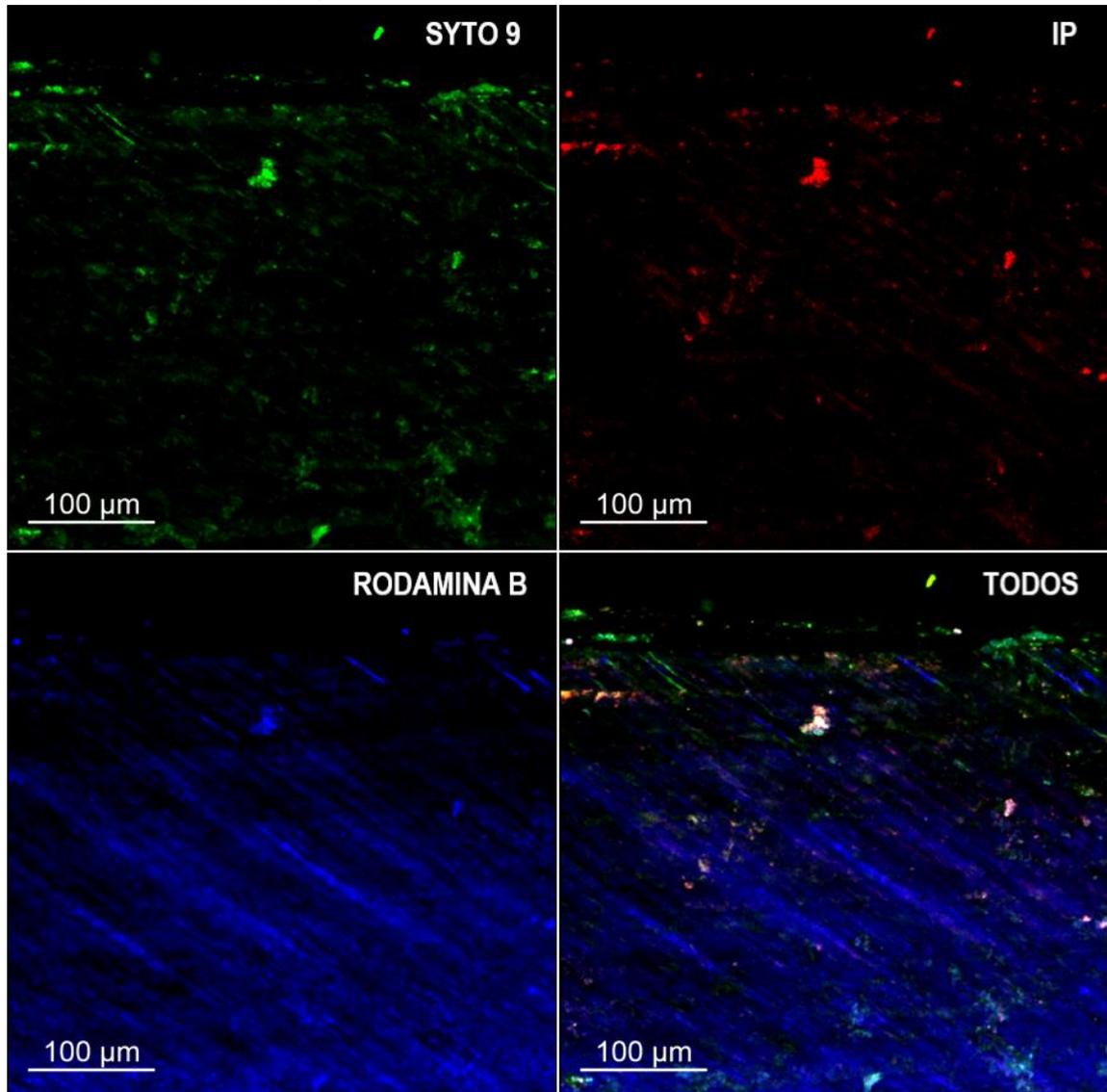
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 26 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo controle positivo (clorexidina) cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

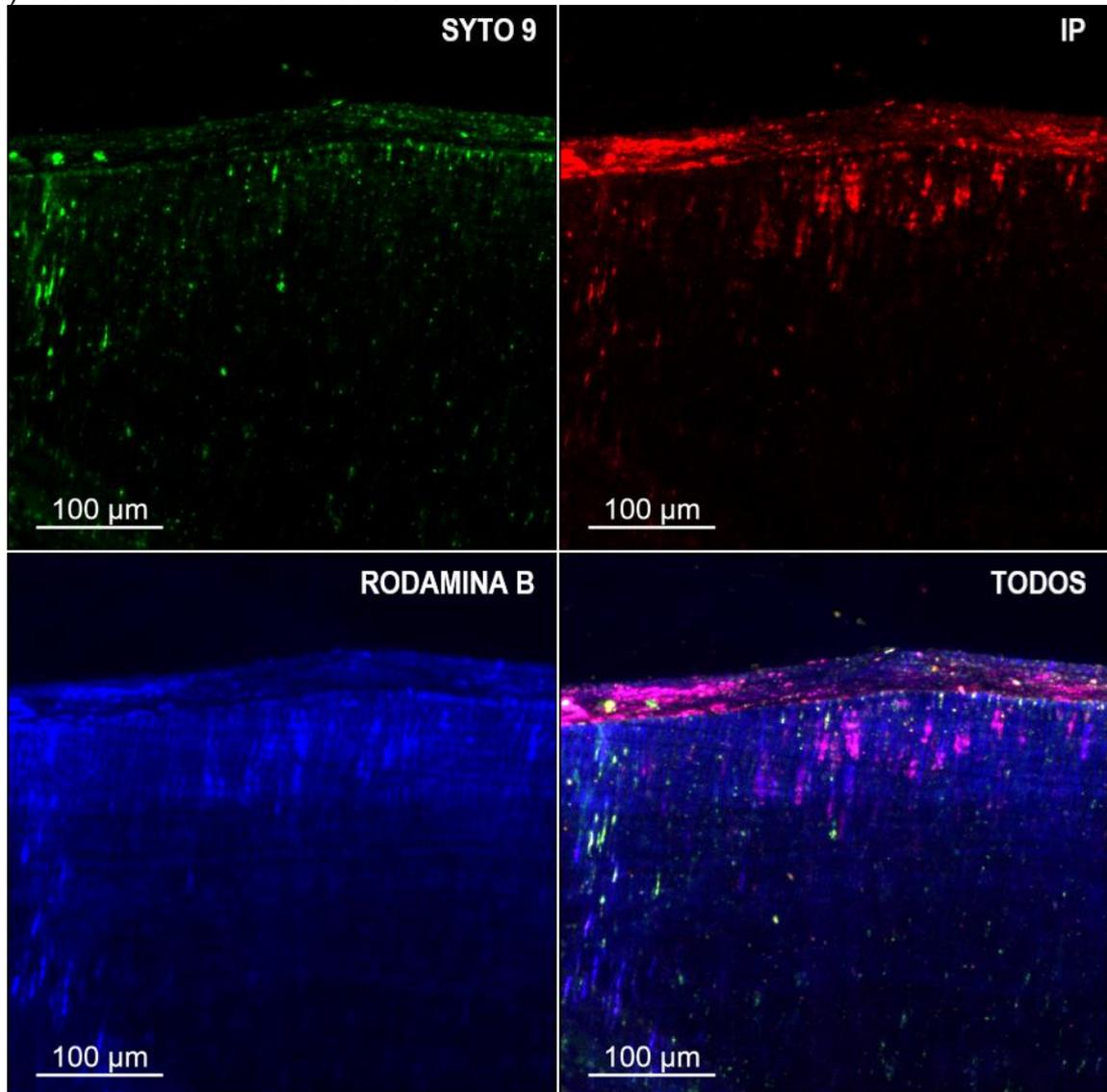
Figura 27 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa).

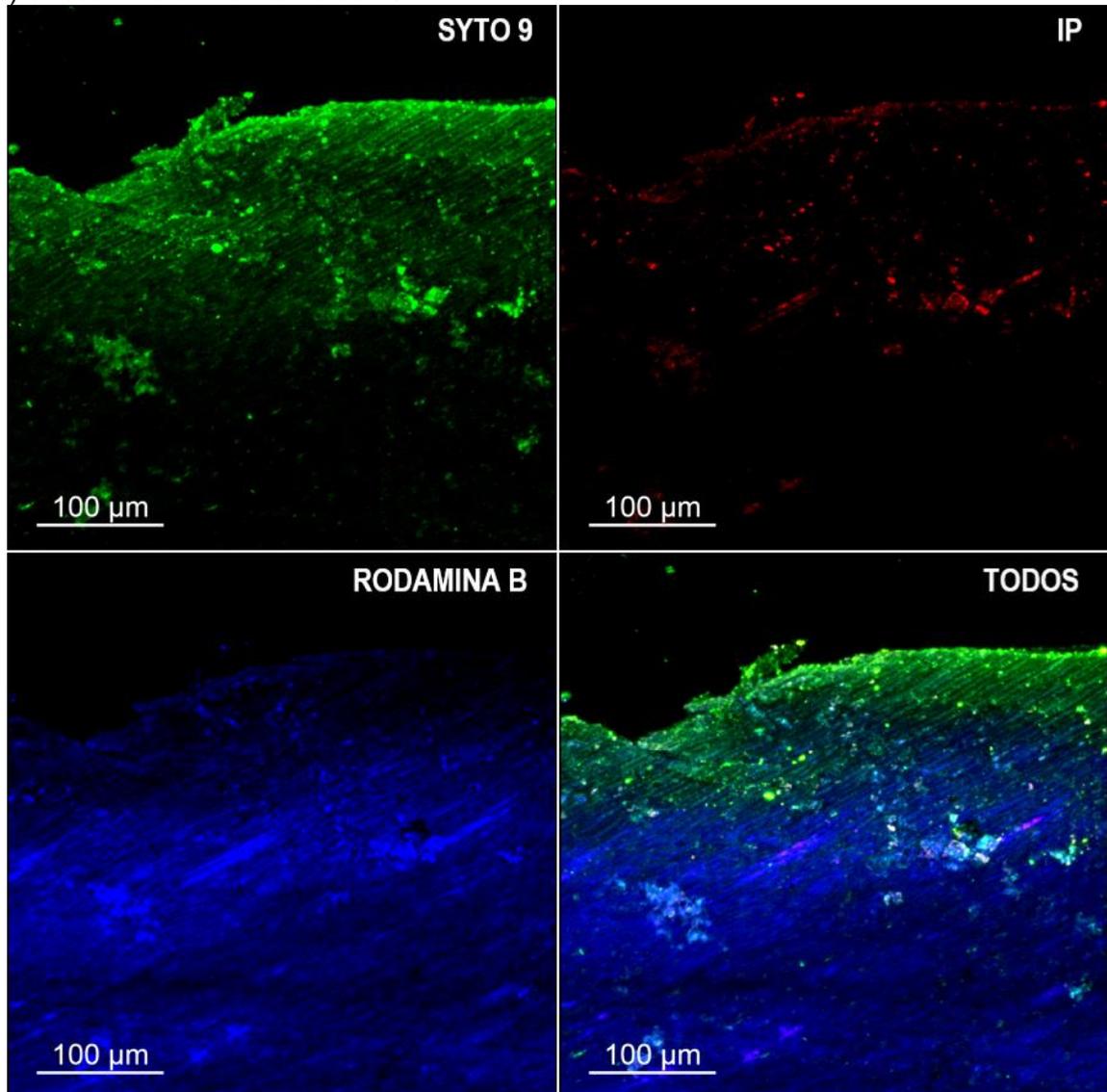
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 28 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR+TFDA cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

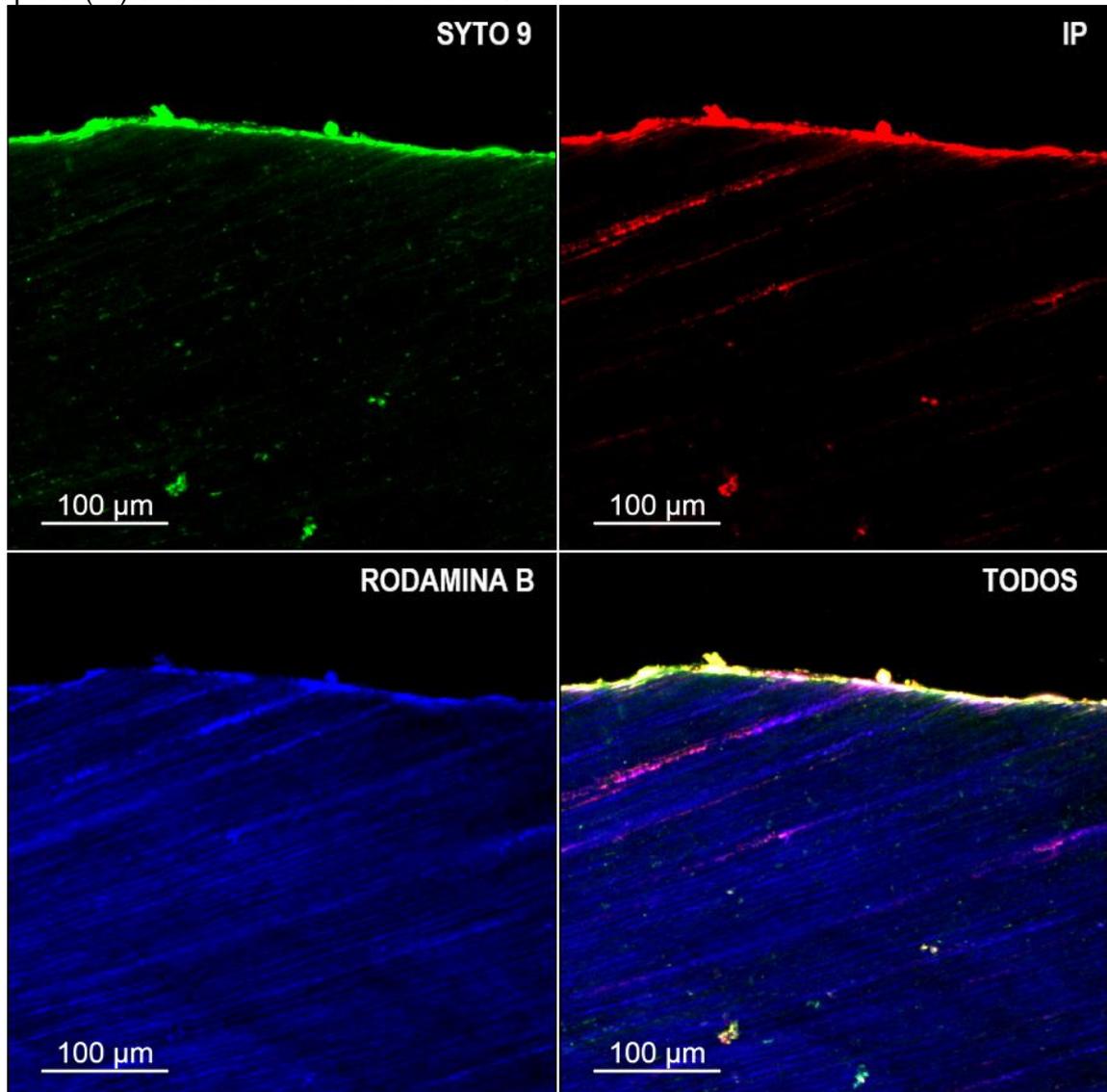
Figura 29 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR+F-18 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa), F-18 (vidro bioativo F-18).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

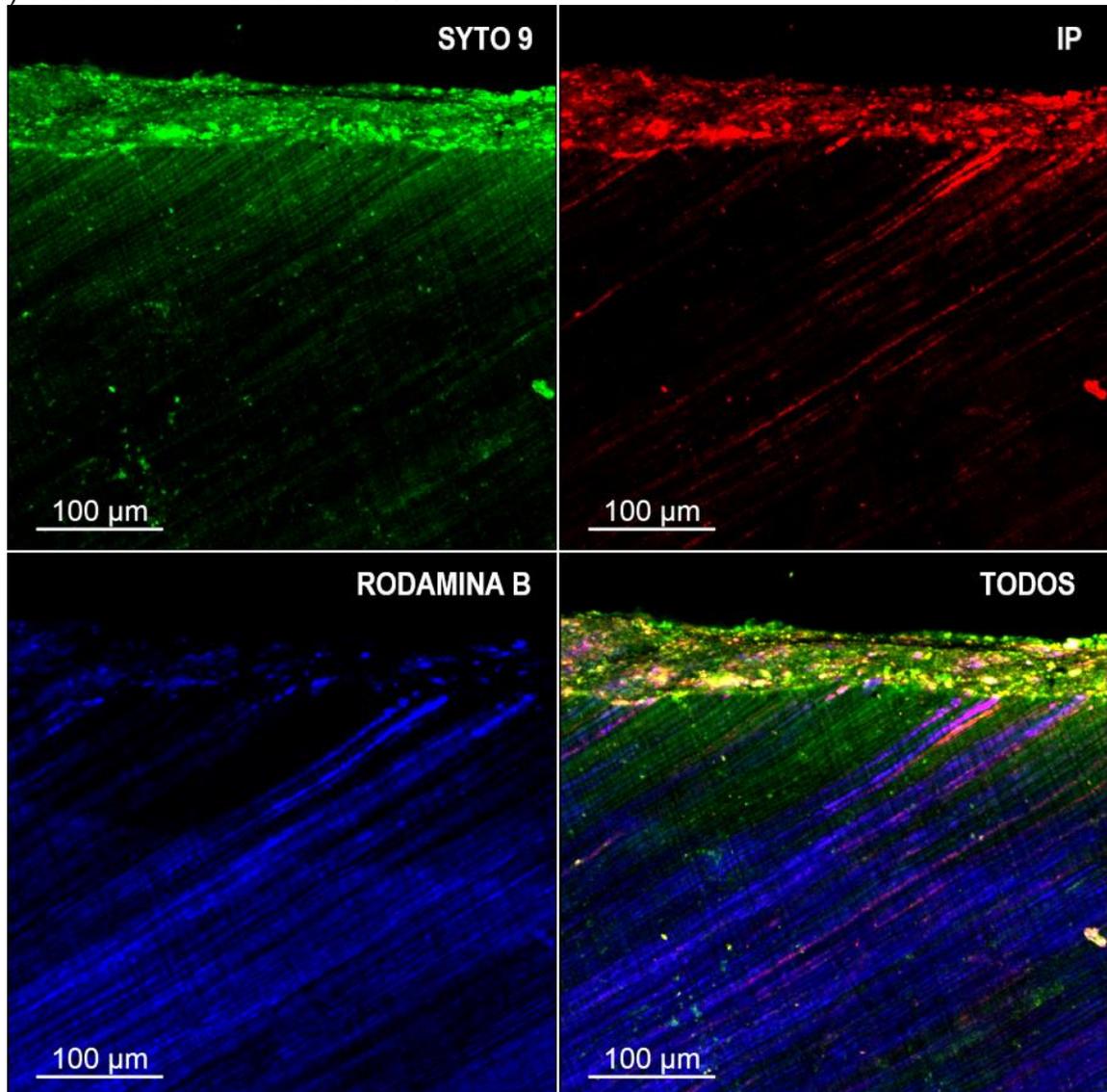
Figura 30 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR+TFDA+F-18 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), F-18 (vidro bioativo F-18).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

