



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

CAROLINA SANTEZI NETO

“PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
CRUZADA EM ODONTOLOGIA POR
MEIO DE TERAPIA FOTODINÂMICA
(TFD) UTILIZANDO LED AZUL E
CURCUMINA.”

Araraquara
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE DENTÍSTICA RESTAURADORA

CAROLINA SANTEZI NETO

*“Prevenção da contaminação cruzada em
odontologia por meio de terapia
fotodinâmica (TFD) utilizando LED azul e
Curcumina - efeito antibacteriano”*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de concentração Dentística, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior

Araraquara
2012

Santezi Neto, Carolina

Prevenção da contaminação cruzada em odontologia através de terapia fotodinâmica (PDT) utilizando LED azul e curcumina / Carolina Santezi Neto.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

122 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior

1. Fotoquimioterapia 2. Curcumina 3. Contaminação biológica
I. Título

CAROLINA SANTEZI NETO

“Prevenção da contaminação cruzada em odontologia através de terapia fotodinâmica utilizando LED azul e curcumina – efeito antibacteriano.”

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador.....Prof. Dr. Osmir Batista de

Oliveira Junior

2º Examinador.....Profª. Dra. Alessandra Nara de

Souza Rastelli

3º Examinador.....Prof. Dr. Rodrigo de Castro

Albuquerque

Araraquara, 31 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES

CAROLINA SANTEZI NETO

Nascimento - 24/04/1981 São Carlos - SP

Filiação - José Antonio Neto

Angela Maria Santezi Neto

2001-2004 - Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Araçatuba FOA/UNESP.

2010-2012 - Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Dentística, Nível Mestrado,
Faculdade de Odontologia de
Araraquara - FOAr/UNESP.

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste trabalho...

A minha mãe

Angela, exemplo de mulher pelo seu amor, carinho, otimismo, dedicação, determinação, apoio e eterno incentivo. Sem dúvida a minha melhor amiga.

Ao meu pai (in memoriam)

José, exemplo de inteligência, seriedade e por ter me ensinado que na vida tudo se consegue quando se tem perseverança.

Ao meu tio

Álvaro, pelo apoio em todos os momentos da minha vida, e por me ensinar a ter o “carpe diem” como lema. Com certeza o melhor “tiopai” do mundo.

Ao meu irmão

José Antonio, por ajudar a trilhar meu caminho profissional e principalmente por deixar meus dias mais alegres com seu humor irreverente.

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Por ter entrado em minha vida e mostrado que o caminho com Ele é infinitamente mais fácil. Obrigada, Senhor, por me proporcionar saúde, amigos e família por perto e por me carregar em seus braços inúmeras vezes.

*“Bem – aventurados todos os que Nele se refugiam.” (Sl. 2:12)
“Louvar-te-ei, Senhor, de todo o meu coração.” (Sl. 9:1)*

Aos meus primos

Beto e Mariane, os quais estiveram presentes desde sempre, me ajudando a construir a personalidade que tenho hoje. Muito obrigada pelas ótimas lembranças.

A minha tia

Sueli, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis. Você foi muito importante para que este trabalho fosse finalizado. Obrigada do fundo do meu coração.

A todos os meus familiares

Pelo apoio e incentivo. Meus sinceros agradecimentos.

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu Orientador

Prof.Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior

Pela orientação, paciência, amizade, confiança e respeito adquiridos pela nossa convivência. Obrigada por ser mais do que um orientador, um amigo em Araraquara. Um exemplo de profissional e de pessoa. Admiro-te muito!

A minha Co-Orientadora

Profa. Dra. Juliane G. Tanomaru

Pela orientação, paciência, amizade, confiança e respeito. Obrigada pelos conhecimentos comigo compartilhados. Meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos amigos

Da turma de mestrado em Dentística Restauradora Aliny Luizzi, Keli Vitorino e Mateus Tonetto, muito obrigada pela convivência sempre alegre e agradável, pelo companheirismo e pela amizade durante esses anos.

Da turma de doutorado em Dentística Restauradora Alex Arruda, Fernando Florez, Juliana Boaventura, Marília Regalado, Máyra Andressa, Matheus Bandeca, Luis Rafael Calixto Lima e William Kabbach por terem me ensinado muito do que hoje sei. Agradeço especialmente às amigas Janáina Bortolatto e Fernanda Jassé por todo o apoio, paciência e amizade verdadeira. Antes que eu me esqueça, obrigada também por me cederem um teto nos dias em que precisei dormir em Araraquara (Aliny Luizzi, você se inclui nisso!!!!)!!!

Aos demais amigos da Pós-Graduação em Dentística Restauradora: Aline, Marília, Juliana, Cintia e aos novos ingressantes no programa pelo incentivo, amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A todos os amigos de Pós-Graduação.

*Muito obrigada por tornarem meus dias em Araraquara
mais alegres e completos!*

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do grupo de Biofotônica da USP – São Carlos *Carla Fontana, Cristina Kurachi, Fernando Flores, Natalia Inada, Vitor Panhoca, todos do LAB e do LAT do IFSC* (onde tudo começou!!) por terem me recebido tão bem e me ajudado a subir o primeiro degrau em busca do desenvolvimento e da conclusão desse trabalho. Agradeço verdadeiramente por tudo!!!

Quero agradecer em especial ao *Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato* (IFSC/USP- São Carlos) por ter me aceito no grupo de Biofotônica e por todo o apoio e suporte oferecidos para o desenvolvimento desse projeto.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista e à Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, representadas pelo Digníssimo Reitor *Herman Jacobus Cornelis Voorwald* e pela Digníssima Diretora *Andreia Affonso Barretto Montandon* pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, representado pela *Prof^a Dr^a Josimeri Hebling* e pelo *Prof. Dr. Edson Alves de Campos*.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Área de Dentística Restauradora: *Alessandra Rastelli, Andrea Abi Hached Dantas, Edson Alves de Campos, José Roberto Cury Saad, Marcelo Ferrarezzi de Andrade e Sizenando de Toledo Porto Neto* pelo conhecimento e experiência transmitidos, pelo acolhimento e confiança.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas pelos conhecimentos e experiências compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Dentística: *Creuza, Dona Cida, Conceição, Neli, Priscila, Marinho e Vanderlei* por todo apoio, carinho e atenção.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação: Alexandre e Sergio por serem sempre disponíveis e solícitos no esclarecimento das dúvidas e prestação de serviços e em especial à Marapela atenção e paciência.