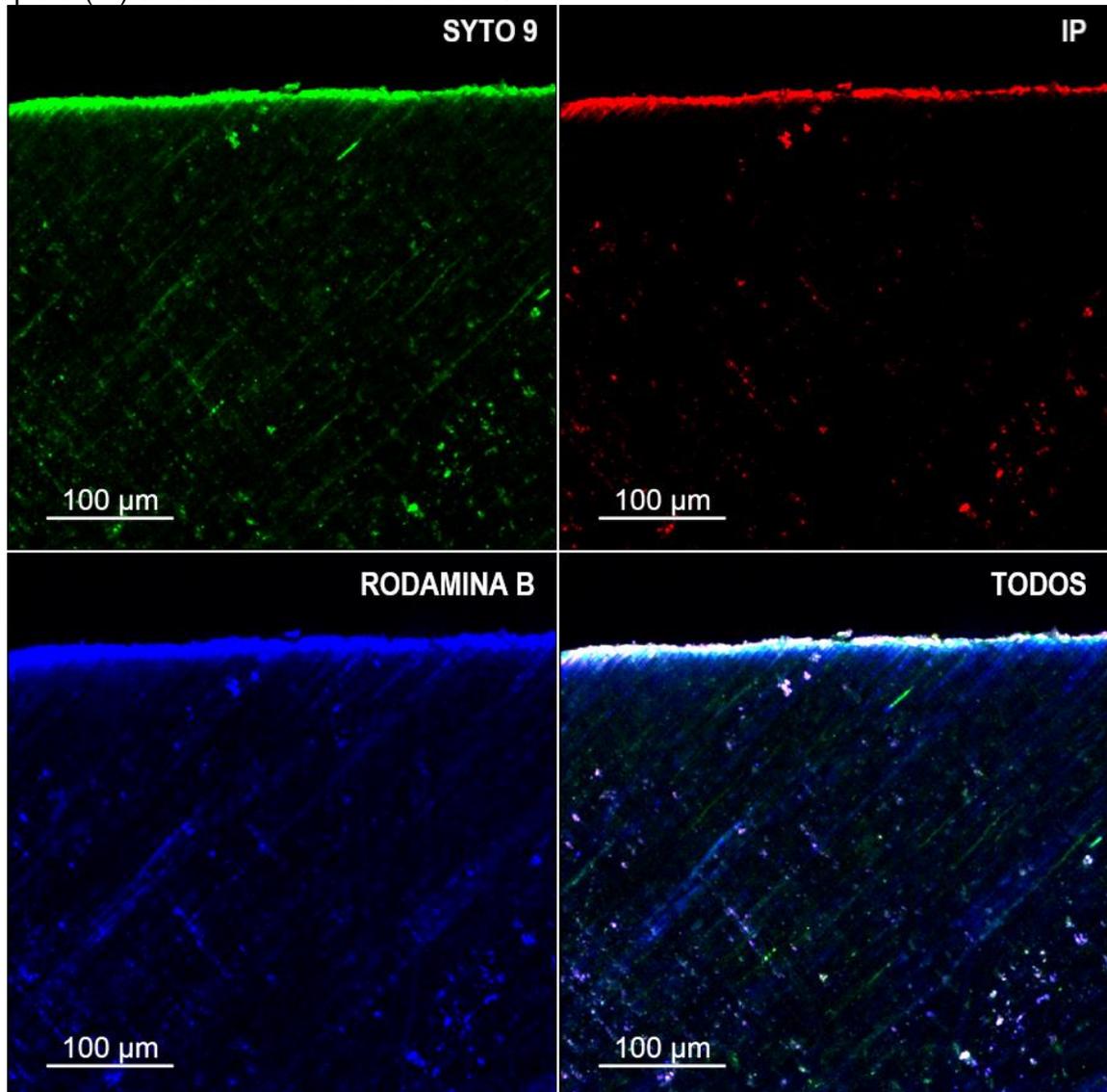
Figura 31 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR+45S5 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5).

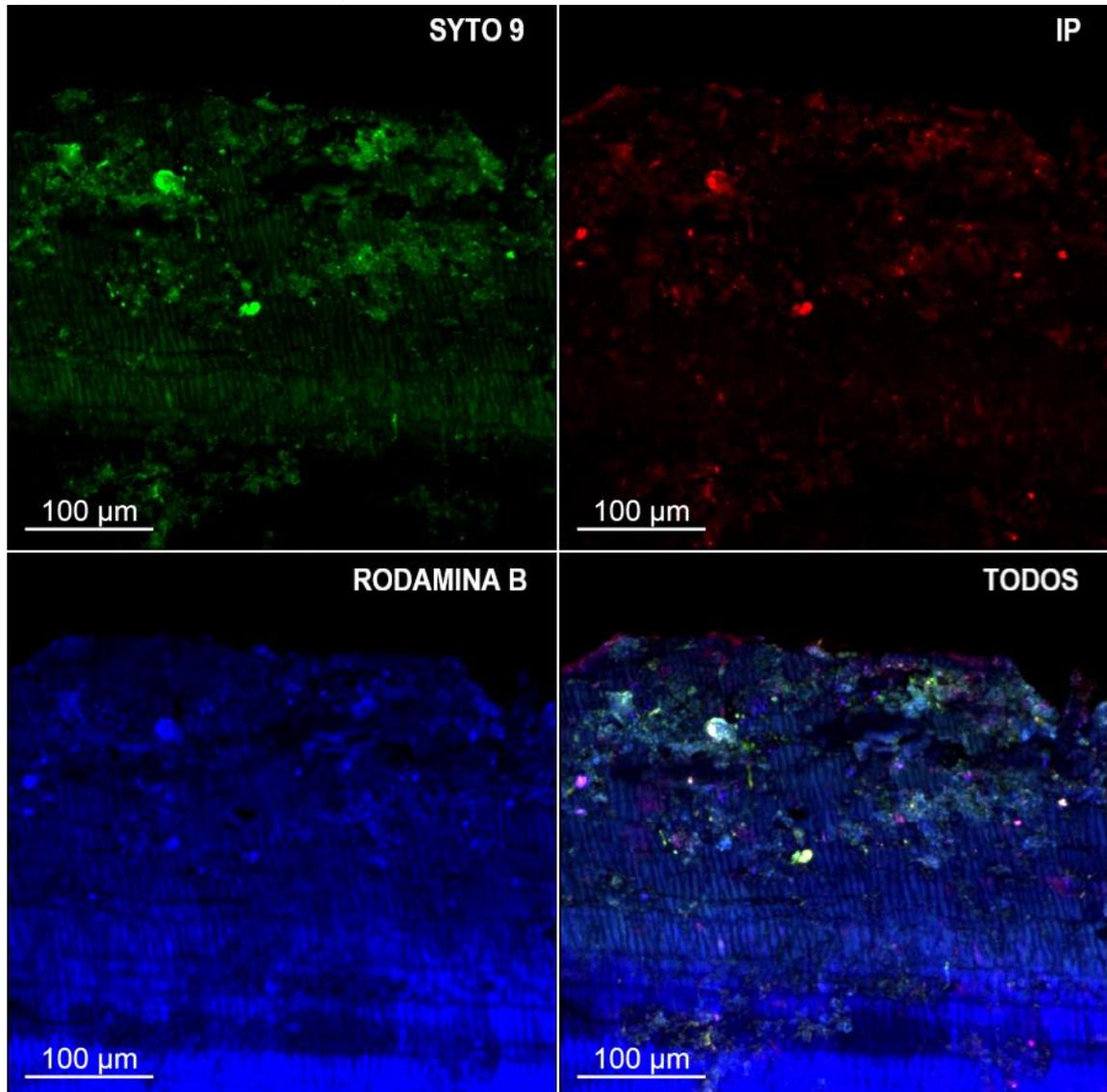
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 32 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo FR+TFDA+45S5 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



FR (fresa), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

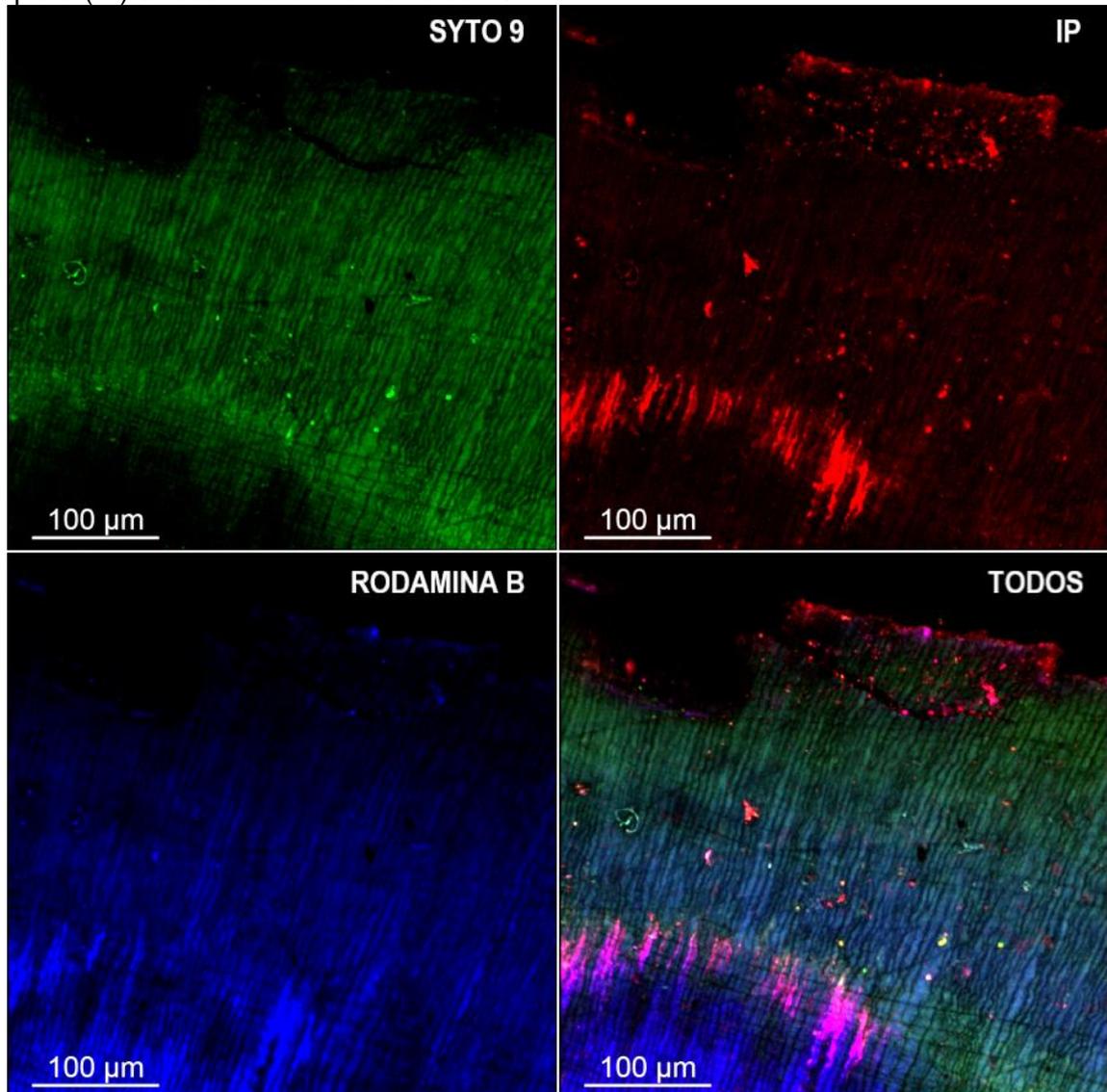
Figura 33 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



ULT (ultrassom).

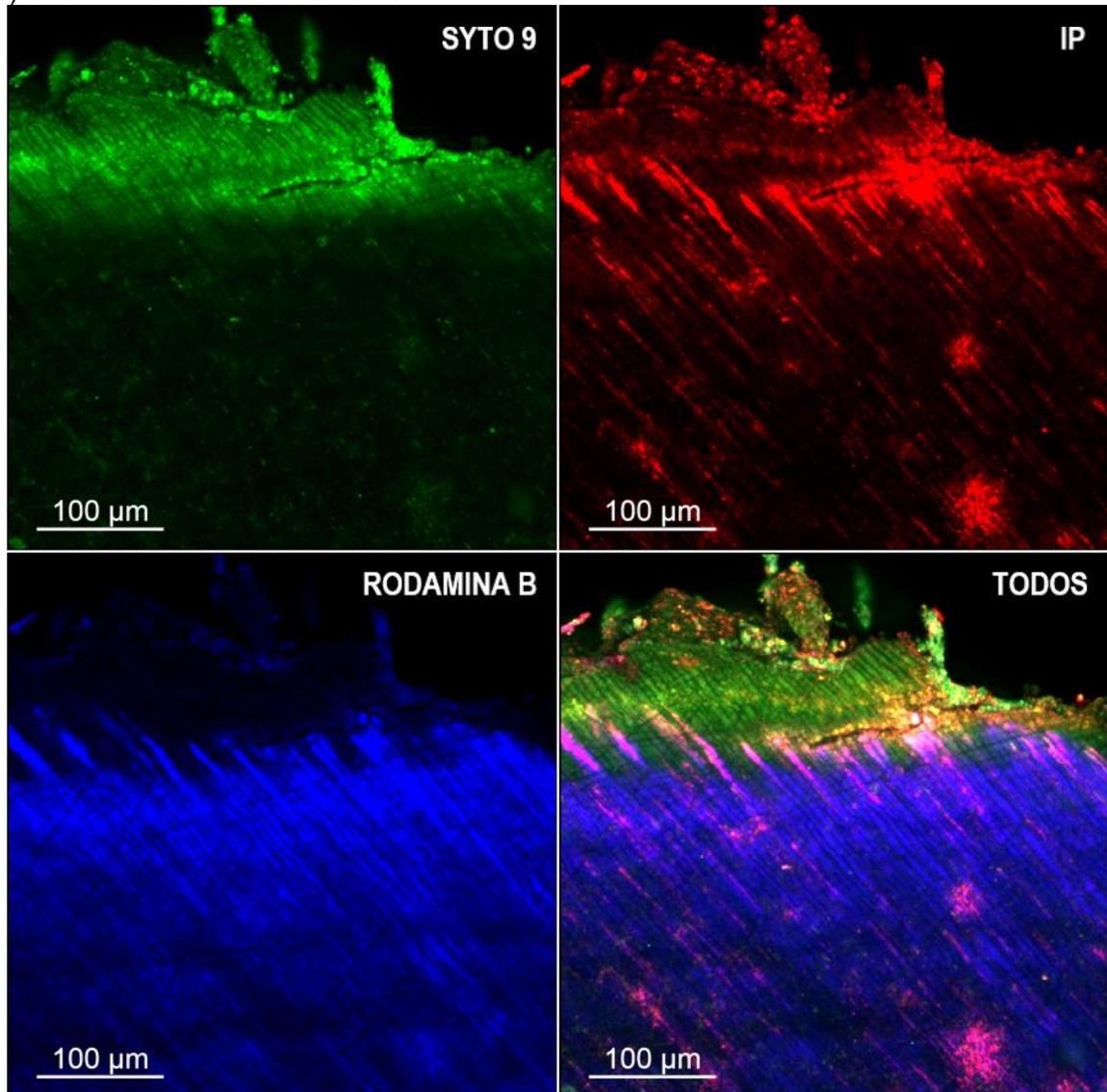
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 34 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT+TFDA cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



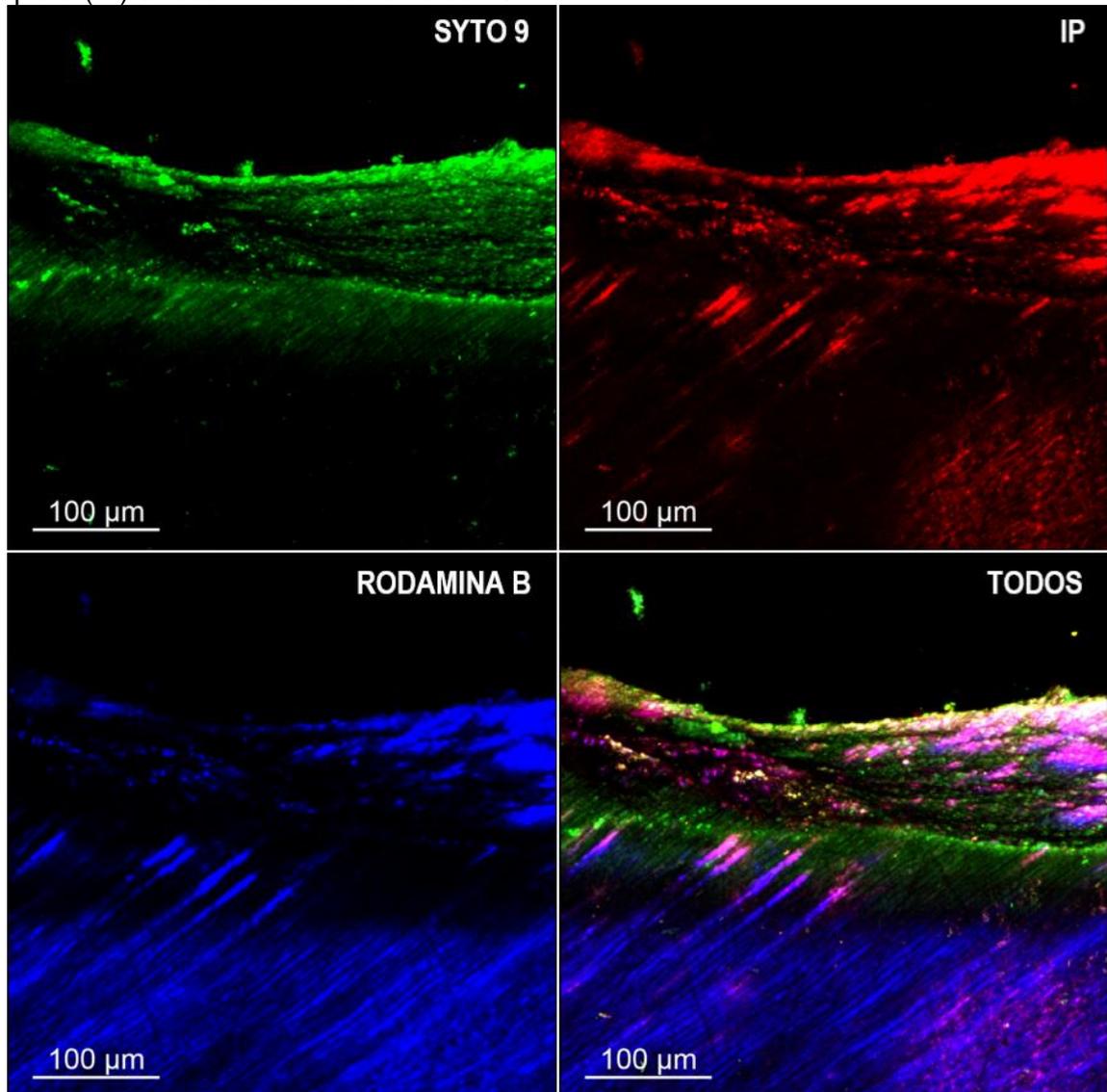
ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 35 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT+F-18 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



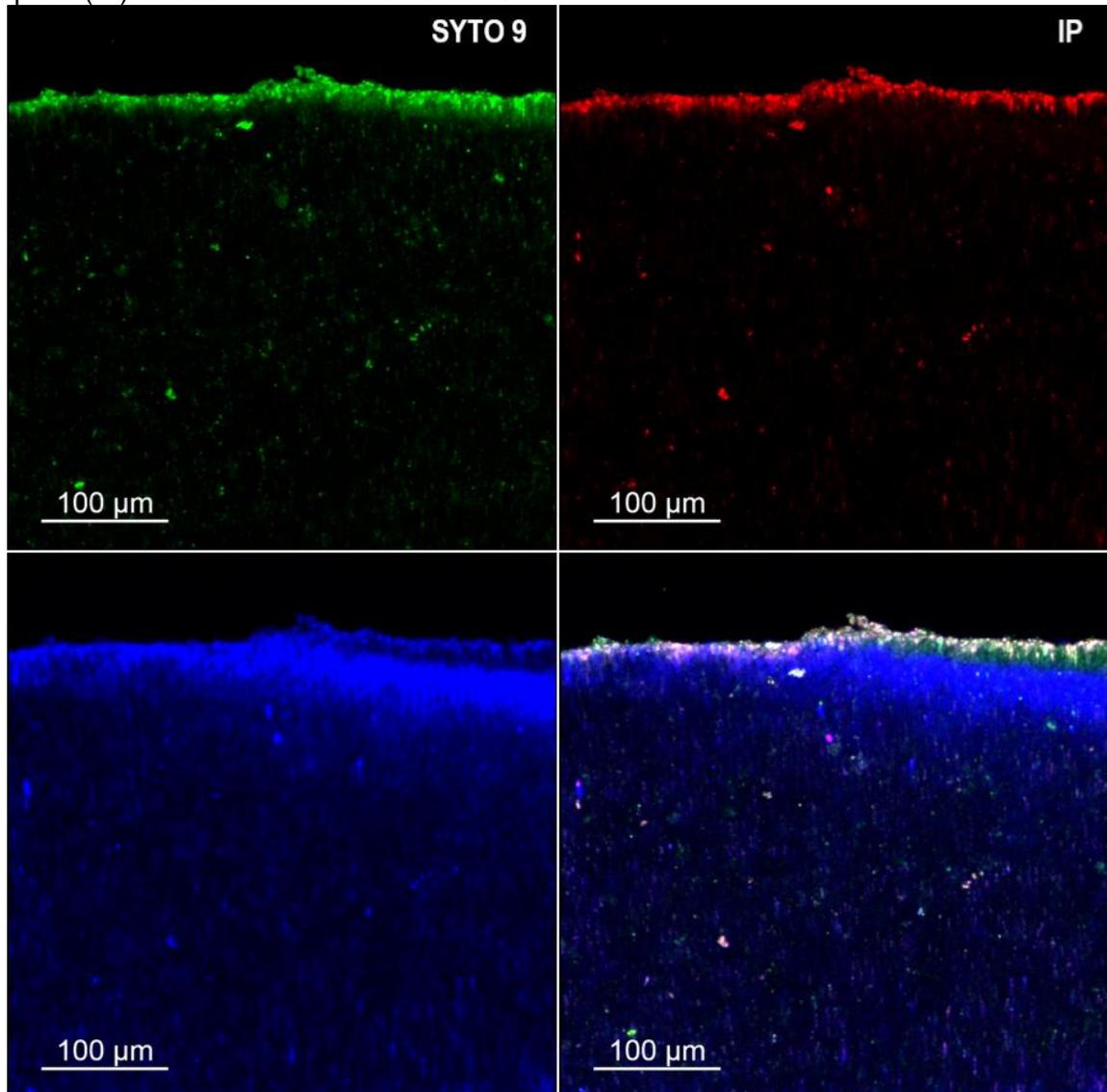
ULT (ultrassom), F-18 (vidro bioativo F-18).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 36 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT+TFDA+F-18 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



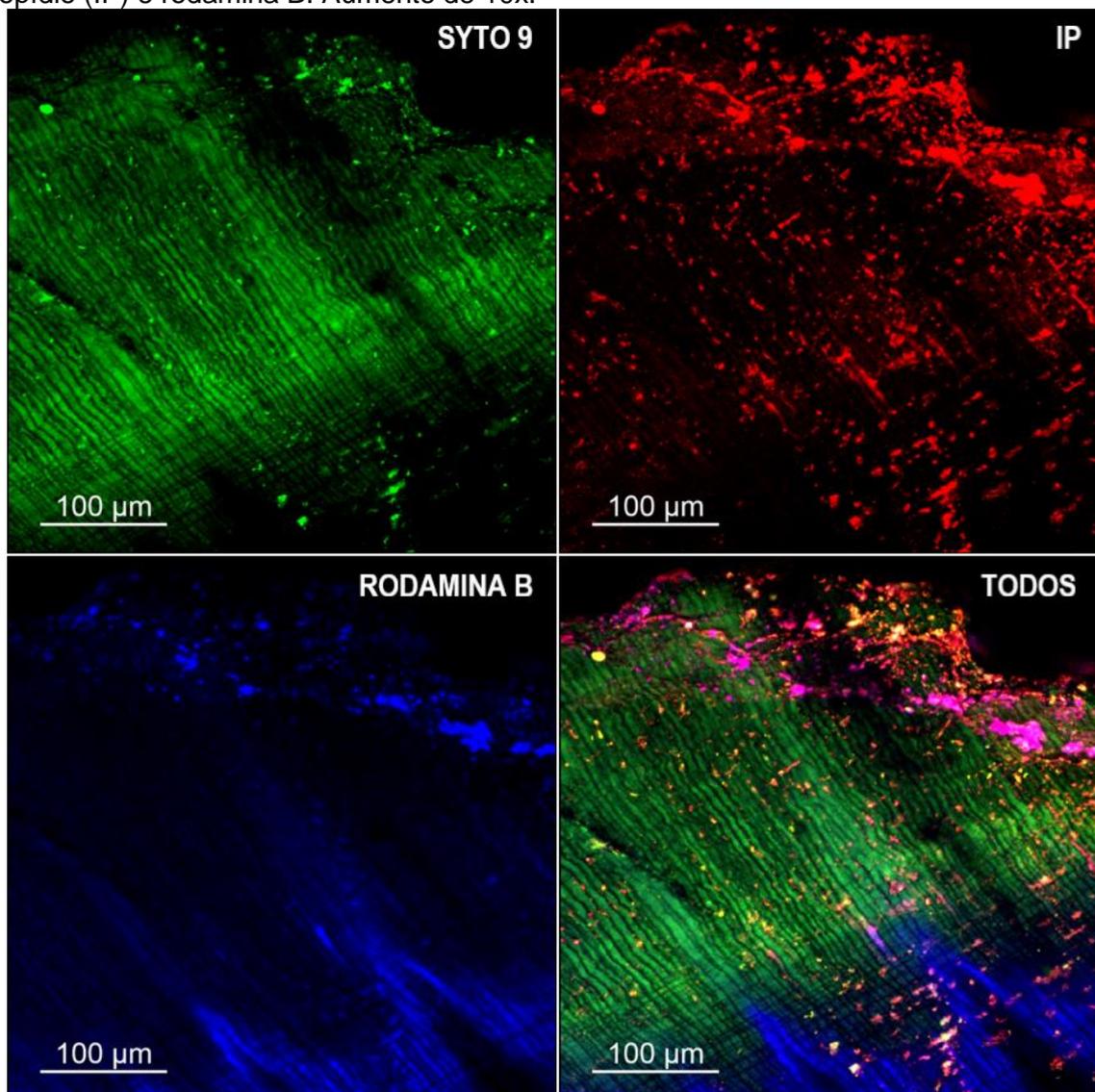
ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), F-18 (vidro bioativo F-18).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 37 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT+45S5 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



ULT (ultrassom), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5).
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 38 – Imagens de microscopia de fluorescência confocal dos espécimes de dentina do grupo ULT+TFDA+45S5 cortados longitudinalmente utilizando os corantes SYTO 9, iodeto de propídio (IP) e rodamina B. Aumento de 10x.



ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5).

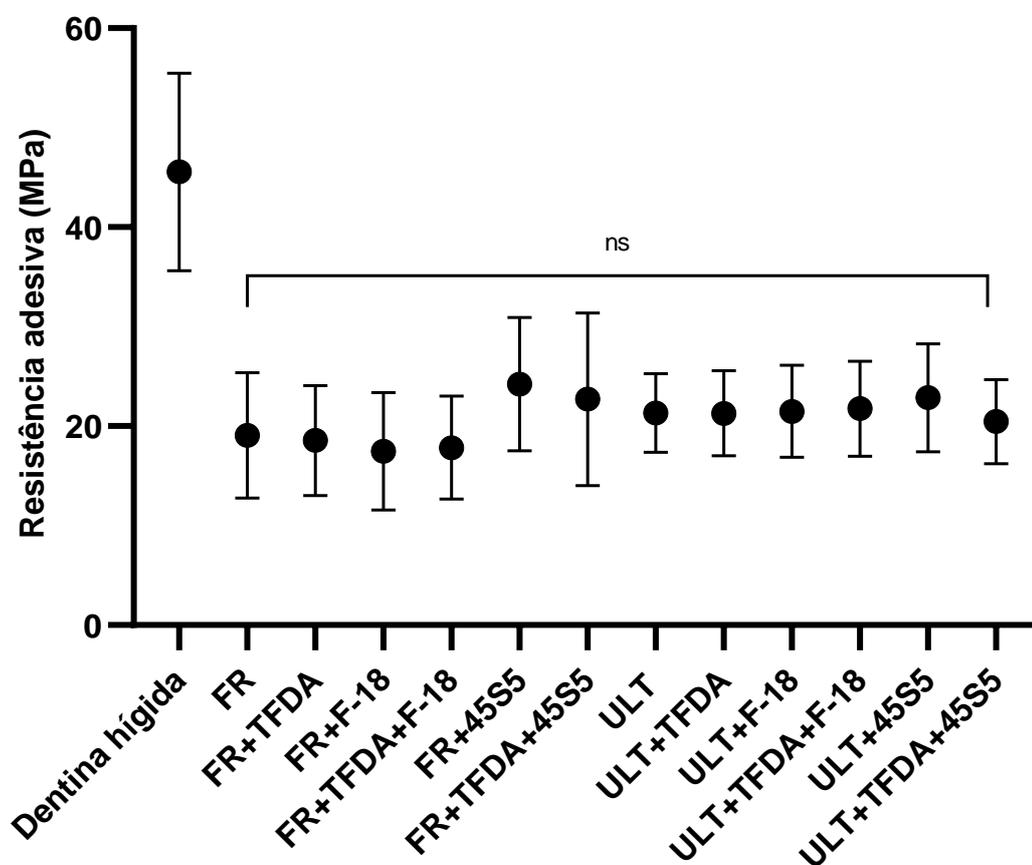
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2.4 Resistência adesiva

A média e desvio padrão da resistência adesiva à dentina dos diferentes grupos de estudo após os tratamentos e teste de microcisolamento estão expressos na Figura 39. É possível observar que o grupo controle que consistia de espécimes contendo dentina hígida, sem nenhuma lesão de cárie e tratamento de superfície apresentou os maiores valores de resistência adesiva em comparação aos demais

grupos (~ 43 MPa; $p < 0,05$). Em relação aos grupos experimentais, todos apresentaram valores de resistência adesiva menores aos do grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença estatística significativa entre nenhum dos grupos experimentais ($p > 0,05$).

Figura 39 – Média e desvio padrão da resistência adesiva (MPa) à dentina após os diferentes tratamentos ($n = 10$). ANOVA um fator seguido de pós teste de Games-Howell ($p < 0,05$). Barra conectora contendo “ns” denota ausência de diferença estatística significativa entre os grupos.



FR (fresa), ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5), F-18 (vidro bioativo F-18).

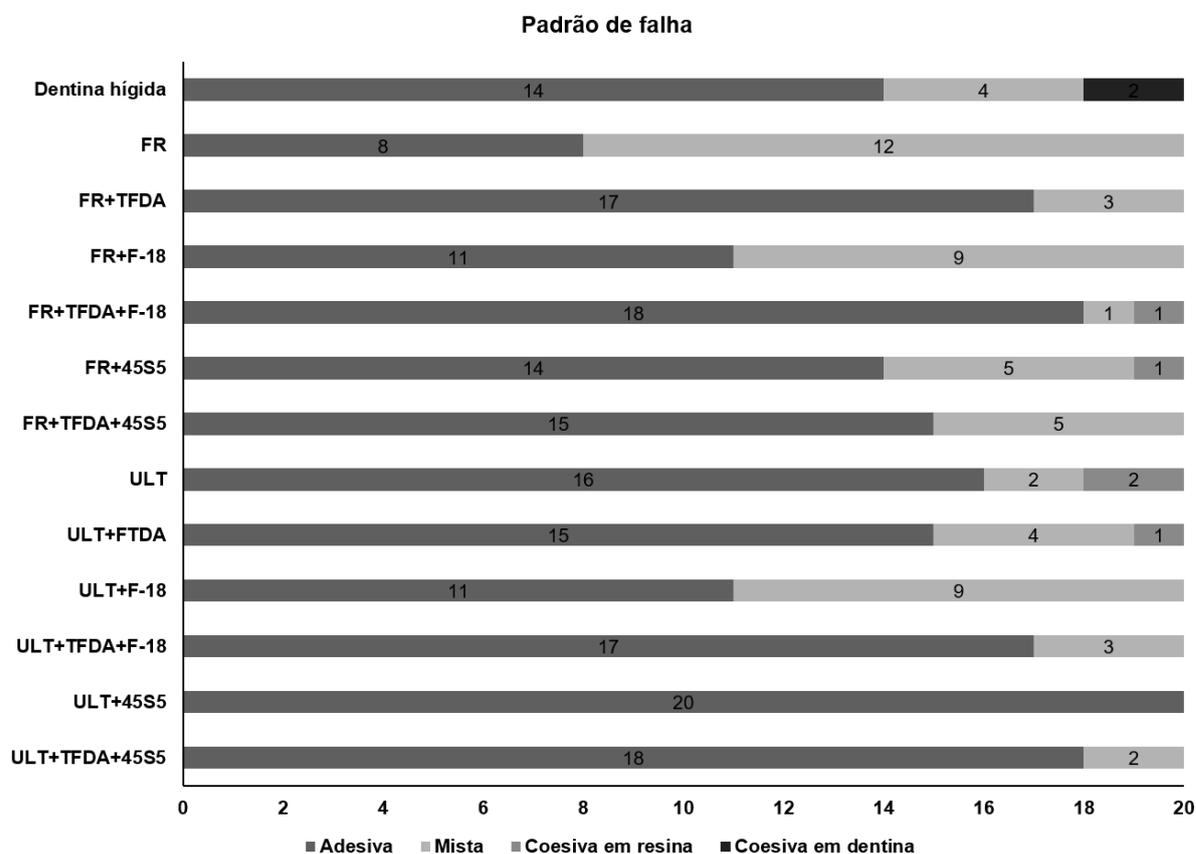
Fonte: Elaboração própria.