Aos funcionários da biblioteca Adriano, Maria Inês, Silvia, Eliane, Ceres, Cristina, Marley, Maria Aparecida e Odete pela receptividade, orientação e disponibilidade.

Aos pacientes que cederam sua saliva para realização desta pesquisa.

A CAPES, pelo apoio financeiro por meio da Bolsa de Estudos.

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

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*Ninguém é tão sábio que nada
tenha para aprender, nem
tão tolo que nada tenha pra
ensinar.*

Blaise Pascal

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	21
RESUMO	24
ABSTRACT.....	27
INTRODUAO	30
REVISÃO DE LITERATURA	39
PROPOSICAO	69
MATERIAL E MÉTODO.....	71
RESULTADO.....	88
DISCUSSÃO	93
CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS.....	120

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE ABREVIACÕES

1. EPI..... Equipamento de Proteção Individual
2. TFD..... Terapia fotodinâmica
3. TFDA..... Terapia fotodinâmica antimicrobiana
4. FS..... Fotossensibilizador
5. PS..... Photosensitizer
6. SAL..... Solução salina
7. CHX..... Digluconato de Clorexidina
8. Hp..... Hematoporfirinas
9. HpD..... Derivados de Hematoporfirinas
10. CUR..... Curcumina
11. MB..... Methylene Blue
12. LASER... Amplificação da luz por meio de emissão estimulada de radiação
13. LED..... Diodo emissor de luz
14. UV..... Radiação ultravioleta
15. T..... Tempo
16. J..... Joule
17. cm²..... Centímetro quadrado
18. J/cm²..... Joules por centímetro quadrado
19. nm..... Nanômetro
20. UFC..... Unidade formadora de colônia
21. mm..... Milímetro
22. µm..... Micrômetro
23. mg..... Miligrama
24. m³..... Metro cúbico
25. mL..... Mililitro
26. µg..... Micrograma

27. μM	Micromolar
28. mM.....	Milimolar
29. mW.....	Miliwatts
30. min	Minuto
31. s.....	Segundo
32. BHI.....	Brain Heart Infusion
33. df.....	Grau de liberdade
34. Sig.....	Significância
35. N.....	Número total de espécimes por grupo
36. SD.....	Desvio padrão
37. ED.....	Erro padrão

RESUMO

Santezi Neto C. Prevenção da contaminação cruzada em odontologia através de PDT utilizando LED azul e curcumina – efeito antibacteriano [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

O presente estudo avaliou a suscetibilidade geral de patógenos da flora salivar à terapia fotodinâmica (TFD) após a sensibilização com curcumina e exposição ao LED (Light Emitting Diode) de 450 nm (\pm 10) para evitar contaminação direta e cruzada nos consultórios odontológicos. Para isso, uma amostra de 10 ml de saliva não estimulada foi coletada a partir de um voluntário para a contagem de bactérias após a fase experimental, e os resultados foram analisados. Quatorze diferentes grupos foram avaliados: G1) L- FS (1,5g/l) + por 1 min; G2) L- FS (1,5g/l) + por 5 min; G3) L- FS (3,0g/l) + por 1 min; G4) L- FS (3,0g/l) + por 5 min; G5) L+ FS- por 1 min; G6) L+ FS- por 5 min; G7) L+ FS (1,5g/l) + por 1 min; G8) L+ FS (1,5g/l) + por 5 min; G9) L+ FS (3,0g/l) + por 1 min ; G10) L+ FS(3,0g/l) + por 5 min; G11) Clorexidina 0,12% por 1 min; G12) Clorexidina 0,12% por 5 min; G13) Salina por 1 min; G14) Salina por 5 min. Salina foi o grupo

controle negativo e clorexidina, o controle positivo. Após cada teste efetuado foram realizadas diluições seriadas e as amostras resultantes foram semeadas em placas de ágar sangue para depois serem levadas a estufa em condições de microaerofilia onde houve o crescimento microbiológico. Um pesquisador treinado e calibrado determinou o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por cálculo matemático. A análise estatística (ANOVA e TUKEY HSD) foi realizada para analisar se houve ou não diferença estatística significativa entre os grupos, e de acordo com os resultados, a TFD para redução quantitativa dos patógenos encontrados na cavidade oral é eficaz, no entanto a clorexidina continua sendo considerada o padrão ouro quando se trata de descontaminação oral geral e consequente diminuição do risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas seja de forma direta ou indireta.

Palavras - chaves: Fotoquimioterapia, Curcumina, Contaminação Biológica.

ABSTRACT

Santezi Neto C. Prevention of cross contamination in dentistry by PDT using blue LED and curcumin - antibacterial effect [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

The present study assessed the general susceptibility of pathogens salivary flora to the photodynamic therapy (PDT) after sensitization with curcumin and exposure to the LED (Light Emitting Diode) of 450 nm (± 10) to avoid direct and cross contamination in dental offices. For this, a sample of 10 ml of unstimulated saliva was collected from a volunteer for the bacterial count after the experimental phase and the results were recorded. Fourteen different groups were evaluated: G1) L- PS (1,5g/l) + for 1 min ; G2) L- PS (1,5g/l)+ for 5 min ; G3) L- PS(3,0g/l)+ for 1 min ; G4) L- PS(3,0g/l)+ for 5min ; G5) L+ PS- for 1 min ; G6) L+ PS- for 5 min ; G7) L+ PS (1,5g/l)+ for 1 min ; G8) L+ PS (1,5g/l)+ for 5 min; G9) L+ PS (3,0g/l)+ for 1 min ; G10) L+ PS(3,0g/l)+ for 5 min; G11) Chlorhexidine 0,12% for 1 min; G12) Chlorhexidine 0,12% for 5 min; G13) Saline for 1 min; G14) Saline for 5 min. Saline was the negative control group and chlorhexidine, the

positive control. After each test, serial dilutions were performed and the resulting samples were plated on blood agar plates. Thereafter, the plates were placed in the stove under microaerophilic conditions for microbial growth. A trained and calibrated researcher determined the number of colony forming units (CFU) by mathematical calculation. Statistical analysis (ANOVA and TUKEY HSD) was realized to examine if there was or there was not a statistically significant difference between groups, and according to the results, PDT to quantitative reduction of pathogens found in the oral cavity is effective, however, chlorhexidine still considered the gold standard to oral decontamination and subsequent reduction of the overall risk of transmission of infectious diseases either directly or indirectly.