5.2.5 Padrão de falha

A Figura 40 evidencia a incidência do padrão de falha dos corpos de prova de resina composta na superfície da dentina após os testes de microcisolamento. Com base no gráfico podemos observar que o padrão de falha do tipo adesiva foi o mais

predominante em todos os grupos de estudo, exceto para o grupo FR, onde ocorreu maior incidência do padrão de falha do tipo mista.

Figura 40 – Incidência do padrão de falha para cada grupo de estudo (n = 20).

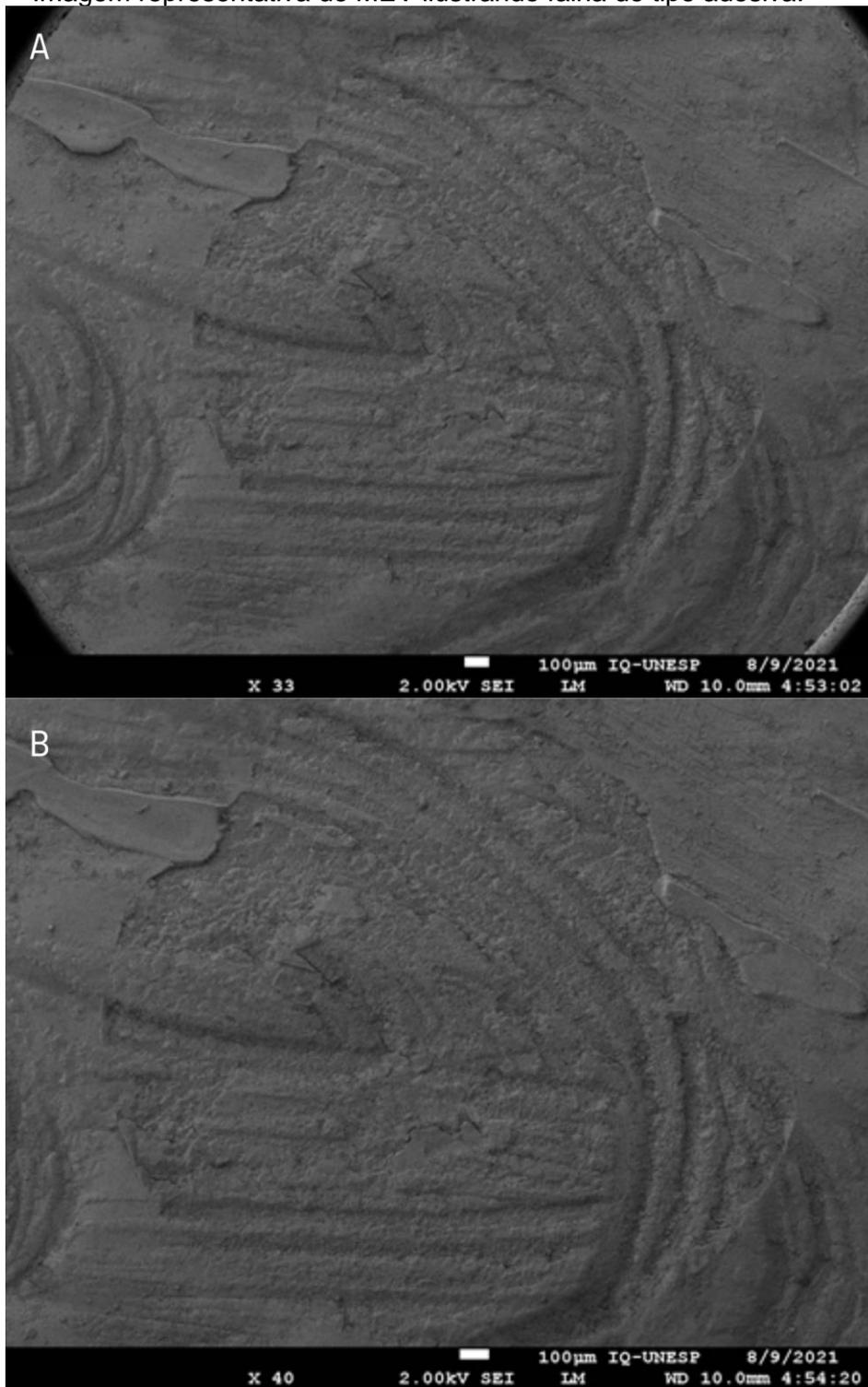


FR (fresa), ULT (ultrassom), TFDA (terapia fotodinâmica antimicrobiana), 45S5 (vidro bioativo Bioglass® 45S5), F-18 (vidro bioativo F-18).

Fonte: Elaboração própria.

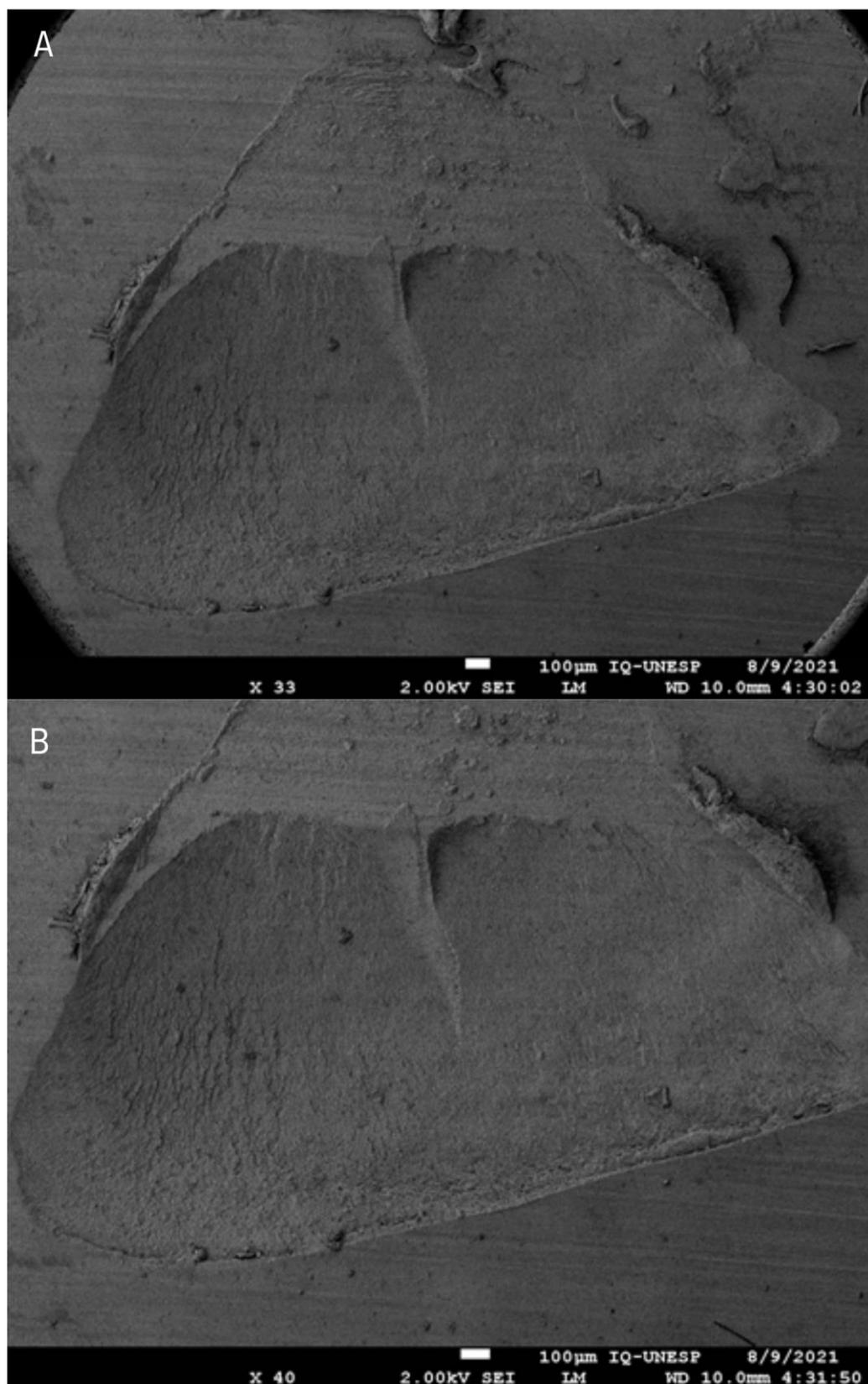
Imagens representativas de MEV foram obtidas para ilustrar os diferentes padrões de falha encontrados. Na Figura 41 observa-se falha do tipo adesiva, tendo a fratura ocorrido na interface adesiva, sem indícios de remanescente de resina composta e/ou danos estruturais à dentina. Na Figura 42, é ilustrado uma falha do tipo coesiva em dentina, com parte do substrato dentinário apresentando uma concavidade, resultado do dano estrutural causado pela força de microcissalhamento. Já na Figura 43 observa-se a representação de uma falha do tipo coesiva em resina, visto que a falha ocorreu na estrutura da resina composta, tendo remanescentes do material sobre a superfície da dentina. Por fim, na Figura 44, é ilustrado uma falha do tipo mista, onde diferentes padrões de fratura são observados.

Figura 41 – Imagem representativa de MEV ilustrando falha do tipo adesiva.



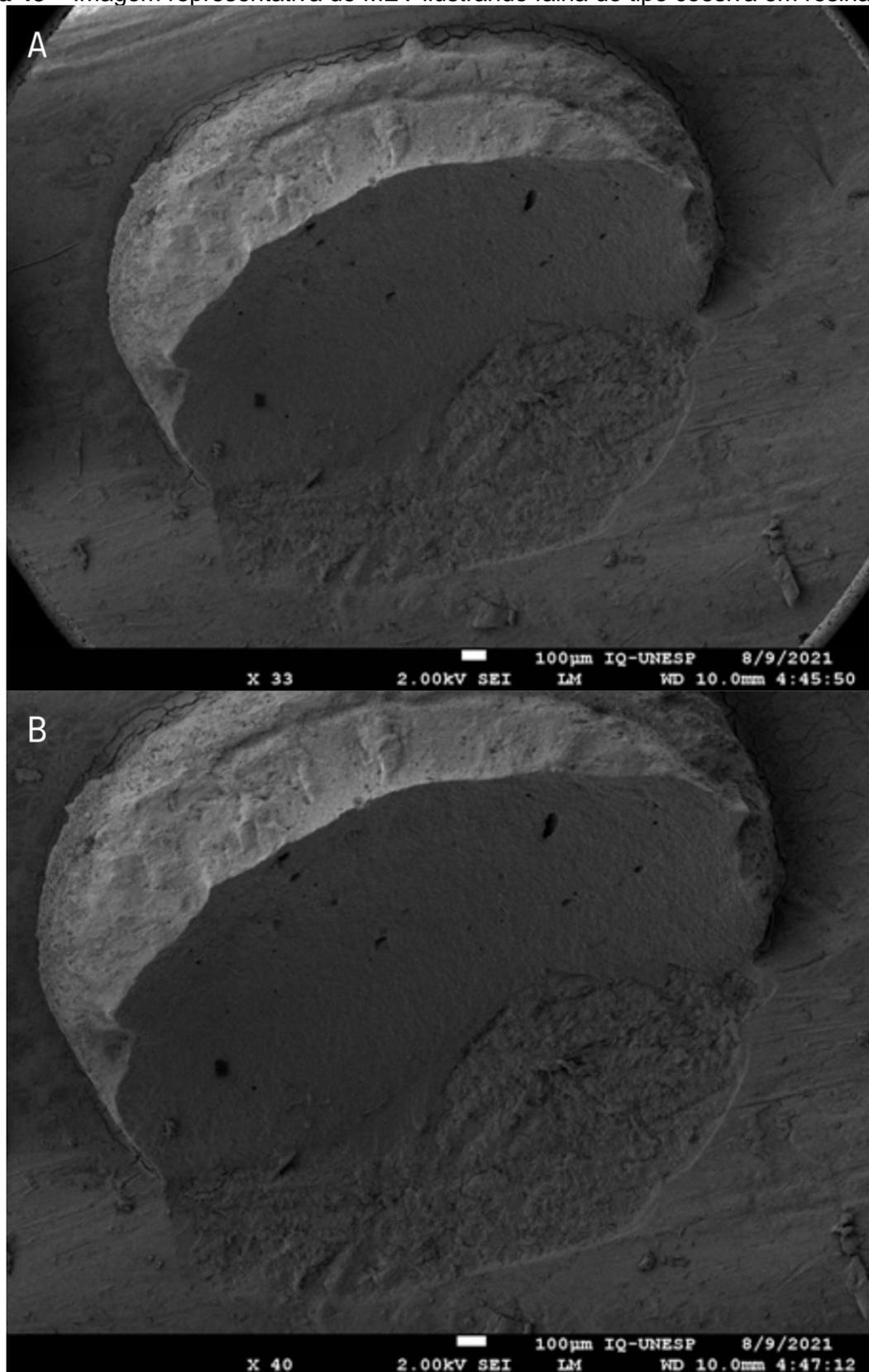
A) Aumento de 33X. B) Aumento de 40X.
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 42 – Imagem representativa de MEV ilustrando falha do tipo coesiva em dentina.



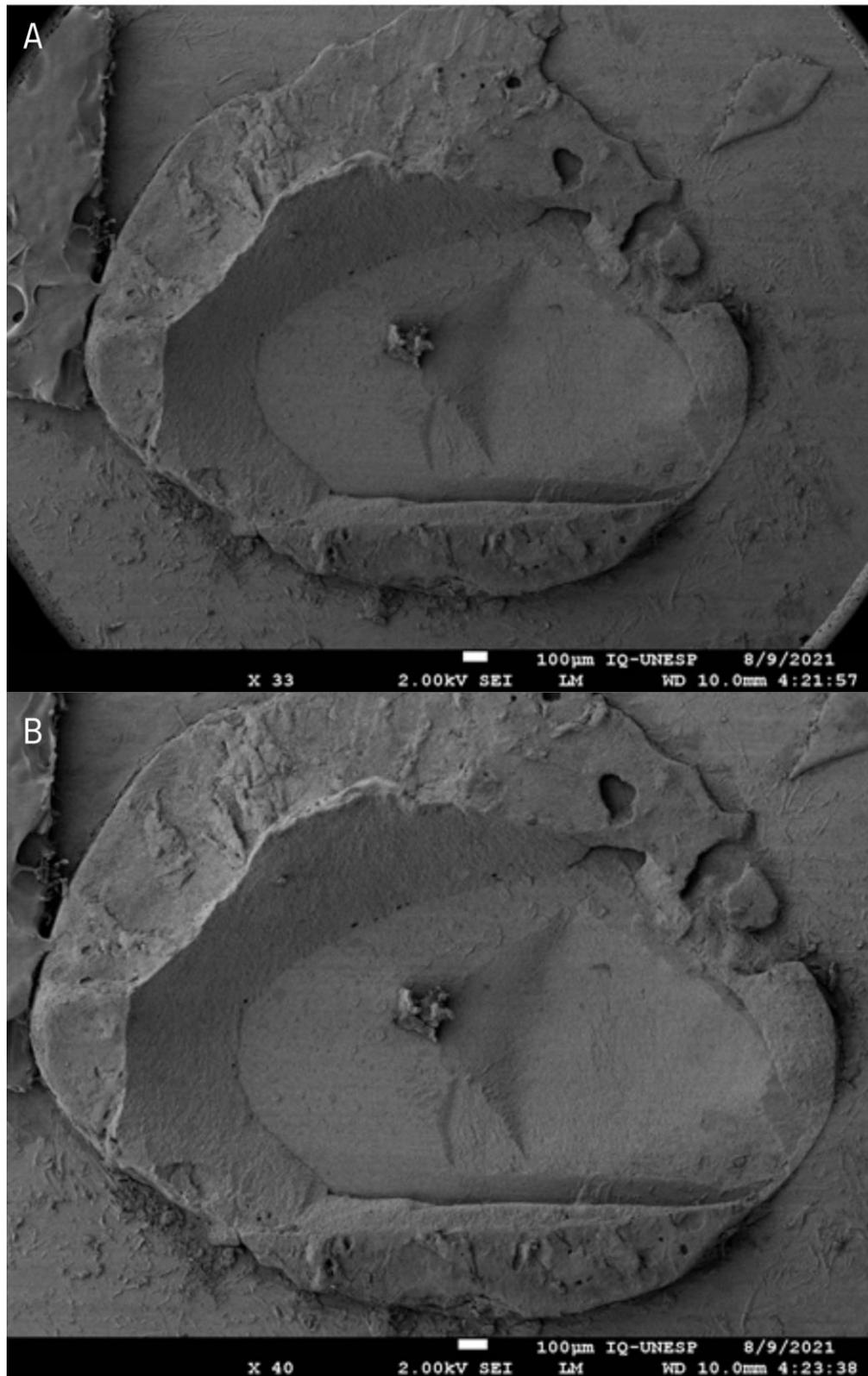
A) Aumento de 33X. B) Aumento de 40X.
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 43 – Imagem representativa de MEV ilustrando falha do tipo coesiva em resina.