Key words: Photochemotherapy, Curcumin, Biological Contamination.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A espécie humana hospeda mais de 700 diferentes espécies de microrganismos entre bactérias, vírus e fungos em sua cavidade bucal. Esse fato associado à exposição constante e diária ao aerosol causado pela turbina de alta - rotação, baixa - rotação, jato de bicarbonato de sódio e ultra - som expõem a equipe odontológica (profissional e pessoal auxiliar) a riscos ocupacionais crônicos e intensos. Pelos mesmos motivos e devido à rotina de atendimento, os pacientes, ao freqüentarem o consultório odontológico, também sofrem risco de adquirir uma infecção/patologia por contaminação cruzada ^{1, 7- 8, 16, 24, 38, 39, 48-49, 52, 54-55, 58-60, 68, 78}.

As principais doenças infecto-contagiosas que podem ter como vetor de disseminação o aerosol e que representam riscos significativos à saúde da equipe odontológica são as causadas por vírus como os da catapora, hepatite B, hepatite C, conjuntivite herpética, herpes simples, herpes zoster, mononucleose infecciosa, sarampo, rubéola, parotidite, gripe e AIDS. Além dessas, diversas infecções bacterianas podem ser causadas por estafilococos, estreptococos, pseudomonas, klebsiella bacilos e fungos como no caso da candidíase ^{48-49, 52, 54-55, 60, 68}.

Um número não estimado de portadores sadios é atendido diariamente nos consultórios odontológicos, o que aumenta ainda mais o risco de contaminação pela ausência de sinais ou sintomas que alertem a

equipe odontológica sobre os possíveis riscos a que estão se expondo. Tanto isso é verdade que a unanimidade dos manuais de biossegurança recomenda como padrão para atendimento de qualquer paciente, seja ele portador ou não de doença infecto-contagiosa, a utilização rotineira de EPIs (equipamentos de proteção individual) ^{15, 26, 54-55}. Essa prática é eficaz para a proteção da equipe odontológica desde que as medidas corretas de proteção sejam rigorosamente atendidas.

Além desses aspectos, de acordo com Chinellato et al.¹⁵, Faraco et al.²⁶ e Molinari⁵⁴ é importante destacar que muitas vezes a utilização rotineira dos EPIs promove uma falsa segurança à equipe odontológica uma vez que:

- ✓ Os EPIs protegem a equipe, mas não eliminam ou reduzem o risco;
- ✓ A contaminação das vias aéreas oriunda do aerosol bucal é a mais crítica e direta, e os EPIs contra esse tipo de contaminação apresentam eficácia temporária e não contínua;
- ✓ O uso de EPIs e a correta esterilização/desinfecção de instrumentais e equipamentos não protege os pacientes da exposição e da possível contaminação oriunda do aerosol de sangue e/ou saliva contaminados que permanece em suspensão entre as sessões clínicas.

Em 1994, Bentley et al.⁸ relataram que o aerosol liberado pelas canetas de alta - rotação se dissemina por um raio de até 60 cm a partir

da cavidade bucal, expondo à contaminação por microrganismos orais tudo o que estiver nesse perímetro. Adicionalmente, Bentley et al.⁸ relata que o aerosol bucal decorrente da refrigeração utilizada nas canetas de alta - rotação e, principalmente do uso do jato abrasivo ar/água/bicarbonato de sódio que é comumente utilizado como rotina profilática em muitos consultórios permanece em suspensão no ambiente por pelo menos 10 minutos até algumas horas após o tratamento.

Assim, medidas que possam efetivamente reduzir a quantidade de microrganismos presentes no aerosol bucal deveriam ser incorporadas como rotina de biossegurança associadas ao uso de EPIs, a fim de garantir proteção mais efetiva à equipe odontológica e aos pacientes.

Com esse intuito, rotineiramente alguns profissionais solicitam que o paciente realize bochechos com antimicrobianos previamente ao atendimento clínico, sendo que atualmente uma das substâncias mais utilizadas para essa desinfecção prévia é o digluconato de clorexidina 0,12%, considerada o padrão ouro devido a sua elevada efetividade^{20, 35, 45, 51, 63, 65}.

De acordo com Davies²⁰ em 1954, a Clorexidina é um antimicrobiano de largo espectro contra bactérias Gram - positivas e negativas, no entanto, Siqueira⁶⁵, em 1998, destaca que essa substância não apresenta efetividade contra esporos, exceto em temperaturas elevadas. Além disso, o uso da CHX como anti-séptico pode causar pigmentação em língua, dentes e restaurações em resina composta. Adicionalmente, o uso constante do agente antimicrobiano pode

desencadear alterações no paladar^{20, 35, 45, 51, 63, 65}. Outro fator importante e que deve ser levado em consideração quando se trata de contaminação cruzada é a não existência de relato na literatura sobre sua atividade antiviral positiva.

Uma forma promissora para reduzir a quantidade de microrganismos presentes na cavidade oral e conseqüentemente minimizar o risco de infecção cruzada é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA). Trata-se de um tratamento minimamente invasivo e muito eficaz contra doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. Consiste da associação de um agente fotossensibilizador com uma luz visível. Tal droga fotossensível é administrada de forma tópica e deve possuir o espectro de absorção compatível com o comprimento de onda utilizado para a irradiação da região eleita. O mecanismo de ação da TFDA consiste na ativação de um fotossensibilizador por uma fonte de luz com comprimentos de onda equivalentes ao espectro de absorção do agente fotossensível na intenção de provocar necrose celular e morte microbiana⁷⁶. Por isso, para que tal reação ocorra, três elementos são de fundamental importância: o fármaco fotossensível, a fonte de luz e o oxigênio molecular.