A) Aumento de 33X. B) Aumento de 40X.
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 44 – Imagem representativa de MEV ilustrando falha do tipo mista.



A) Aumento de 33X. B) Aumento de 40X.
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficácia de diferentes tratamentos (isolados ou combinados) no tratamento de lesões artificiais de cárie em dentina. Os novos tratamentos consistiram na utilização de um dispositivo de ultrassom para remoção de dentina afetada por cárie, na aplicação de TFDA para descontaminação cavitária após a remoção, e na aplicação de géis contendo vidros bioativos para promover remineralização dentinária. As novas abordagens foram propostas com o intuito de promover um tratamento conservador e minimamente invasivo.

Na primeira fase do estudo, diferentes experimentos foram conduzidos a fim de estabelecer os protocolos e concentrações adequadas para a realização das etapas subsequentes do trabalho. Durante esta fase, estabeleceu-se o protocolo de indução artificial da lesão de cárie, a concentração mais adequada do fotossensibilizador curcumina para aplicação da TFDA, assim como padronizou-se os espécimes de dentina bovina a serem utilizados nos experimentos. Somente após esta fase, os espécimes foram então submetidos aos diferentes tratamentos e analisados quanto ao conteúdo mineral e orgânico da dentina, a viabilidade celular, e os impactos na adesão à dentina.

A condução de pesquisas sobre cárie dentária em condições *in vivo* inevitavelmente esbarra em dificuldades relacionadas à limitação no número amostral, complexidade do meio bucal e questões bioéticas envolvendo o uso de seres humanos⁸⁶⁻⁸⁸. Por essas razões, modelos *in vitro* de desenvolvimento de lesões artificiais de cárie vêm sendo utilizados para simular as condições naturais de maneira fidedigna, controlada e padronizada^{7,27,86,88,89,91,92}, sem as dificuldades inerentes de estudos clínicos⁹³. Dentre os modelos *in vitro*, o modelo biológico utiliza cepas de bactérias com potencial cariogênico e meios de cultura suplementados que propiciam ambiente ideal para o seu crescimento e conseqüente desenvolvimento da lesão de cárie^{11,27,89}.

A escolha pelo modelo biológico foi sustentada por resultados de estudos prévios que evidenciam sua eficácia em reproduzir de maneira fidedigna as lesões artificiais em comparação com lesões naturais^{11,27,89}. Relatou-se que o modelo biológico promove padrão morfológico de degradação das fibras colágenas similar ao das lesões naturais¹¹, sendo o modelo mais adequado para estudos que necessitem

avaliar técnicas de remoção de lesão de cárie¹¹, como é o caso do presente estudo. Além disso, embora o tempo de indução neste tipo de modelo possa variar de 4 até 20 dias, foi relatado que 8 dias é o tempo ideal para que lesões de cárie já sejam formadas⁸⁹.

Durante o processo de indução artificial de lesão de cárie, a posição do espécime na suspensão indutora é crucial. O espécime deve ser posicionado de tal forma que garanta a fixação das bactérias sobre a superfície dentinária de maneira ativa⁹⁰, simulando as condições de formação de um biofilme real, evitando a ação da gravidade e a formação apenas de uma camada de células sedimentadas⁹⁰. Como forma de garantir a fixação ativa das bactérias, neste estudo os espécimes permaneceram suspensos dentro de cada poço de uma placa de 24 poços com auxílio de um sistema composto por fio ortodôntico, lamínula de vidro e silicone de condensação.

Neste estudo, duas cepas de bactérias com potencial cariogênico foram utilizadas (*S. mutans* e *L. acidophilus*) com o intuito de contemplar o paradigma atual de que as bactérias do ambiente oral fazem parte de uma comunidade microbiana complexa, dinâmica e interativa, ao invés de fomentar a visão reducionista de uma única espécie como agente etiológico da doença cárie^{55,58}. Além de *S. mutans* e *L. acidophilus* exercerem papel fundamental no desenvolvimento da lesão de cárie, relatou-se que a associação entre estas espécies bacterianas é pertinente em estudos *in vitro* pelo fato de promover lesões subsuperficiais similares às lesões naturais⁸⁹.

Embora a efetividade do modelo biológico em induzir lesões de cárie já tenha sido comprovada por meio de consistentes evidências, a falta de padronização em relação ao tempo de indução nos encorajou a conduzir experimentos avaliando três tempos de indução (7, 10 e 14 dias). Estes experimentos foram realizados com o intuito de estabelecer o tempo ideal para formação de lesões com profundidade e características adequadas para a realização dos experimentos subsequentes. Para estas avaliações, análises de microscopia de luz polarizada e de microradiografia transversal foram utilizadas, visto que são amplamente empregadas para a análise qualitativa e quantitativa da perda mineral^{9,89}.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos, o tempo de 7 dias foi suficiente para promover lesões com profundidade adequada, de aproximadamente 213,9 µm (Tabela 2), e com radiolucidez característica ocasionada pelo processo de desmineralização da dentina (Figura 23). Com base nas evidências supracitadas e

nos resultados dos experimentos pilotos, definiu-se a utilização neste estudo de modelo biológico contendo *S. mutans* e *L. acidophilus* durante um período de 7 dias de indução para a formação das lesões artificiais de cárie em dentina.

A TFDA teve sua descoberta nos anos 1900, e consiste em reações com potencial antimicrobiano por diferentes vias como resultado da ação sinérgica entre um fotossensibilizador e uma fonte de luz na presença de oxigênio¹⁵⁵⁻¹⁶⁸. Embora muito utilizada como terapia anticâncer na medicina¹⁵⁵, a TFDA tem sido relatada como uma terapia coadjuvante promissora na odontologia¹⁷⁰⁻¹⁷⁶ e no tratamento de lesões de cárie profundas em dentina¹⁸. Sua aplicação parece reduzir e inativar microrganismos persistentes na dentina mesmo após a remoção das lesões de cárie¹⁸, permitindo maior preservação e reparo tecidual e contribuindo para uma abordagem conservadora mesmo em lesões profundas¹⁸.

No entanto, diversas limitações ainda restringem a aplicabilidade clínica da TFDA no tratamento de lesões de cárie, que incluem a falta de padronização dos protocolos de aplicação. Para que a TFDA possa ser efetiva, uma concentração adequada de fotossensibilizador necessita ser utilizada, sem que esta promova toxicidade aos tecidos e células alvo.

Diversos fotossensibilizadores estão disponíveis para mediar a TFDA. Entretanto, a curcumina vêm ganhando destaque por ser um composto natural com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais¹⁹⁰⁻¹⁹⁵. Embora seu uso apresente resultados promissores no campo da odontologia^{30,169}, a baixa biodisponibilidade no ambiente oral, rápida degradação e baixa solubilidade em meio aquoso^{197-200,202,203} dificultam a aplicação clínica da curcumina. Neste sentido, sistemas de liberação de droga utilizando fórmulas micelares tem sido utilizados na tentativa de superar essas limitações e aprimorar o desempenho da curcumina²⁰⁴. A estrutura anfifílica da micela permite que a mesma apresente regiões hidrofílicas e hidrofóbicas^{205,263}. Desta forma, é possível a encapsulação da molécula hidrofóbica de curcumina dentro da estrutura micelar, a qual apresenta superfície externa hidrofílica²⁰⁵, permitindo maior disponibilidade da curcumina em microambientes até então desfavoráveis para a sua ação.

Neste sentido, a utilização de micelas formuladas por meio do copolímero Pluronic® F-127 têm demonstrado resultados favoráveis contra biofilmes cariogênicos²⁰⁴. Sendo assim, no presente trabalho, os experimentos de determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima foram realizados utilizando

curcumina incorporada em dimetilsulfóxido (DMSO), comumente utilizado como solvente, ou em micelas de Pluronic® F-127.

A escolha de testar a incorporação da curcumina em micelas de Pluronic® F-127 foi sustentada pela hipótese de que o sistema micelar pudesse melhorar seu desempenho e diminuir sua concentração utilizada. Portanto, decidiu-se que a menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias cultivadas em cultura suspensa, independente da forma de solubilização da curcumina (DMSO ou micelas de Pluronic® F-127) seria a utilizada nos experimentos futuros.

Os experimentos de determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas evidenciaram que a curcumina incorporada às micelas de Pluronic® F-127 não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas. Este resultado pode ser atribuído ao tempo de incubação da curcumina no escuro (tempo de pré-irradiação). O tempo de 5 minutos pode não ter sido suficiente para permitir que a curcumina fosse devidamente encapsulada no interior da estrutura micelar, interferindo negativamente na liberação, entrega e eficácia da droga²⁰⁴.

Em contrapartida, a curcumina dissolvida em DMSO apresentou melhores resultados. Após os experimentos, observou-se que a concentração de 270 µM foi tanto a inibitória quanto bactericida mínima. Com base nesses resultados, estabeleceu-se que os grupos de estudo envolvendo a aplicação da TFDA seriam mediados por curcumina na concentração de 270 µM.

Todos os espécimes de dentina bovina incluídos no estudo foram submetidos a avaliação da microdureza Knoop superficial. Esta avaliação foi realizada com o intuito de padronizar a dureza da dentina e evitar possíveis vieses relacionados à microestrutura dos espécimes, interferindo assim nas avaliações posteriores. De acordo com os resultados obtidos, a média geral dos espécimes foi de $40,86 \pm 8,74$ KHN (Figura 22). Os valores encontrados estão de acordo com a média comumente relatada na literatura²⁵², garantindo assim a padronização dos espécimes que seriam utilizados.

Após a definição do protocolo de indução e da concentração de curcumina, assim como a padronização dos espécimes, deu-se sequência ao estudo. As lesões artificiais de cárie em dentina foram tratadas por diferentes abordagens envolvendo o uso de energia ultrassônica, aplicação de TFDA e vidros bioativos.

Baseada nos princípios de uma odontologia conservadora e nos conhecimentos acerca da doença cárie^{49-54,57,264}, e das diferenças morfológicas do

tecido cariado em si⁶⁴⁻⁶⁸, a remoção de lesão de cárie tem sido centrada na preservação de tecidos não desmineralizados e passíveis de remineralização⁵⁹, como a dentina afetada por cárie. Desta forma, a remoção total e não seletiva do tecido cariado⁶¹ não é mais justificável, além de aumentar os riscos de exposição pulpar quando da remoção de lesões profundas^{59,68,70,73-76,80,81}. Sendo assim, as evidências sugerem a remoção seletiva e conservadora, na medida do possível, como a opção de escolha do cirurgião-dentista em detrimento de uma remoção completa, devido ao menor risco de exposição e/ou complicações envolvendo o tecido pulpar e maior preservação tecidual^{15,68-76,80,81,105,108,265}.

No entanto, a dificuldade e subjetividade dos parâmetros clínicos para diferenciar tecido infectado e afetado por cárie e até que ponto a remoção deve ser realizada permanece como um dos maiores desafios na prática clínica^{39,59,60}. Além disso, os instrumentos convencionais utilizados na remoção de cárie, como as fresas esféricas em baixa rotação, dificultam uma remoção seletiva e controlada¹⁰²⁻¹⁰⁴. Neste sentido, novas instrumentos e estratégias têm sido desenvolvidas com a premissa de superar as limitações da remoção convencional^{103,106,107,109}, entre elas: remoção químico-mecânica¹¹⁶⁻¹²⁴; abrasão a ar^{125,126}; e utilização de dispositivos de ultrassom¹²⁷⁻¹³⁹.

Dispositivos de ultrassom são instrumentos oscilatórios que utilizam energia em uma frequência acima de 20 kHz¹²⁷ e têm sido uma alternativa na instrumentação cavitária. Neste estudo, um protótipo de dispositivo de ultrassom na frequência de 27,5 kHz foi desenvolvido especificamente para remoção de tecido afetado por cárie. Este protótipo gera movimentos oscilatórios por meio do método piezoelétrico¹³⁴, no qual a vibração é resultante da carga elétrica proveniente da deformação dimensional de discos piezocerâmicos¹²⁷. Este efeito piezoelétrico promove maior eficiência na transferência de energia e maior vibração¹²⁷. Desta forma, a oscilação das pontas diamantadas acopladas ao dispositivo de ultrassom pode promover um preparo conservador, remoção facilitada em áreas de difícil acesso, baixo nível de ruído, mínima alteração térmica dos tecidos e diminuição da sintomatologia dolorosa durante o preparo cavitário^{128,129}. Sendo assim, este dispositivo de ultrassom atende aos paradigmas atuais de odontologia conservadora e pode ajudar o cirurgião-dentista a executar uma remoção controlada e conservadora apenas do tecido afetado por cárie.

Após a remoção seletiva de tecido cariado, microrganismos viáveis ainda podem persistir na estrutura dentinária. No entanto, o papel desses microrganismos

residuais na progressão das lesões ainda é repleto de questionamentos¹⁷⁷. Em uma situação clínica, após a remoção da lesão de cárie a cavidade é restaurada com algum material de preenchimento. O selamento cavitário por meio da restauração isola os microrganismos residuais do meio bucal⁸², restringindo consideravelmente o acesso a nutrientes da dieta, especialmente os carboidratos, diminuindo assim a carga de microrganismos viáveis^{177,179}. No entanto, um estudo prévio sugeriu que bactérias residuais podem contribuir para a progressão de lesões de cárie mesmo com limitações de acesso a nutrientes¹⁷⁸, o que poderia afetar negativamente o prognóstico do tratamento restaurador a longo prazo. Neste sentido, a TFDA tem sido indicada como estratégia de descontaminação cavitária^{18,181} a fim de inativar os microrganismos residuais após a remoção de tecido cariado.

Inicialmente desenvolvidos para promover regeneração óssea, os biomateriais objetivavam a inércia no tecido hospedeiro²¹⁰⁻²¹². Com o avanço da bioengenharia, os biomateriais tem a premissa de interagir de maneira benéfica com o hospedeiro²¹³. Neste sentido, a utilização de vidros bioativos para promover regeneração e remineralização tecidual vem sendo empregada no campo da odontologia²³¹⁻²⁴⁵.

Especificamente neste estudo, os vidros bioativos foram utilizados com o intuito de promover a remineralização da dentina afetada por cárie após a remoção das lesões. O processo de remineralização envolve a troca de diferentes íons (Na^+ , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , F^-) existentes no arcabouço de silicato dos biovidros com os fluidos orais circundantes²¹³. Esta troca ocasiona uma super saturação destes íons nos fluidos, que posteriormente se precipitam na forma de uma camada amorfa de fosfato de cálcio²¹³. Esta camada, por sua vez, sofre processo de maturação e cristaliza-se em apatita, formando fortes e estáveis ligações com a dentina²¹³. Adicionalmente, a presença de partículas de vidros bioativos na interface adesiva pode controlar/inibir o crescimento bacteriano^{245,248-250} devido ao aumento do pH local, assim como prevenir a ocorrência de cárie recorrente²⁵¹. Dentre suas várias formas de aplicação, o contato direto do vidro bioativo com o tecido permite uma maior difusão das partículas no interior da dentina, facilitando a indução do processo de remineralização^{246,247}.

Considerando as vantagens dos instrumentos (ultrassom), técnicas (TFDA) e materiais (vidros bioativos) supracitados, conduziu-se experimentos avaliando diferentes abordagens no tratamento de lesões de cárie em dentina. Tratamentos isolados (FR e ULT), ou combinados (FR+TFDA; ULT+TFDA; FR+45S5; ULT+45S5; FR+F-18; ULT+F-18; FR+TFDA+45S5; FR+TFDA+F-18; ULT+TFDA+45S5;

ULT+TFDA+F-18) foram propostos com o intuito de avaliar a abordagem mais conservadora e efetiva, respeitando os princípios de mínima intervenção e lançando mão de técnicas capazes de potencializar a efetividade do tratamento e contribuir em um melhor prognóstico a longo prazo.

Para a avaliação dos tratamentos, diferentes métodos de análise foram utilizados com base em suas indicações e possibilidades de estudo. Os testes de microdureza, embora não forneçam os valores reais do conteúdo mineral da dentina, indiretamente evidenciam os reflexos de uma possível variação (perda ou ganho) de minerais⁹⁴. Especificamente nos testes de microdureza longitudinal, o perfil mineral do tecido em profundidade pode ser obtido⁹⁴, fornecendo informações adicionais da amostra. Em contrapartida, a análise de FT-Raman permite avaliar a composição química da dentina de forma não destrutiva e sem necessitar de preparos específicos da amostra⁹⁵. Já a microscopia confocal também é uma técnica não destrutiva que permite visualizações em profundidade⁹⁶ e tem sido utilizada para avaliar a eficácia de terapias antimicrobianas como a TFDA. A avaliação da resistência adesiva de materiais aos substratos dentários tem sido realizada por meio de testes de resistência de união onde corpos de prova são submetidos à uma força de deslocamento até a sua falha²⁰⁷. Dentre eles, o teste de microcisalhamento aplica forças de cisalhamento em pequenas áreas, possibilitando um mapeamento da região de fratura²⁰⁷.

Os dados de microdureza longitudinal evidenciaram que os valores de microdureza aumentaram em função da profundidade ($p < 0,05$), independente dos grupos avaliados (Tabela 3). Este resultado sugere que à medida que a profundidade aumenta, o nível de degradação estrutural da dentina em decorrência do processo de formação da lesão diminui, retomando valores próximos ao de uma dentina hígida nas profundidades finais. De acordo com um estudo prévio no qual a microdureza longitudinal de lesões artificiais de cárie em dentina induzidas pelo mesmo método de indução utilizado neste trabalho, a microdureza também aumentou em função de profundidade¹¹. No entanto, as profundidades iniciais (até 200 μm) apresentaram valores de microdureza abaixo de 10 KHN¹¹, diferentemente dos valores obtidos neste estudo para a mesma profundidade. Esta diferença pode ser atribuída aos tratamentos de remoção empregados neste estudo, inferindo que os tratamentos removeram o tecido mais amolecido e infectado por cárie, resultando em valores maiores mesmo nas profundidades iniciais em comparação ao estudo prévio.

A comparação dos valores de microdureza entre os grupos experimentais apontou que os espécimes removidos com ULT obtiveram valores menores em relação aos grupos removidos com FR ($p < 0,05$). É importante ressaltar que o processo carioso afeta negativamente as propriedades físicas e mecânicas da dentina. Durante o processo de desmineralização a hidroxiapatita é solubilizada pelos ácidos orgânicos provenientes das bactérias cariogênicas, resultando na dissolução de cristais minerais, redução do conteúdo mineral, aumento da porosidade e a consequente diminuição da microdureza^{97,98}. Além do mais, a literatura relata que os valores de microdureza da dentina afetada por cárie está entre 25 e 40 KHN⁹⁹. Tais valores foram os encontrados em nosso estudo para a grande maioria dos grupos de estudo, evidenciando a presença de dentina afetada após os diferentes tratamentos. Considerando o exposto acima, pode-se inferir que a remoção com ULT possibilitou uma remoção mais conservadora, visto que os menores valores de dureza indicam que maior quantidade de tecido afetado por cárie ainda está presente após a remoção, diferentemente da remoção com FR. Do ponto de vista de abordagem minimamente invasiva, esse resultado é promissor, pois sugere que o ULT é eficaz em remover de forma conservadora a lesão de cárie, preservando dentina afetada e removendo apenas a dentina infectada.

A aplicação de TFDA após os tratamentos de remoção não evidenciou nenhum efeito sobre a microdureza ($p > 0,05$), inferindo que a irradiação com luz LED, assim como a solução de curcumina, não ocasionaram na perda ou no ganho de conteúdo mineral e não alterando assim as propriedades mecânicas da dentina. Neste aspecto, a TFDA mostra-se uma terapia segura e eficaz, sem riscos de dano à estrutura dentinária.

A utilização de vidros bioativos também não promoveu efeitos significativos na microdureza da dentina ($p > 0,05$). Sendo assim, a precipitação de íons dos vidros bioativos e a consequente formação de hidroxiapatita não foram suficientes para aumentar os valores de microdureza a ponto de apresentarem diferença estatística significativa. Embora diferenças pontuais em determinadas profundidades evidenciassem uma discreta vantagem na aplicação do vidro bioativo F-18, a sua viabilidade clínica para este propósito necessita de mais estudos, sobretudo em condições *in situ* e *in vivo*.

É importante ressaltar que a análise de microdureza longitudinal apresenta algumas desvantagens, que incluem a destruição de amostras, dificuldade em obter

valores acurados de dureza em tecidos amolecidos como a dentina infectada, além de representar indiretamente apenas a integridade mecânica da dentina, sem qualquer correlação com a composição bioquímica da lesão de cárie^{74,99}. Sendo assim, estes resultados devem ser interpretados com cautela, tendo essas limitações levadas em consideração durante extrapolação dos mesmos.

As alterações orgânicas a inorgânicas da dentina durante o desenvolvimento da lesão de cárie podem inibir o crescimento de cristais de hidroxiapatita, resultando em efeitos bioquímicos significativos. Desta forma, avaliar essas alterações é fundamental para determinar tratamentos e protocolos, principalmente de remineralização. A espectroscopia Raman pode ser utilizada para esta finalidade, já que é um método de análise analítico e não-destrutivo capaz de determinar quimicamente diferentes regiões da dentina por meio da vibração molecular dos compostos em resposta à determinada excitação de luz^{7,100}.

No presente estudo, a análise de FT-Raman foi utilizada para avaliar as alterações nos picos de fosfato, carbonato e nas ligações de carbono e hidrogênio, com o intuito de verificar a influência dos diferentes tratamentos na composição inorgânica e orgânica da dentina. De acordo com os resultados, não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p > 0,05$), para nenhuma das profundidades e picos avaliados (Tabela 4). Idealmente esperava-se que os grupos que receberam a aplicação dos vidros bioativos apresentassem área integral dos picos maiores em relação aos grupos que não receberam. No entanto, a ausência de diferença estatística não exclui a efetividade dos vidros bioativos em promover remineralização do tecido dentinário. É possível que a análise de FT-Raman não seja ideal para detectar as alterações promovidas pelos vidros bioativos devido à maior profundidade de penetração do feixe de laser utilizado^{7,101}. Além disso, o processo de autoclavagem dos espécimes em alta temperatura (121°C) pode alterar significativamente os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina¹⁰¹, justificando a baixa área integral dos picos avaliados.

A microscopia confocal foi utilizada a fim de avaliar o efeito dos tratamentos sobre a viabilidade bacteriana. Para tanto, corante contendo iodeto de propídio e SYTO 9 foi empregado. Este corante cora as células bacterianas e quando as mesmas são excitadas por um laser emitem fluorescência. Sendo assim, células emitindo fluorescência na cor vermelha (iodeto de propídio) indicam inviabilidade, enquanto que células emitindo fluorescência na cor verde (SYTO 9) indicam viabilidade. Ademais, o

corante rodamina B foi empregado para corar a dentina, emitindo fluorescência azul. De acordo com a Figura 24, a lesão de cárie apresentou predominância de fluorescência verde, indicando grande quantidade de bactérias viáveis, visto que nenhum tratamento de remoção e/ou descontaminação foi empregado. Já o grupo controle positivo tratado com solução de clorexidina à 0,12%, o contrário foi observado, ou seja, predominância de fluorescência vermelha, indicando grande quantidade de bactérias inviáveis devido à morte celular, o que já era esperado, dado o conhecido potencial antimicrobiano da clorexidina.

Em relação aos grupos experimentais, observou-se que a aplicação de TFDA mediada por curcumina foi eficaz em inativar as bactérias, visto que os grupos de TFDA apresentam maior fluorescência vermelha em comparação aos grupos que foram removidas apenas com FR ou ULT (Figura 24). Esses achados evidenciam a TFDA como uma estratégia de descontaminação cavitária promissora e eficaz, capaz de inativar microrganismos e reduzir os efeitos da proliferação e atividade bacteriana no prognóstico restaurador.

Interessantemente, observou-se que a associação entre remoção com ULT seguida da aplicação de TFDA exibiu maior quantidade de fluorescência vermelha em comparação aos demais grupos experimentais (Figura 24). Este resultado sugere um possível efeito benéfico entre a energia ultrassônica e a TFDA, potencializando o efeito fotoinativador da TFDA, encorajando estudos futuros associando TFDA e energia ultrassônica como opção de tratamento de lesões cariosas.

A análise da viabilidade celular em profundidade, ao longo dos túbulos dentinários, também foi realizada por meio do corte longitudinal dos espécimes após os tratamentos (Figuras 25 – 38). As imagens do grupo controle negativo (Figura 25) apresentaram predominância de bactérias viáveis e praticamente ausência de bactérias inviáveis. A penetrabilidade bacteriana nos túbulos dentinários corrobora com a profundidade das lesões observadas nas análises de microradiografia transversal e confirma a efetividade do modelo de indução em formar lesões de cárie semelhantes às naturais, com viabilidade bacteriana adequada para testar o potencial antibacteriano dos tratamentos realizados. A Figura 26 também confirmou a conhecida efetividade da clorexidina como estratégia antibacteriana, visto que uma predominância de fluorescência na cor vermelha foi observada. De maneira geral, os grupos removidos com FR (Figuras 27 – 32) apresentaram menor carga bacteriana residual após os tratamentos em comparação aos grupos removidos com ULT

(Figuras 33 a 38), sugerindo que a remoção com FR remove maior quantidade de tecido cariado por meio de uma remoção mais invasiva e menos controlada. Entretanto, independentemente do método de remoção e da aplicação de vidros bioativos, a aplicação de TFDA promoveu uma maior inativação bacteriana (Figuras 28, 30, 32, 34, 36 e 38) em comparação aos grupos que não receberam TFDA. Desta forma, as imagens de microscopia confocal evidenciam a TFDA como uma estratégia antibacteriana e de desinfecção cavitária segura e eficaz. No que diz respeito à aplicação dos vidros bioativos (Figuras 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37 e 38), os mesmos não exerceram efeito significativo na inativação bacteriana, independentemente do tipo de vidro bioativo e da associação com os métodos de remoção e da TFDA. Este resultado pode ser atribuído ao curto tempo de contato do vidro bioativo, considerando que sua ação pode ser gradual e requerer um maior tempo²²².

Embora a remoção seletiva de tecido cariado seja interessante do ponto de vista biológico e conservador, a presença de dentina afetada por cárie pode acarretar em limitações e prejuízos na adesão de materiais restauradores, visto que estudos têm demonstrado valores de resistência adesiva mais baixos para a dentina afetada em comparação à dentina hígida⁸³⁻⁸⁵. Ademais, o fato de a dentina afetada conter microrganismos residuais viáveis pode afetar negativamente o prognóstico restaurador. Neste sentido, estratégias de descontaminação da dentina afetada antes da restauração da cavidade têm sido empregadas com o intuito de diminuir a carga de microrganismos residuais e promover uma camada híbrida mais estável. Dentre diversas estratégias de desinfecção, a TFDA e até mesmo os vidros bioativos, dado seu potencial antibacteriano, podem ser utilizados para descontaminar a cavidade previamente à restauração^{180,181,208,209}. No entanto, liberação de espécies reativas de oxigênio decorrentes da TFDA podem inibir a polimerização de materiais resinosos e comprometer a interface e resistência adesiva³⁸.

Além do tipo e das características histomorfológicas do substrato e da descontaminação cavitária, a estratégia utilizada também pode influenciar no comportamento da interface adesiva. Adesivos aplicados na estratégia condiciona-e-lava apresentam valores de resistência adesiva maiores em comparação às estratégias utilizando adesivos autocondicionantes de dois passos⁸⁵.

No presente estudo, após a remoção das lesões artificiais de cárie, descontaminação por meio de TFDA e aplicação de vidros bioativos, foi realizado o teste de microcisalhamento a fim de avaliar a interface adesiva entre a resina

composta e o substrato dentinário utilizando um adesivo autocondicionante de dois passos (Clearfil SE Bond).

De acordo com os resultados obtidos após 24 horas de armazenamento em ambiente úmido (Figura 25), a resistência adesiva (MPa) de todos os grupos experimentais foi menor em comparação ao grupo controle (dentina hígida) ($p < 0,05$), corroborando com estudos prévios^{84,85,209}. Este resultado já era esperado haja vista que os grupos experimentais foram submetidos ao processo de indução artificial de cárie, promovendo alterações histomorfológicas na dentina em comparação à dentina hígida. Além disso, os menores valores de resistência adesiva para os grupos experimentais pode ser atribuído ao grau de desmineralização da dentina afetada, que acarreta na formação de uma camada híbrida mais espessa e irregular constituída por uma maior quantidade de componentes orgânicos⁸³. Embora a resistência tenha sido menor, este resultado evidencia que os tratamentos de remoção foram conservadores e preservaram a dentina afetada de maneira satisfatória.

A comparação intergrupo dos resultados de resistência adesiva também evidenciou que não houve diferença entre nenhum dos grupos experimentais ($p > 0,05$; Figura 25). Sendo assim, é possível inferir que a remoção de lesão de cárie com ULT, a aplicação de TFDA e de vidros bioativos não promove nenhum efeito significativo na resistência de união entre a resina composta e o substrato dentinário quando da utilização de adesivo autocondicionante de dois passos e podem ser consideradas estratégias seguras no que diz respeito a adesão.

Embora os grupos removidos com ULT tenham apresentados valores de resistência adesiva ligeiramente superiores em comparação aos grupos removidos com FR, tais diferenças não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$; Figura 25), sugerindo que o ULT promove uma característica de superfície da dentina residual incapaz de prejudicar a adesão ao substrato.

Os testes de resistência adesiva deste estudo foram conduzidos para investigar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a interface adesiva. Particular curiosidade recaía sobre os resultados de resistência adesiva dos grupos que receberiam aplicação da TFDA, haja vista a possibilidade das espécies reativas de oxigênio liberadas durante a reação fotodinâmica inibirem a polimerização³⁸, tanto do sistema adesivo quanto da resina composta, impactando diretamente na resistência adesiva e na longevidade do tratamento restaurador. No entanto, foi observado que a aplicação da TFDA mediada por curcumina não afetou a polimerização dos materiais resinosos

e não exerceu nenhum efeito significativo sobre a resistência adesiva ($p > 0,05$; Figura 25). Embora a literatura seja controversa em relação ao impacto da TFDA na adesão aos substratos dentários, estudos recentes têm demonstrado que a TFDA, especialmente a mediada por curcumina, não promove nenhum efeito negativo^{181,208,209}. Não o bastante, um estudo prévio relatou que a TFDA mediada por curcumina foi capaz de aumentar os valores de resistência adesiva¹⁸⁰, embora estudos que investiguem seu efeito a longo prazo sejam necessários para confirmar esses resultados.

A aplicação de vidros bioativos previamente à aplicação de sistemas adesivos e restauração em resina composta têm sido capaz de proporcionar aumento dos valores de resistência adesiva²³⁵. Entretanto, os resultados do presente estudo mostraram que a aplicação de vidros bioativos, tanto de F-18 quanto de 45S5, não promoveram nenhum aumento ou diminuição significativa dos valores de resistência adesiva ($p > 0,05$; Figura 25). Esta ausência de diferenças pode ser explicada pela presença de minerais ácido-resistentes provenientes do processo de formação da lesão de cárie²⁶⁶, que prejudicaram a interação química dos vidros bioativos²³⁵. Além disso, o tempo de armazenamento dos espécimes antes dos testes de resistência adesiva (24 horas) também pode ter influenciado os resultados do presente estudo. Considerando que a precipitação de íons e formação de hidroxycarbonoapatita pelos vidros bioativos ocorre gradualmente e requer tempo²²², 24 horas pode não ter sido suficiente para uma formação mineral capaz de impactar a resistência adesiva. Além disso, a incorporação dos vidros bioativos em gel ao invés de aplicado em suspensão pode ter diminuído seu potencial de ação.

Após os testes de microcisalhamento, foi avaliado o padrão de falha das fraturas na superfície da dentina. De acordo com a Figura 26, a falha do tipo adesiva foi a mais predominante em todos os grupos de pesquisa, exceto para o grupo FR. Este tipo de falha é considerado favorável, pois evidencia que a estratégia adesiva utilizada não foi capaz de degradar a resina ou dentina²³⁵. Além disso, valores relativamente mais baixos de resistência adesiva, como os apresentados pelos grupos experimentais, tendem a apresentar predominância de falhas adesivas.

Limitações metodológicas são inerentes, especialmente em estudos *in vitro*. Portanto este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação e extrapolação clínica dos resultados. Embora as lesões artificiais de cárie sejam semelhantes as lesões naturais, é fundamental que estudos sejam

conduzidos utilizando lesões naturais em dentes humanos, a fim de simular as condições *in vivo* de maneira mais fidedigna. Considerando a análise de FT-Raman, outros métodos de análise podem ser empregados para avaliar os efeitos dos tratamentos na composição dentinária em maiores detalhes, entre eles a análise de difração de raios-x pode ser uma opção adequada. Além disso, a investigação tardia da interface adesiva é essencial para avaliar o efeito dos tratamentos ao longo do tempo, visto que a degradação da camada híbrida e/ou a atividade dos vidros bioativos podem acarretar em resultados diferentes dos obtidos neste trabalho. A investigação de diferentes estratégias adesivas também é interessante, a fim de avaliar se diferentes modos de aplicação e tipos de sistemas adesivos podem interferir nos resultados de resistência adesiva.