Muitos são os fármacos fotossensíveis utilizados para a TFD. Dentre eles podemos citar o azul de metileno, as porfirinas, as fitalocianinas, o ácido aminolevulínico, as clorinas e muitos outros. De acordo com a literatura esses agentes fotossensibilizadores são divididos em três famílias. Os fotossensibilizadores de primeira geração são

aqueles representados pelas hematoporfirinas (Hp) e seus derivados (HpD) e possuem algumas desvantagens como, por exemplo, o fato de serem pouco penetrantes nos tecidos alvo, e ainda por permanecerem retidos no organismo por um grande período, fazendo com que o paciente tenha que ficar protegido da iluminação por até três meses^{11, 28}.

Devido a esses efeitos indesejáveis, surgiram os fármacos de segunda geração, os quais se caracterizam por terem um poder de penetração maior e por serem moléculas puras, o que permitia ensaios controlados de dose- resposta. As principais drogas dessa família são as ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas e as purpurinas⁷³.

Ainda na procura por drogas fotossensíveis com ação maior surgiram as de terceira geração, que além de possuírem as mesmas características das de segunda, tinham a vantagem de se fixarem seletivamente sobre o tecido alvo⁷³.

Atualmente se tem discutido a respeito de corantes fitoterápicos para o tratamento com TFD, uma vez que tais fármacos naturais são degradados e eliminados pelo organismo mais rapidamente, evitando maior pigmentação de mucosa, restaurações e dentes. Pertencentes a este grupo de corantes que apresentam acentuadas características fotoquímicas, pode-se citar a hipericina e a curcumina, a qual vem sendo estudada para que se possa determinar o seu potencial de ação como agente fotossensibilizador viável para a TFD^{31, 61}.

A curcumina é um pigmento amarelo ouro extraído do rizoma do açafrão da Índia (*Curcuma Longa*). Esse corante de origem natural há

muito tempo é utilizado nas culturas orientais como condimento e corante de alimentos⁴². Adicionalmente, também na cultura oriental, é amplamente utilizado como medicamento alternativo para diversas enfermidades, como desordens hepáticas, feridas, doenças de pele dentre outros^{4,10, 14, 23, 30, 40-44, 70}.

No que se diz respeito à Odontologia, essa droga fitoterápica natural tem grande potencial para ser utilizada como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica devido a sua ação antiinflamatória, anti-séptica, antiparasitária tanto in vitro quanto in vivo, possuir efeito antioxidante^{3-4, 18, 22, 25, 30, 41, 43, 53, 57, 70} e, principalmente, por ter ação antiviral contra H1N1 e hepatite B comprovada pelos estudos de Chen et al.¹³ em 2010 e Jin Kim et al.⁴⁴ em 2009, respectivamente.

Conforme já reportado, o sucesso da TFD depende da associação de alguns fatores. Dentro do fator “luz”, o comprimento de onda, a dose de energia utilizada e o sistema de entrega dessa luz influenciarão diretamente no sucesso ou não da terapia.

Desde o surgimento da TFD até os dias de hoje, diferentes tipos de fontes de luz foram testadas e utilizadas para se obter o efeito fotodinâmico. Mais recentemente, na década de 1960, os primeiros sistemas baseados na tecnologia de amplificação da luz por meio de emissão estimulada de radiações (LASER), foram testados e descobriu-se que estes sistemas apresentavam características muito interessantes para a utilização na TFD, como por exemplo, o comprimento de onda

coerente e monocromático, a focalização da área de iluminação, e a entrega de grandes quantidades de energia³².

Os sistemas de LASERs foram sendo aprimorados e apesar do alto custo de manutenção eram considerados como as fontes de primeira eleição, principalmente pela possibilidade de acoplar a eles fibras ópticas que permitiam a irradiação de regiões de difícil acesso, além de também haver a possibilidade de se utilizar os mais diversos fármacos fotossensibilizadores, uma vez que já se tinha os sistemas lasers com emissão de luz nas mais variadas bandas, desde o UV (ultravioleta) até o infravermelho³¹.

Apesar do grande sucesso da utilização desses sistemas LASERs, o alto custo de manutenção e a dificuldade de transporte dos mesmos fizeram com que os pesquisadores investigassem e desenvolvessem outros tipos de fontes de luz, como por exemplo, as lâmpadas e atualmente, os equipamentos baseados na tecnologia dos diodos emissores de luz (LED)^{12, 28}.

Os LEDs são lâmpadas com sistemas de filtros imbutidos que selecionam a emissão da luz em uma faixa estreita de apenas 10 nm. Esses filtros barram totalmente a emissão de radiações UV de alta potência e de infravermelho, devido ao primeiro ser maléfico ao ser humano e o segundo promover danos térmicos sobre os tecidos irradiados, além do que o último também pode prejudicar as lentes utilizadas para a confecção desses sistemas³¹.

Os LEDs vêm sendo amplamente utilizados pelo fato de apresentarem algumas características vantajosas quando se compara com os sistemas de laser tradicionais, como por exemplo, baixo custo de produção e de manutenção, a portabilidade e o tamanho desses equipamentos, além de possibilitar a irradiação de grandes áreas, terem baixo consumo energético e não produzir emissão de calor ³¹. Adicionalmente, os LEDs possuem tempo de meia vida muito maior (50.000 horas de uso) do que os sistemas de laser, podem ter formas variadas, o que permite a irradiação de grandes áreas, e ainda podem ser produzidos em diversos comprimentos de onda, variando desde o UV (254nm) até o infravermelho (1100nm) ⁶⁹.

Além dos fatores já relatados, o oxigênio molecular presente nos tecidos e no interior das células também são de fundamental importância para que a TFDA seja eficaz ^{2, 9, 21, 67, 69, 72-74, 77}.

Portanto, na intenção de minimizar a quantidade de patógenos existentes na saliva humana e assim diminuir a probabilidade de ocorrência de contaminação do profissional, equipe auxiliar e pacientes, estudamos a possibilidade de utilização da TFD para descontaminação prévia da cavidade bucal, uma modalidade promissora para a inativação de microrganismos, como alternativa a clorexidina.

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aerosol e Biossegurança*

Em 1982, Nogueira⁵⁵ relatou um caso clínico em que um cirurgião-dentista sofreu um pequeno acidente de trabalho com ferimento insignificante cortante na segunda falange do indicador direito. Segundo o autor, o profissional lavou a área lesionada, fez uma simples assepsia e continuou trabalhando. O ferimento cicatrizou em menos de uma semana por primeira intenção, porém um mês depois o cirurgião-dentista notou a existência de um exantema cutâneo, simétrico, sem causar prurido que tomava toda a região onde havia sido o corte e inclusive a palma da mão. Sem hesitar, o profissional procurou um médico e lá, após exames, foi diagnosticado com infecção luética cutânea. Imediatamente após o diagnóstico, foi instalado o tratamento com penicilina, nas doses usuais para sífilis, resultando em sua cura completa. O autor concluiu que o uso de luvas deveria ser um procedimento obrigatório entre os profissionais da área, porém, de acordo com o autor, o uso desse equipamento de proteção individual impossibilita os profissionais de realizar os procedimentos odontológicos com maior destreza.

No ano de 1993, Chinellato et al.¹⁵ desenvolveram uma pesquisa onde avaliaram os meios de biossegurança para o cirurgião-dentista e auxiliares contra doenças infecto-contagiosas no consultório odontológico.

Tal estudo visou alertar os profissionais da área para os perigos de transmissão das doenças infecto-contagiosas no consultório odontológico em prol do controle de infecção cruzada. Os autores avaliaram máscaras faciais (máscaras retangulares e ovais), óculos e luvas existentes no mercado. As luvas foram avaliadas com relação à incidência de micro-perfurações, e os outros EPIs, em relação à eficiência, visibilidade e comodidade. Todos os equipamentos testados foram aprovados e indicados por serem eficientes.

Bentley et al.⁸, em 1994, avaliaram o aerosol liberado e gerado pela turbina de alta-rotação. A pesquisa foi realizada em duas etapas, sendo que na primeira, uma substância corante fluorescente foi inserida na água que abastece a caneta de alta-rotação para verificar a distância percorrida pelo aerosol. A segunda parte da pesquisa caracterizou-se pela colocação de placas de *Petri* contendo meio de cultura ágar sangue nas regiões onde o aerosol chegava. Os autores concluíram que os respingos e a disseminação do aerosol conferem grande risco da equipe odontológica se contaminar com patógenos provenientes desse spray.

Ainda no ano de 1994, Lacey et al.⁴⁶ realizaram um estudo onde avaliaram as doenças ocupacionais oriundas de bioaerossóis. Conforme os autores relatam, bioaerossóis são formados por partículas biológicas suspensas no ar ambiente, os quais têm sido apontados como causadores de doenças pulmonares ocupacionais. Pertencentes a esse aerosol é possível encontrar vírus, bactérias, actinomicetos, musgos, fungos, ácaros, enzimas, proteínas de origem animal, endotoxinas de

bactérias Gram-negativas dentre muitas outras partículas. Ainda, de acordo com os pesquisadores, os produtos existentes nesse bioaerosol dependem diretamente da profissão do indivíduo. Além disso, essas partículas podem provocar infecções pulmonares de origem viral, bacteriana ou fúngica, porém os sintomas mais comumente encontrados são irritação das mucosas orofaríngeas, bronquite, rinite alérgica, asma, alveolite alérgica, doença pulmonar obstrutiva crônica ou ainda síndrome da poeira orgânica. Os autores concluem que a prevenção, o controle do risco de exposição ao aerosol e a consciência desse risco são primordiais para se evitar o desenvolvimento de qualquer doença oriunda das partículas presentes nesse aerosol.

Em 1995, Grenier³⁸ estudou a quantidade de aerosol formado durante procedimentos odontológicos em dois ambientes distintos. O primeiro ambiente foi um consultório contendo somente um equipo e o segundo, uma sala com múltiplos equipos. Para a captação desse aerosol formado, os autores utilizaram um equipamento suctor de ar e logo em seguida fizeram o plaqueamento em placas de *Petri* contendo Agar sangue enriquecido com material próprio para desenvolvimento de cepas anaeróbias para posterior incubação e contagem das unidades formadoras de colônia. De acordo com os pesquisadores, os aerossóis bacterianos se espalharam em áreas onde não havia nenhuma atividade odontológica. Adicionalmente, os tratamentos dentários aumentaram significativamente os níveis de contaminação do ar com microrganismos patogênicos nos dois ambientes avaliados.

No ano de 1998, Barbeau et al.⁵ publicaram um artigo em que pesquisaram o potencial do sugador odontológico de saliva para desencadear infecção cruzada. Segundo eles, é comum a inversão do fluxo da saliva quando o profissional da área está sugando a saliva na cavidade oral do paciente e também quando o próprio paciente oclui a abertura do bocal pela mucosa oral. De acordo com os pesquisadores, inúmeras espécies de bactérias retornam para a cavidade oral do paciente, levando a contaminação desse paciente. Estes dados sugerem, ainda que sem prova direta de contaminação cruzada, a possível existência de um risco infeccioso associado a patógenos que podem se originar de biofilmes da tubulação seguindo o refluxo. Mesmo que o risco de contaminação cruzada entre os pacientes seja considerado baixo, a necessidade de diminuir a quantidade de biofilmes formados é importante.

Bennett et al.⁷, em 2000, realizaram uma pesquisa onde analisaram o aerosol microbiano formado durante a prática odontológica com o objetivo de quantificar o risco microbiológico a qual o cirurgião – dentista, sua equipe auxiliar e seus pacientes estão expostos. Nesse estudo, os autores utilizaram um aspirador de ar para coletar amostras do aerosol liberado durante os procedimentos odontológicos e de acordo com o pesquisado, o dentista e seu auxiliar ficam expostos a um pico de aerosol concentrado pelo tempo de 15 minutos e apresentam um risco ligeiramente maior de adquirirem o bacilo da tuberculose do que a população em geral.