Este estudo apresentou novas abordagens de tratamento de lesões de cárie por meio da combinação de instrumentos, terapias e materiais. Os resultados apresentados fortalecem o corpo de evidencia em relação aos efeitos destes tratamentos na dentina, na viabilidade celular bacteriana e também na adesão de materiais resinosos, e podem encorajar estudos futuros com o intuito de aprimorar os tratamentos e propiciar uma abordagem conservadora, biológica e minimamente invasiva do tratamento da lesão de cárie.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas limitações deste estudo, podemos concluir que:

- A remoção de lesões de cárie com dispositivo de ultrassom promoveu remoção conservadora, preservando a dentina afetada;
- A TFDA foi eficaz na inativação das bactérias residuais após a remoção, apresentando-se como uma opção segura e eficaz na descontaminação de lesões de cárie em dentina;
- A aplicação de vidros bioativos F-18 e 45S5 não foi capaz de promover remineralização significativa da dentina;
- A remoção com ultrassom, a aplicação de TFDA e de vidros bioativos não interferiram na resistência adesiva à dentina quando da utilização de sistema adesivo autocondicionante de dois passos;

REFERÊNCIAS*

1. Silva TC, Pereira AFF, Exterkate RAM, Bagnato VS, Buzalaf MAR, Machado MADAM, et al. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. *J Dent*. 2012; 40(1): 41–7.
2. Svensäter G, Borgström M, Bowden GHW, Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res*. 2003; 37(6): 395–403.
3. Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994; 73(3): 672–81.
4. 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.
5. Philip N, Suneja B, Walsh L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *Br Dent J*. 2018; 224(4): 219–25.
6. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Res*. 1998; 32(6): 456–62.
7. Pacheco LF, de Freitas ÉCB, 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.
8. Wierichs RJ, Stausberg S, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Esteves-Oliveira M. Caries-preventive effect of NaF, NaF plus TCP, NaF plus CPP-ACP, and SDF varnishes on sound dentin and artificial dentin caries in vitro. *Caries Res*. 2018; 52(3): 199–211.
9. 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.
10. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 1982; 16(3): 201–10.
11. 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.
12. 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.

* 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. Souza BM de, Fernandes Neto C, Salomão PMA, Vasconcelos LRSM de, Andrade FB de, Magalhães AC, et al. Analysis of the antimicrobial and anti-caries effects of TiF₄ varnish under microcosm biofilm formed on enamel. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e20170304.
14. Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LMA, Cury JA. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling.* 2014; 30(5): 579–88.
15. 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.
16. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EHG, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. *J Oral Rehabil.* 2011; 38(4): 253–62.
17. Banerjee A. Minimal intervention dentistry: Part 7. Minimally invasive operative caries management: Rationale and techniques. *Br Dent J.* 2013; 214(3): 107–11.
18. 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.
19. Elkady DM, Khater AGA, Schwendicke F. Chlorhexidine to improve the survival of ART restorations: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2020; 103: 103491.
20. Breschi L, Maravic T, Comba A, Cunha SR, Loguercio AD, Reis A, et al. Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dent Mater.* 2020; 36(5): 672–80.
21. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent.* 2020; 103: 103497.
22. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(5): 515–21.
23. Tartaglia GM, Tadakamadla SK, Connelly ST, Sforza C, Martín C. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf.* 2019; 10: 2042098619854881.
24. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van Der Velden U, Van Der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(11): 1042–55.
25. Zanin ICJ, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(2): 324–30.

26. Giusti JSM, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26(4): 281–7.
27. 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.
28. Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P. The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials.* 2009; 30(18): 3158–66.
29. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992; 55(1): 145–57.
30. Santezi C, Reina BD, Dovigo LN. Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections - a review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018; 21: 409–15.
31. da Mota ACC, Leal CRL, Olivani 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.
32. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694–707.
33. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against streptococcus mutans in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013; 10(3): 313–9.
34. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004; 75(10): 1343–9.
35. O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2009; 85(5): 1053–74.
36. 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): 1–23.
37. Araújo NC, Fontana CR, Gerbi MEM, Bagnato VS. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30(2): 96–101.
38. Ramos ATPR, Garcia Belizário L, Venção AC, Fagundes Jordão-Basso KC, de Souza Rastelli AN, de Andrade MF, et al. Effects of photodynamic therapy on the adhesive interface of fiber posts cementation protocols. *J Endod.* 2018; 44(1): 173–8.
39. Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Res.* 2000; 34(2): 144–50.

40. Koubi S, Tassery H. Minimally invasive dentistry using sonic and ultra-sonic devices in ultraconservative class 2 restorations. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9(2): 155–65.
41. Tirapelli C. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res.* 2010; 24(4): 381–7.
42. Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2006; 17(11): 967–78.
43. Chinelatti MA, Tirapelli C, Milori SA, Jasinevicius RG, Peitl O, Zanotto ED. Effect of a bioactive glass ceramic on the control of enamel and dentin erosion lesions. *Braz Dent J.* 2017; 28(4): 489–97.
44. Black GV. Susceptibility and immunity in dental caries. *Dent Cosm.* 1899; 41: 826–30.
45. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 92.
46. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960; 1(4): 304–20.
47. Tanzer JM. Dental caries is a transmissible infectious disease: the Keyes and Fitzgerald revolution. *J Dent Res.* 1995; 74(9): 1536–42.
48. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976; 9: 65–107.
49. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005; 33(4): 248–55.
50. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004; 38(3): 182–91.
51. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2): 263–71.
52. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017; 3: 17030.
53. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020; 54(1): 7–14.
54. Tanner ACR, Kressirer CA, Faller LL. Understanding caries from the oral microbiome perspective. *J Calif Dent Assoc.* 2016; 44(7): 437–46.
55. Koo H, Bowen WH. *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. *Future Microbiol.* 2014; 9(12): 1295–7.

56. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90(3): 294-303.
57. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* 2015; 49: 46–54.
58. Colombo AP V, Tanner ACR. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *J Dent Res.* 2019; 98(4): 373–85.
59. 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.
60. Kidd EAM. How “clean” must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004; 38(3): 305–13.
61. Black GV. The technical procedures in filling teeth. A work on operative dentistry. 2nd ed. Chicago: Medico-Dental Publishing; 1908.
62. Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining. *J Dent Res.* 1976; 55(4): 678–83.
63. Kuboki Y, Liu CF, Fusayama T. Mechanism of differential staining in carious dentin. *J Dent Res.* 1983; 62(6): 713–4.
64. Aggarwal V, Singla M, Yadav S, Yadav H. The effect of caries excavation methods on the bond strength of etch-and-rinse and self-etch adhesives to caries affected dentine. *Aust Dent J.* 2013; 58(4): 454–60.
65. Ricketts D, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 2013(3): CD003808.
66. 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.
67. 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 μ TBS. *Braz Dent J.* 2017; 28(1): 16–23.
68. Li T, Zhai X, Song F, Zhu H. Selective versus non-selective removal for dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* 2018; 76(2): 135–40.
69. Frencken JE, Peters MC, Manton DJ, Leal SC, Gordan V V., Eden E. Minimal intervention dentistry for managing dental caries - a review: report of a FDI task group. *Int Dent J.* 2012; 62(5): 223–43.
70. Schwendicke F. Contemporary concepts in carious tissue removal: a review. *J Esthet Restor Dent.* 2017; 29(6): 403–8.

71. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent of human carious dentin. *J Dent Res.* 1983; 62(1): 7–10.
72. Ngo HC, Mount G, Mc Intyre J, Tuisuva J, Von Doussa RJ. Chemical exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: an in vivo study. *J Dent.* 2006; 34(8): 608–13.
73. Fontana M. Limited evidence for main reason for failure of partially excavated and restored teeth. *Evid Based Dent.* 2014; 15(1): 16–7.
74. Schwendicke F, Dörfer CE, Paris S. Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2013; 92(4): 306–14.
75. Maltz M, Koppe B, Jardim JJ, Alves LS, de Paula LM, Yamaguti PM, et al. Partial caries removal in deep caries lesions: a 5-year multicenter randomized controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2018; 22(3): 1337–43.
76. Jardim JJ, Mestrinho HD, Koppe B, de Paula LM, Alves LS, Yamaguti PM, et al. Restorations after selective caries removal: 5-year randomized trial. *J Dent.* 2020; 99: 103416.
77. Barros MMAF, De Queiroz Rodrigues MI, Muniz FWMG, Rodrigues LKA. Selective, stepwise, or nonselective removal of carious tissue: which technique offers lower risk for the treatment of dental caries in permanent teeth? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2020;24(2):521–32.
78. Bjørndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.* 2000; 34(6): 502–8.
79. Bjørndal L. Indirect pulp therapy and stepwise excavation. *J Endod.* 2008; 34(7 Suppl.): 29–33.
80. Maltz M, Garcia R, Jardim JJ, De Paula LM, Yamaguti PM, Moura MS, et al. Randomized trial of partial vs. stepwise caries removal: 3-year follow-up. *J Dent Res.* 2012; 91(11): 1026–31.
81. Hoefler V, Nagaoka H, Miller CS. Long-term survival and vitality outcomes of permanent teeth following deep caries treatment with step-wise and partial-caries-removal: a systematic review. *J Dent.* 2016; 54: 25–32.
82. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int.* 2002; 33(2): 151–9.
83. Erhardt M, Toledano M, Osorio R, Pimenta L. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008; 24(6): 786–98.
84. Nicoloso G, Antoniazzi B, Lenzi T, Soares F, Rocha R. The bonding performance of a universal adhesive to artificially-created caries-affected dentin. *J Adhes Dent.* 2017; 19(4): 317–21.

85. Lenzi T, Soares F, Raggio D, Pereira G, Rocha R. Dry-bonding etch-and-rinse strategy improves bond longevity of a universal adhesive to sound and artificially-induced caries-affected primary dentin. *J Adhes Dent*. 2016; 18(6): 475–82.
86. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent*. 2003; 31(3): 161–71.
87. McBain AJ. Chapter 4 in vitro biofilm models. an overview. *Adv Appl Microbiol*. 2009; 69: 99–132.
88. Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent*. 2016; 50: 1–11.
89. 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.
90. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44(4): 372–9.
91. 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.
92. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017; 33(8): 661–75.
93. Higham SM, Pretty IA, Edgar WM, Smith PW. The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent*. 2005; 33(3 spec iss): 235–41.
94. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992; 71(Spec No): 924–8.
95. Torres CP, Miranda Gomes-Silva J, Menezes-Oliveira MAH, Silva Soares LE, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. FT-Raman spectroscopy, μ -EDXRF spectrometry, and microhardness analysis of the dentin of primary and permanent teeth. *Microsc Res Tech*. 2018; 81(5): 509–14.
96. Giardino L, Del Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB. Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agents in infected dentine: an ex vivo confocal laser scanning microscopy study. *Int Endod J*. 2018; 51(4): 448–56.
97. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*. 2015; 94(2): 241–51.

98. Oliveira-Reis B, Maluly-Proni A, Fagundes T, Vasconcelos G, Bresciani E, Prakki A, et al. Influence of protease inhibitors on the degradation of sound, sclerotic and caries-affected demineralized dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019; 97: 1–6.
99. Banerjee A, Cook R, Kellow S, Shah K, Festy F, Sherriff M, et al. A confocal micro-endoscopic investigation of the relationship between the microhardness of carious dentine and its autofluorescence. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(1): 75–9.
100. Alturki M, Koller G, Warburton F, Almhöjd U, Banerjee A. Biochemical characterisation of carious dentine zones using Raman spectroscopy. *J Dent.* 2021; 105: 103558.
101. Soares L, do Espírito Santo AM, Junior A, Zanin F, da Silva Carvalho C, de Oliveira R, et al. Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 1: Fourier transform-Raman study. *J Biomed Opt.* 2009; 14(2): 024001.
102. Celiberti P, Francescut P, Lussi A. Performance of four dentine excavation methods in deciduous teeth. *Caries Res.* 2006;40(2):117–23.
103. 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.
104. Ferraz C, Freire AR, Mendonça JS, Fernandes CAO, Cardona JC, Yamauti M. Effectiveness of different mechanical methods on dentin caries removal: micro-CT and digital image evaluation. *Oper Dent.* 2015; 40(3): 263–70.
105. Neves ADA, Coutinho E, De Munck J, Van Meerbeek B. Caries-removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: a micro-CT investigation. *J Dent.* 2011; 39(2): 154–62.
106. Neuhaus KW, Ciucchi P, Donnet M, Lussi A. Removal of enamel caries with an air abrasion powder. *Oper Dent.* 2010; 35(5): 538–46.
107. Motisuki C, Lima LM, Bronzi ES, Spolidorio DMP, Santos-Pinto L. The effectiveness of alumina powder on carious dentin removal. *Oper Dent.* 2006; 31(3): 371–6.
108. Silva NRFA, Carvalho RM, Pegoraro LF, Tay FR, Thompson VP. Evaluation of a self-limiting concept in dentinal caries removal. *J Dent Res.* 2006; 85(3): 282–6.
109. Boston DW. New device for selective dentin caries removal. *Quintessence Int.* 2003; 34(9): 678–85.
110. Yip HK, Samaranayake LP. Caries removal techniques and instrumentation: a review. *Clin Oral Investig.* 1998; 2(4): 148–54.
111. Crawford PR. The birth of the bur (and how a Canadian changed it all). *J Can Dent Assoc.* 1990; 56(2): 123–6.

112. De Almeida Neves A, Coutinho E, Cardoso MV, Lambrechts P, Van Meerbeeke B. Current concepts and techniques for caries excavation and adhesion to residual dentin. *J Adhes Dent*. 2011; 13(1): 7–22.
113. Yazici AR, Özgünaltay G, Dayangaç B. A scanning electron microscopic study of different caries removal techniques on human dentin. *Oper Dent*. 2002; 27(4): 360–6.
114. Allen KL, Salgado TL, Janal MN, Thompson VP. Removing carious dentin using a polymer instrument without anesthesia versus a carbide bur with anesthesia. *J Am Dent Assoc*. 2005; 136(5): 643–51.
115. Dammaschke T, Rodenberg TN, Schäfer E, Ott KHR. Efficiency of the polymer bur SmartPrep compared with conventional tungsten carbide bur in dentin caries excavation. *Oper Dent*. 2006; 31(2): 256–60.
116. Goldman M, Kronman J. Preliminary report on a chemo-mechanical means of removing caries. *J Am Dent Assoc*. 1976; 93: 1149–53.
117. Tonami K, Araki K, Mataka S, Kurosaki N. Effects of chloramines and sodium hypochlorite on carious dentin. *J Med Dent Sci*. 2003; 50(2): 139–46.
118. Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemo-mechanical caries removal: A review of the techniques and latest developments. *Br Dent J*. 2000; 188(8): 427–30.
119. Barwart O, Moschen I, Graber A, Pfaller K. In-vitro study to compare the efficacy of N-monochloro-D,L-2-aminobutyrate (NMAB, GK-101E) and water in caries removal. *J Oral Rehabil*. 1991; 18(6): 523–9.
120. Gulzar S, Arora R, Shah AH, Bhardwaj B, Abusalim G, Khalil HS, et al. Antibacterial activity of two chemomechanical caries removal gels on carious dentin of primary teeth: an in vitro Study. *J Contemp Dent Pr*. 2016; 17(12): 1027–32.
121. Cardoso M, Coelho A, Lima R, Amaro I, Paula A, Marto CM, et al. Efficacy and patient's acceptance of alternative methods for caries removal—a systematic review. *J Clin Med*. 2020; 9(11): 3407.
122. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries: a multi-centre Study. *Caries Res*. 1999; 33(3): 171–7.
123. Yazici AR, Atilla P, Özgünaltay G, Müftüoğlu S. In vitro comparison of the efficacy of Carisolv™ and conventional rotary instrument in caries removal. *J Oral Rehabil*. 2003; 30(12): 1177–82.
124. Lager A, Thornqvist E, Ericson D. Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or carisolv. *Caries Res*. 2003; 37(3): 206–11.
125. Paolinelis G, Watson TF, Banerjee A. Microhardness as a predictor of sound and carious dentine removal using alumina air abrasion. *Caries Res*. 2006; 40(4): 292–5.

126. Paolinelis G, Banerjee A, Watson TF. An in vitro investigation of the effect and retention of bioactive glass air-abrasive on sound and carious dentine. *J Dent*. 2008; 36(3): 214–8.
127. Chen YL, Chang HH, Chiang YC, Lin CP. Application and development of ultrasonics in dentistry. *J Formos Med Assoc*. 2013; 112(11): 659–65.
128. 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): e020840.
129. Sheets CG, Paquette JM. Ultrasonic tips for conservative restorative dentistry. *Dent Today*. 2002; 21(10): 102–4.
130. Van Meerbeek B, Munck J De, Mattar D, Landuyt K Van, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent*. 2003; 28(5): 647–60.
131. Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. Scanning electron microscopic observations of human dentine after mechanical caries excavation. *J Dent*. 2000; 28(3): 179–86.
132. Hugo B, Stassinakis A. Preparation and restoration of small interproximal carious lesions with sonic instruments. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998; 10(3): 353–9.
133. Liebenberg WH. Sonicsys approx: an innovative addition to the restorative continuum. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998; 10(7): 913–22.
134. Laird WRE, Walmsley AD. Ultrasound in dentistry. Part 1-biophysical interactions. *J Dent*. 1991; 19(1): 14–7.
135. Vanderlei AD, Borges ALS, Cavalcanti BN, Rode SM. Ultrasonic versus high-speed cavity preparation: Analysis of increases in pulpal temperature and time to complete preparation. *J Prosthet Dent*. 2008; 100(2): 107–9.
136. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J*. 2000; 188(9): 476–82.
137. Krejci I, Dietschi D, Lutz FU. Principles of proximal cavity preparation and finishing with ultrasonic diamond tips. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. 1998; 10(3): 295–8.
138. Antonio AG, Primo LG, Maia LC. Case report: ultrasonic cavity preparation – an alternative approach for caries removal in paediatric dentistry. *Eur J Paediatr Dent*. 2005; 6(2): 105–8.
139. 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(2): 268–72.

140. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(4): 847–67.
141. Balhaddad AA, Melo MAS, Gregory RL. Inhibition of nicotine-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation by salts solutions intended for mouthrinses. *Restor Dent Endod.* 2019; 44(1): e4.
142. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28(8): 668–81.
143. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 78–85.
144. Zhan L. Rebalancing the caries microbiome dysbiosis: targeted treatment and sugar alcohols. *Adv Dent Res.* 2018; 29(1): 110–6.
145. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004; 9: 1267–77.
146. Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci.* 2005; 47(2): 59–64.
147. Cvitkovitch DG, Senadheera D. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 631: 178–88.
148. 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: 10.
149. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.* 2010; 192(12): 3024–32.
150. Splieth CH, Kanzow P, Wiegand A, Schmoeckel J, Jablonski-Momeni A. How to intervene in the caries process: proximal caries in adolescents and adults—a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(5): 1623–36.
151. Silva Teófilo MÍ, de Carvalho Russi TMAZ, de Barros Silva PG, Balhaddad AA, Melo MAS, Rolim JPML. The impact of photosensitizer selection on bactericidal efficacy of PDT against cariogenic biofilms: a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021; 33: 102046.
152. 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.
153. Melo MAS, De-Paula DM, Lima JPM, Borges FMC, Steiner-Oliveira C, Nobredos-Santos M, et al. In vitro photodynamic antimicrobial chemotherapy in dentine contaminated by cariogenic bacteria. *Laser Phys.* 2010; 20(6): 1504–13.

154. Tappeiner H von. Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe). *Ergebn Physiol.* 1909; 8: 698–741.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014; 32(3): 415–25.
159. Raghavendra M, Koregol A, Bholá S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J.* 2009; 54 Suppl 1: S102-9.
160. M. Scherer K, H. Bisby R, W. Botchway S, W. Parker A. New approaches to photodynamic therapy from types I, II and III to type IV using one or more photons. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016; 17(2): 171–89.
161. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(17): 7223–8.
162. Alves E, Faustino MAF, Neves MGPMS, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem.* 2014; 6(2): 141–64.
163. Da M, Baptista S, Cadet J, Mascio P Di, Ghogare AA, Greer A, et al. Type I and II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways † HHS Public Access. *Photochem Photobiol.* 2017; 93(4): 912–9.
164. 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.
165. Ghorbani J, Rahban D, Aghamiri S, Teymouri A, Bahador A. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Ther.* 2018; 27(4): 293–302.
166. 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.
167. Zhu TC, Finlay JC. The role of photodynamic therapy (PDT) physics. *Med Phys.* 2008; 35(7): 3127–36.

168. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(6): 2329–35.
169. Dovigo LN, Carmello JC, De Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol.* 2013; 51(3): 243–51.
170. 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.
171. Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(4): 1113–25.
172. Araújo NC, De Menezes RF, Carneiro VSM, Dos Santos-Neto AP, Fontana CR, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of cariogenic pathogens using curcumin as photosensitizer. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35(5): 259–63.
173. Lavaee F, Amanati A, Ramzi M, Naseri S, Shakiba Sefat H. Evaluation of the effect of photodynamic therapy on chemotherapy induced oral mucositis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 30: 101653.
174. Stasio D Di, Romano A, Gentile C, Maio C, Lucchese A, Serpico R, et al. Systemic and topical photodynamic therapy (PDT) on oral mucosa lesions: an overview. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2018; 32(2 Suppl 1): 123–6.
175. Lotufo MA, Tempestini Horliana ACR, Santana T, de Queiroz AC, Gomes AO, Motta LJ, et al. Efficacy of photodynamic therapy on the treatment of herpes labialis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 29: 101536.
176. Jin X, Xu H, Deng J, Dan H, Ji P, Chen Q, et al. Photodynamic therapy for oral potentially malignant disorders. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019; 28: 146–52.
177. Bitello-Firmino L, Soares VK, Damé-Teixeira N, Parolo CCF, Maltz M. Microbial load after selective and complete caries removal in permanent molars: a randomized clinical trial. *Braz Dent J.* 2018; 29(3): 290–5.
178. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res.* 2013; 47(6): 591–600.
179. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(5): 2467–72.
180. Alrahlah A, Niaz MO, Abrar E, Vohra F, Rashid H. Treatment of caries affected dentin with different photosensitizers and its effect on adhesive bond integrity to resin composite. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 31: 101865.
181. Alrahlah A, Naseem M, Tanveer SA, Abrar E, Charania A, AIRifaiy MQ, et al. Influence of disinfection of caries effected dentin with different concentration of silver diamine fluoride, curcumin and Er, Cr:YSGG on adhesive bond strength to resin composite. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32: 102065.

182. 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.
183. De Freitas MTM, Soares TT, Aragão MGB, Lima RA, Duarte S, Zanin ICJ. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on mono- and multi-species cariogenic biofilms: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2017; 35(5): 239–45.
184. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016; 473(4): 347–64.
185. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7(2): 61–75.
186. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CA de S, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895–903.
187. 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.
188. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30(7): 393–9.
189. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(2): 885–90.
190. 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.
191. Priyadarsini KI. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules.* 2014; 19(12): 20091–112.
192. 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.
193. Liu H, Liang Y, Wang L, Tian L, Song R, Han T, et al. In vivo and in vitro suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog. *PLoS One.* 2012; 7(10): e48075.
194. Bachmeier BE, Mohrenz I V., Mirisola V, Schleicher E, Romeo F, Höhneke C, et al. Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFκB. *Carcinogenesis.* 2008; 29(4): 779–89.
195. Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.* 2006; 98(4): 720–4.

196. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. Pharmazie.* 2010; 65(8): 600–6.
197. 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.
198. Krausz AE, Adler BL, Cabral V, Navati M, Doerner J, Charafeddine RA, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine.* 2015; 11(1): 195–206.
199. Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 2009; 10(2): 81–95.
200. Cozzolino M, Delcanale P, Montali C, Tognolini M, Giorgio C, Corrado M, et al. Enhanced photosensitizing properties of protein bound curcumin. *Life Sci.* 2019; 233: 116710.
201. Duse L, Agel MR, Pinnapireddy SR, Schäfer J, Selo MA, Ehrhardt C, et al. Photodynamic therapy of ovarian carcinoma cells with curcumin-loaded biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2019; 11(6) :282.
202. Fonseca-Santos B, Bonifácio BV, Baub TM, Gremião MPD, Chorilli M. In-situ gelling liquid crystal mucoadhesive vehicle for curcumin buccal administration and its potential application in the treatment of oral candidiasis. *J Biomed Nanotechnol.* 2019; 16(6): 1334–44.
203. Fonseca-Santos B, dos Santos AM, Rodero CF, Daflon Gremião MP, Chorilli M. Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 4553–62.
204. Dantas Lopes dos Santos D, Besegato JF, de Melo PBG, Oshiro Junior JA, Chorilli M, Deng D, et al. Curcumin-loaded Pluronic® F-127 micelles as a drug delivery system for curcumin-mediated photodynamic therapy for oral application. *Photochem Photobiol.* 2021; 97(5): 1072–88.
205. Kabanov A V, Batrakova E V, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release.* 2002; 82(2–3): 189–212.
206. Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, Seilkhanov SK, Rakhypbekov TK, Lau WM, et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm.* 2016; 502(1–2): 70–9.
207. Armstrong S, Geraldeli S, Maia R, Raposo LH, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of “micro” bond strength test methods. *Dent Mater.* 2010; 26(2): 50–62.

208. Alshahrani A, Abrar E, Maawadh AM, Al-Hamdan RS, Almohareb T, AlFawaz Y, et al. Management of caries affected dentin (CAD) with resin modified glass ionomer cement (RMGIC) in the presence of different caries disinfectants and photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 32: 101978.
209. Al Deeb L, Bin-Shuwaish MS, Abrar E, Naseem M, Al-Hamdan RS, Maawadh AM, et al. Efficacy of chlorhexidine, Er Cr YSGG laser and photodynamic therapy on the adhesive bond integrity of caries affected dentin. An in-vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 31: 101875.
210. Hench LL. Chronology of bioactive glass development and clinical applications. *New J Glas Ceram.* 2013; 03(02): 67–73.
211. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 2013; 9(1): 4457–86.
212. Krishnan V, Lakshmi T. Bioglass: a novel biocompatible innovation. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013; 4(2): 78–83.
213. Fernando D, Attik N, Pradelle-Plasse N, Jackson P, Grosogoeat B, Colon P. Bioactive glass for dentin remineralization: a systematic review. *Mater Sci Eng C.* 2017; 76: 1369–77.
214. Zhao J, Liu Y, Sun W Bin, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011; 5: 40.
215. Combes C, Rey C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomater.* 2010; 6(9): 3362–78.
216. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent.* 2011; 39(6): 430–7.
217. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs.* 2005; 8(3): 131–6.
218. Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering - a review. *J Biomed Nanotechnol.* 2014; 10(10): 3124–40.
219. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater.* 2014; 30(1): 77–96.
220. Niu LN, Jiao K, Wang T Da, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent.* 2014; 42(5): 517–33.
221. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 808–14.
222. Crovace MC, Souza MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanotto ED. Biosilicate® — a multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *J Non Cryst Solids.* 2016; 432: 90–110.
223. Jia W, Lau GY, Huang W, Zhang C, Tomsia AP, Fu Q. Bioactive glass for large bone repair. *Adv Healthc Mater.* 2015; 4(18): 2842–8.

224. Schepers E, Clercq M DE, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil.* 1991; 18(5): 439–52.
225. Braem A, Mattheys T, Neirinck B, Čeh M, Novak S, Schrooten J, et al. Bioactive glass-ceramic coated titanium implants prepared by electrophoretic deposition. *Mater Sci Eng C.* 2012; 32(8): 2267–73.
226. Van Oirschot BAJA, Alghamdi HS, Närhi TO, Anil S, Al Farraj Aldosari A, Van den Beucken JJJP, et al. In vivo evaluation of bioactive glass-based coatings on dental implants in a dog implantation model. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(1): 21–8.
227. Lin Y, Xiao W, Bal BS, Rahaman MN. Effect of copper-doped silicate 13-93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells in vitro and on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial defects in vivo. *Mater Sci Eng C.* 2016; 67: 440–52.
228. Mooyen S, Charoenphandhu N, Teerapornpuntakit J, Thongbunchoo J, Suntornsaratoon P, Krishnamra N, et al. Physico-chemical and in vitro cellular properties of different calcium phosphate-bioactive glass composite chitosan-collagen (CaP@ChiCol) for bone scaffolds. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2017; 105(7): 1758–66.
229. Westhauser F, Weis C, Prokscha M, Bittrich LA, Li W, Xiao K, et al. Three-dimensional polymer coated 45S5-type bioactive glass scaffolds seeded with human mesenchymal stem cells show bone formation in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* 2016; 27(7): 119.
230. Aho AJ, Tirri T, Kukkonen J, Strandberg N, Rich J, Seppälä J, et al. Injectable bioactive glass/biodegradable polymer composite for bone and cartilage reconstruction: Concept and experimental outcome with thermoplastic composites of poly(ϵ -caprolactone-co-D,L-lactide) and bioactive glass S 53P 4. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15(10): 1165–73.
231. Bakry AS, Marghalani HY, Amin OA, Tagami J. The effect of a bioglass paste on enamel exposed to erosive challenge. *J Dent.* 2014; 42(11): 1458–63.
232. Farooq I, Moheet IA, Alshwaimi E. In vitro dentin tubule occlusion and remineralization competence of various toothpastes. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(9) : 1246–53.
233. Milly H, Festy F, Watson TF, Thompson I, Banerjee A. Enamel white spot lesions can remineralise using bio-active glass and polyacrylic acid-modified bio-active glass powders. *J Dent.* 2014; 42(2): 158–66.
234. Dong Z, Chang J, Zhou Y, Lin K. In vitro remineralization of human dental enamel by bioactive glasses. *J Mater Sci.* 2011; 46(6): 1591–6.
235. de Morais RC, Silveira RE, Chinelatti M, Geraldeli S, de Carvalho Panzeri Pires-De-Souza F. Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. *Clin Oral Investig.* 2018; 22(5): 1923–31.

236. Osorio E, Fagundes T, Navarro MF, Zanotto ED, Peitl O, Osorio R, et al. A novel bioactive agent improves adhesion of resin-modified glass-ionomer to dentin. *J Adhes Sci Technol*. 2015; 29(15): 1543–52.
237. Tauböck TT, Zehnder M, Schweizer T, Stark WJ, Attin T, Mohn D. Functionalizing a dentin bonding resin to become bioactive. *Dent Mater*. 2014; 30(8): 868–75.
238. Chatzistavrou X, Velamakanni S, Direnzo K, Lefkelidou A, Fenno JC, Kasuga T, et al. Designing dental composites with bioactive and bactericidal properties. *Mater Sci Eng C*. 2015; 52: 267–72.
239. Sauro S, Watson TF, Thompson I, Banerjee A. One-bottle self-etching adhesives applied to dentine air-abraded using bioactive glasses containing polyacrylic acid: an in vitro microtensile bond strength and confocal microscopy study. *J Dent*. 2012; 40(11): 896–905.
240. Jang JH, Lee MG, Ferracane JL, Davis H, Bae HE, Choi D, et al. Effect of bioactive glass-containing resin composite on dentin remineralization. *J Dent*. 2018; 75: 58–64.
241. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall. Jr. GW. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res*. 2009; 43(1): 70–7.
242. Bauer J, Carvalho EM, Carvalho CN, Meier MM, Souza JP de, Carvalho RM de, et al. Development of a simplified etch-and-rinse adhesive containing niobophosphate bioactive glass. *Int J Adhes Adhes*. 2016; 69: 110–4.
243. Carneiro KK, Araujo TP, Carvalho EM, Meier MM, Tanaka A, Carvalho CN, et al. Bioactivity and properties of an adhesive system functionalized with an experimental niobium-based glass. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018; 78: 188–95.
244. Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: A microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci*. 2012; 120(4): 353–62.
245. Bauer J, Silva e Silva A, Carvalho EM, Ferreira PVC, Carvalho CN, Manso AP, et al. Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019; 90: 374–80.
246. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF, et al. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *J Dent*. 2011; 39(11): 746–56.
247. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, et al. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater*. 2007; 3(6): 936–43.

248. Martins CHG, Carvalho TC, Souza MGM, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, et al. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate ® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(6): 1439–46.
249. Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *J Dent Res*. 2007; 86(8): 754–7.
250. Waltimo T, Mohn D, Paqué F, Brunner TJ, Stark WJ, Imfeld T, et al. Fine-tuning of bioactive glass for root canal disinfection. *J Dent Res*. 2009; 88(3): 235–8.
251. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2009; 88(2): 558–78.
252. Gonçalves R, Scaffa P, Giacomini M, Vidal C, Honório H, Wang L. Sodium trimetaphosphate as a novel strategy for matrix metalloproteinase inhibition and dentin remineralization. *Caries Res*. 2018; 52(3): 189–98.
253. 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.
254. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M100-S23]. 2013. [Acesso em 13 de outubro de 2018]. Disponível em: https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf.
255. 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.
256. Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KMRP, Delbem ACB. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res*. 2009; 43(4): 302–7.
257. Angmar B, Carlström D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastructure Res*. 1963; 8(1–2): 12–23.
258. 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.
259. Siegel SC, Von Fraunhofer JA. Assessing the cutting efficiency of dental diamond burs. *J Am Dent Assoc*. 1996; 127(6): 763–72.
260. Elias K, Amis AA, Setchell DJ. The magnitude of cutting forces at high speed. *J Prosthet Dent*. 2003; 89(3): 286–91.

261. Paris S, Bitter K, Renz H, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. Validation of two dual fluorescence techniques for confocal microscopic visualization of resin penetration into enamel caries lesions. *Microsc Res Tech*. 2009; 72(7): 489–94.
262. Shimada Y, Yamaguchi S, Tagami J. Micro-shear bond strength of dual-cured resin cement to glass ceramics. *Dent Mater*. 2002; 18(5): 380–8.
263. Al Khateb K, Ozhmukhametova EK, Mussin MN, Seilkhanov SK, Rakhypbekov TK, Lau WM, et al. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharm*. 2016; 502(1–2): 70–9.
264. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res*. 2018; 52(1–2): 153–65.
265. Schwendicke F, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Paris S. Attitudes and behaviour regarding deep dentin caries removal: a survey among german dentists. *Caries Res*. 2013; 47(6): 566–73.
266. Preston K, Smith P, Higham S. 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.

ANEXO



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“AVALIAÇÃO DE ULTRASSOM DESCARIADOR ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA EM LESÕES DE CÁRIE EM DENTINA INDUZIDAS POR MODELO BIOLÓGICO”**, registrada com o nº 27/2018, 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 23/11/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2022
Espécie/linhagem/raça	Gado Nelore
Nº de animais	300 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

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 15 de dezembro de
2023**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 15 de dezembro de 2021

João Felipe Besegato