Em 2001, Leggat et al.⁴⁸ realizaram uma revisão de literatura sobre os aerossóis encontrados nos consultórios odontológicos. De acordo com os autores, existe grande quantidade de fontes geradoras de aerossóis bacterianos no interior da clínica dentária, e a concentração de partículas patogênicas em suspensão no ambiente parece ser maior durante procedimentos como profilaxia com jato de bicarbonato de sódio e uso de caneta de alta - rotação. Adicionalmente, conforme a revisão levantada pelos pesquisadores, várias doenças infecto - contagiosas podem ser transmitidas para a equipe odontológica e para os pacientes, por isso, sistemas de ventilação devem permanecer constantemente em funcionamento para que haja reciclagem do ar ambiente. Os pesquisadores também reportam que o uso de antimicrobianos previamente ao atendimento clínico deve ser rotina para diminuir a quantidade de microrganismos contidos nesse aerossol, além de se utilizar bombas à vácuo para diminuir o aerossol presente no ambiente. Os autores concluem que a equipe odontológica, além de cuidar para que o aerossol liberado possua a menor quantidade de patógenos possível, deve manter as imunizações em ordem e ainda continuar a utilizar os EPIs, de forma a reduzir o contato direto com o aerossol.

No ano de 2003, Prospero et al.⁵⁸ publicaram um estudo onde avaliaram a contaminação por microrganismos encontrados no aerossol proveniente da cavidade oral de pacientes durante o tratamento odontológico em superfícies do consultório e na face do cirurgião - dentista. O objetivo desta pesquisa foi salientar a necessidade de adotar

procedimentos de controle de infecção em odontologia e para isso os autores fixaram sobre as superfícies do equipo e sobre a máscara do profissional um filtro para medir a contaminação microbiana tanto quantitativa como qualitativa. Após isso, os pesquisadores removeram os filtros e levaram em placas de *Petri* com meios de cultura específicos para várias espécies de bactéria, onde foram incubadas em estufa para posterior contagem das unidades formadoras de colônia. De acordo com os autores, o filtro que conteve maior crescimento bacteriano foi aquele que estava localizado na máscara do profissional, indicando que grande quantidade de aerosol, contendo milhares de patógenos, atingiu o cirurgião - dentista. Adicionalmente, as espécies bacterianas que prevaleceram nas máscaras foram *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Os autores concluíram que a necessidade de diminuição de microrganismos existentes no aerosol oriundo de tratamento odontológico é fundamental para o bem estar da equipe odontológica e dos pacientes.

Em 2004, Al Maghlouth et al.¹ pesquisaram quantitativamente e qualitativamente o aerosol formado antes, durante e após o atendimento clínico em diferentes áreas. Avaliaram o aerosol liberado em uma sala com múltiplos equipos, em um consultório com um único equipo, na sala de esterilização e por último, no laboratório de prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade King Saud. Para esse estudo, os pesquisadores colocaram placas de *Petri* com meio de cultura Agar sangue em quatro locais estratégicos das salas e coletaram amostras três vezes ao dia por um período de duas semanas. De acordo com o estudo,

a concentração de bactéria presente no aerosol após os procedimentos clínicos foi cinco vezes maior no ambiente onde havia vários equipos, três vezes e meio maior no laboratório de prótese, e duas vezes maior na sala de esterilização e no consultório onde havia somente um equipo de trabalho. Adicionalmente, os autores observaram que no final do expediente o aerosol diminuiu de 50 a 70% em todas as áreas e o tipo de bactéria que prevaleceu nas placas de *Petri* foi o *Staphylococcus epidermidis*. Os pesquisadores concluíram que o aerosol foi maior durante e após os procedimentos clínicos, o que implicou em maior possibilidade de transmissão de agentes infecto-contagiosos, sendo necessária a tomada de medidas preventivas para diminuir a quantidade desse aerosol liberado durante os procedimentos clínicos, bem como reduzir a variedade de patógenos encontrados nesse aerosol.

Em 2005, Szymanska⁶⁸ realizou uma pesquisa onde avaliou o nível de exposição à endotoxinas bacterianas durante tratamento odontológico conservador após utilização de turbina de alta-rotação e formação de aerosol. Para isso, o pesquisador coletou o ar da região localizada entre o paciente e o cirurgião-dentista em filtros de cloreto de polivinil. Tal coleta foi realizada em dois momentos (antes de desinfetar a unidade de água do equipo e após o uso de um desinfetante) e, de acordo com o autor, a quantidade de endotoxinas bacterianas encontrada nesse aerosol coletado antes de desinfetar a unidade de água do equipo foi muito maior do que após a desinfecção. Adicionalmente, o autor concluiu que o uso de

um agente antimicrobiano na água do equipo é um dos métodos recomendados para reduzir o risco que o aerosol promove à saúde.

Em 2006, Rautemaa et al.⁵⁹ desenvolveram uma pesquisa para avaliar o potencial infecto-contagioso do aerosol formado durante procedimentos odontológicos e qual a distância que esse aerosol pode atingir. Para isso, placas de *Petri* contendo meio de cultura Agar sangue foram dispostas na sala de atendimento em seis diferentes locais, em um raio de 0,5 e 2,0 metros de distância a partir da boca do paciente. As placas foram colocadas em salas onde houve o uso da caneta de alta-rotação e em salas onde somente se realizou tratamento periodontal e ortodôntico sem utilização de qualquer instrumento rotatório e de ultrassom. Em adição, amostras foram tiradas das máscaras da equipe odontológica e das superfícies do consultório. Conforme os autores relataram, as salas onde se utilizou instrumentos de alta – rotação mostraram contaminação significativa em todas as distâncias avaliadas, englobando quase toda a sala. Além disso, os pesquisadores relataram que as espécies que prevaleceram foram cocos Gram-positivos, estreptococos e estafilococos, e por isso há a necessidade de se desenvolver novos meios para a prevenção de aerossóis microbianos em odontologia para minimizar os riscos de contaminação cruzada.

De acordo com uma revisão de literatura realizada por Zenkner⁷⁸ em 2006, a Odontologia é caracterizada por permitir o contato direto do profissional e equipe auxiliar com agentes biológicos durante o atendimento do paciente, como sangue, saliva e outros fluídos. Estes

dados levam a indicação de um efetivo controle da infecção, através da adoção de protocolos que são descritos por diversos órgãos de saúde como o Ministério da Saúde, Center for Diseases Control (CDC), American Dental Association (ADA) entre outros. Dentre as doenças passíveis de transmissão, a hepatite B é considerada a de maior prevalência, a AIDS, a doença que mais assusta e a hepatite C é a enfermidade que é considerada um problema de saúde pública. Ainda conforme relatado por Zenkner, o dentista e sua equipe auxiliar tem um risco de 3 a 6 vezes maior de contrair hepatite B em comparação com a população em geral, e por isso, a partir da década de 80, maior importância passou a ser dada no sentido de reduzir o risco de transmissão de doenças passíveis de contágio durante o tratamento odontológico. O autor concluiu em sua revisão que o risco de transmissão viral no consultório é uma realidade muito próxima dos cirurgiões – dentistas, sendo extremamente importante que os odontólogos e sua equipe auxiliar tenham conhecimento dos riscos biológicos a que estão expostos e que também é vital a necessidade de adotar condutas de proteção como, por exemplo, tratar todos os pacientes como se fossem um só, e que este um fosse portador de toda e qualquer doença infecto-contagiosa.

Cristina et al.¹⁶, em 2008, estudaram a concentração de hemoglobina proveniente de gotículas de aerosol e respingos inaladas pelo cirurgião – dentista e equipe auxiliar, e verificaram que a concentração média de hemoglobina no ar aspirado foi $0,14 \pm 0,23$

mg/m³, o que corresponde a um volume de sangue de $8,7 \times 10^{-4}$ ml/m³. Adicionalmente a isso, os pesquisadores verificaram que em 80% das superfícies analisadas houve 100% de presença de hemoglobina. Os autores concluíram, de acordo com os resultados obtidos, que a possibilidade de aquisição de doenças infecto - contagiosas oriundas desse aerosol inalado por parte da equipe odontológica é bastante alta. Somado a isso, a probabilidade de contaminação cruzada também é muito relevante, sendo necessário que medidas para minimizar a quantidade de microrganismos presentes nesse aerosol sejam tomadas.

Belíssimo-Rodrigues et al.⁶, em 2009, avaliaram a prática de controle de infecção entre dentistas particulares e daqueles que trabalhavam na rede pública de saúde. 135 dentistas foram entrevistados com relação aos cuidados tomados na finalidade de controlar a transmissão e a aquisição de doenças infecto - contagiosas. De acordo com a pesquisa, há uma gritante diferença entre o controle de infecção e as práticas observadas entre as duas populações analisadas, sendo que a situação é pior nos serviços públicos. Além disso, os autores dizem que para reverter essa situação, as questões de controle de infecção devem ser abertamente debatidas por todos aqueles que, direta ou indiretamente, fazem parte da área da saúde, de maneira a evitar a contaminação direta dos cirurgiões – dentistas e equipe auxiliar pelo aerosol liberado durante o atendimento clínico e ainda para evitar também a contaminação cruzada.

Resende et al.⁶⁰, no ano de 2009, realizaram um estudo epidemiológico com 1302 dentistas da cidade de Belo Horizonte, Brasil, para avaliar a prevalência de dentistas portadores de hepatite C, já que, de acordo com o autor, o cuidado com a saúde contra infecções é uma preocupação por parte dos pacientes e profissionais da área da saúde, os quais sofrem grande risco de se infectarem com muitos patógenos provenientes do sangue contaminado como vírus da AIDS, hepatite B e C. De acordo com os resultados, a soroprevalência do anti-HCV foi de 0,9%, e os fatores associados a ela foram principalmente história de transfusão de sangue, indicando que a soroprevalência entre os dentistas é baixa. Adicionalmente, os autores observaram que nenhuma soroprevalência esteve associada a exposição ocupacional.

Hallier et al.³⁹, no ano de 2010, realizaram um estudo piloto onde avaliaram a formação de aerossol em diferentes tipos de tratamento odontológico. Somado a isso, os autores pesquisaram a eficácia de um equipamento purificador de ar para verificar se a quantidade de microrganismos presente nesse aerossol reduziria. Amostras foram coletadas em placas de ágar sangue antes e depois da realização do tratamento odontológico com ou sem o uso do equipamento purificador de ar. De acordo com o estudo, após colocação das placas em estufa a 37°C por 48h para crescimento microbiológico, realizou-se a contagem de UFC por ml e verificou-se que o uso desse equipamento reduziu significativamente a quantidade de microrganismos presentes no aerossol. Além disso, os pesquisadores verificaram que os microrganismos

predominantes foram espécies de *Staphylococcus* e *Micrococcus*, concluindo que os bioaerossóis são potencialmente perigosos contaminantes para toda a equipe odontológica e para os pacientes que estão respirando naquele ambiente.

Em 2012, Edward et al.²⁴ publicaram uma revisão de literatura onde avaliaram a exposição ao bioaerosol em locais de trabalho. Conforme relataram os autores, estudos epidemiológicos e toxicológicos têm demonstrado efeitos inflamatórios, problemas respiratórios, e patogênicos após a exposição à bioaerossóis. Adicionalmente, os pesquisadores reportaram que fungos e bactérias são os principais causadores das desordens acima mencionadas. Além disso, os autores também mencionam novas tecnologias para medição quantitativa do bioaerosol inalado nos locais de trabalho, como o uso da biologia molecular por exemplo. Segundo os pesquisadores, espera-se que esses avanços auxiliem na avaliação do risco e na diminuição de exposição ao bioaerosol.

2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A TFD vem sendo estudada há muito tempo, porém é recente sua utilização como agente antimicrobiano.

Em 1987, Tonnesen et al.⁷⁰ realizaram um estudo para investigar a atividade fotobiológica da curcumina. De acordo com a pesquisa, os autores concluíram que o fármaco natural se mostrou fototóxico para *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, mesmo em concentrações baixas quando associada à irradiação com luz visível. Adicionalmente, os pesquisadores concluíram que a fototoxicidade observada torna a curcumina uma droga com grande potencial fotossensibilizante que pode encontrar aplicação na fototerapia de, por exemplo, psoríase, cancro, e doenças bacterianas e virais.

De acordo com Dahl et al.¹⁹, em 1989, a curcumina tem um grande efeito fotodinâmico contra bactérias Gram - positivas, porém tem um menor efeito contra bactérias Gram - negativas. Ainda de acordo com o estudo, a curcumina por si só, para ter efeito bactericida, precisa estar em elevadas concentrações, no entanto, quando associada à luz com comprimento de onda ideal, micro - concentrações provocam elevada ação fototóxica.

Wainwright⁷¹, em 1998, realizou uma revisão de literatura sobre TFDA. O autor relata que a TFDA, apesar de ter surgido previamente à TFD para tratamento de câncer, atualmente, vem sendo utilizada para inativação viral. De acordo com o pesquisador, a técnica tem demonstrado eficácia, in vitro, sobre bactérias, incluindo as cepas

resistentes a antimicrobianos, leveduras, vírus e parasitas. O autor finaliza concluindo que a TFD é uma proposta nova, com grande potencial antimicrobiano, além de ser uma terapia de baixo custo e possibilitar o tratamento local de infecções.

Em 2002, Zanin et al.⁷⁷ realizaram uma pesquisa para verificar a eficácia da TFD na redução de bactérias causadoras da doença cárie. Nesse estudo in vitro, soluções planctônicas de bactérias foram submetidas à TFD utilizando laser diodo (660 nm), com densidade de energia de 28,8 J/cm², associado ao corante azul de toluidina na concentração de 100 µg/ml. De acordo com os pesquisadores, as suspensões bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* tiveram seu crescimento inibido por completo, sugerindo que a TFD é bastante efetiva para redução de bactérias cariogênicas.

Em 2003, Chan et al.¹² desenvolveram um estudo para tentar esclarecer os efeitos bactericidas da TFD, bem como se seus efeitos eram desencadeados pelo comprimento de onda utilizado ou pela dose de energia empregada. Para isso, os pesquisadores utilizaram cepas de bactérias periodontopatogênicas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, e *Streptococcus sanguis*) as quais passaram pelos seguintes tratamentos: laser de He-Ne (632,8 nm) com potência de 30 mW, laser de diodo (665nm) com potência de 100 mW, laser de diodo (830nm) também com potência de 100 mW na presença ou ausência de azul de

metileno (MB) como agente fotossensibilizante. Após a realização dos testes, as amostras foram diluídas, plaqueadas, postas para crescimento microbiológico em estufas de anaerobiose por 48 horas e depois foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia. De acordo com os autores, o melhor resultado foi o grupo onde se utilizou a combinação do MB com o laser de diodo (665nm) pelo tempo de 60s (dose de energia de 21,2J/cm²), pois eliminou 95% das bactérias estudadas, mostrando que tanto o comprimento de onda quanto a dose de energia empregada são fatores que influenciam no resultado positivo ou negativo da ação da TFD. Adicionalmente, os pesquisadores concluíram que o uso de um laser de diodo com potência e comprimento de onda adequados pelo tempo de 60 s de irradiação pode ser um adjuvante útil à terapia convencional na prevenção da re-colonização de lesões subgingivais por microrganismos patogênicos.

No ano de 2004, Yamada Junior et al.⁷⁵ publicaram um caso clínico onde avaliaram a eficácia da TFD na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. Os autores relatam que um dos pacientes compareceu para atendimento apresentando quadro de periimplantite supurativa. O segundo paciente apresentava supuração no elemento 11 proveniente de uma lesão endo-pério. O tratamento para ambos os casos foi raspagem a campo aberto seguida de descontaminação com TFD mediada por azul de metileno associado a irradiação por laser vermelho com potência de 30mW/cm². Conforme relatam os autores, a TFD foi eficaz na redução da microflora bacteriana local. Além disso, segundo os pesquisadores, a TFD

é uma técnica de baixo custo, com mínimos efeitos colaterais, sem efeitos sistêmicos e que não provoca resistência bacteriana.

Também no ano de 2004, Wilson⁷² realizou uma revisão sobre a eficiência da TFD sobre bactérias orais e sua aplicação como tratamento de infecções orais como periodontite, cárie, infecções no canal radicular. Conforme descreve o autor, agentes antibacterianos químicos são cada vez mais utilizados em regimes profiláticos e terapêuticos contra doenças relacionadas a placa dental. Esses antimicrobianos podem se tornar ineficazes pelo desenvolvimento de espécies resistentes, existindo a necessidade de se desenvolver alternativas efetivas, e uma alternativa promissora é a TFD, a qual se mostrou letal contra uma variedade de bactérias. De acordo com o pesquisador, as vantagens desta abordagem são que a bactéria pode ser erradicada em períodos muito curtos de tempo (em segundos ou minutos), o desenvolvimento de espécies resistentes é improvável, e danos aos tecidos do hospedeiro e perturbação da microflora normal pode ser evitada. O autor conclui que o uso dessa terapia seria benéfico principalmente para conservar o suprimento cada vez menor de agentes antimicrobianos que são eficazes no tratamento de graves infecções sistêmicas.

Lambrechts et al.⁴⁷, em 2005, avaliaram a eficácia da TFD sobre feridas, em ratos, infectadas por *Staphylococcus aureus*. Para isso, os pesquisadores, após infectarem as feridas dos ratos com o patógeno, realizaram a TFD mediada por porfirina e luz vermelha. Após isso, uma câmera especial capaz de detectar bioluminescência bacteriana foi

utilizada para captar imagens periódicas da ferida. De acordo com os autores, 98% das bactérias foram eliminadas após uma dose de 210 J/cm². Além disso, os autores relataram que houve uma re-infestação bacteriana, além de atraso no processo de reparo da ferida. Os pesquisadores concluíram que para o uso da TFD in vivo ainda há a necessidade de mais pesquisas de forma que a taxa de re-infecção diminua e que não altere o processo cicatricial.

Também em 2005, Sigush et al.⁶⁴ executaram um estudo onde investigaram a efetividade da TFD na redução de 2 espécies de bactérias periodontopatogênicas (*Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*) em dentes de cão. Para a realização da pesquisa, os autores utilizaram dois tipos de fotossensibilizadores (clorina e6 e BLC1010) e laser de diodo (662 nm) com densidade de energia no valor de 12,7 J/cm² por sítio irradiado. Os autores relatam que a TFD promoveu uma redução significativa da inflamação gengival dos cães quando comparado com os grupos controle, e que tal redução foi independente do tipo de fármaco fotossensível utilizado. Adicionalmente, os pesquisadores concluem que a TFD é distintamente vantajosa na redução dos sinais periodontais de vermelhidão e sangramento à sondagem.

Em 2006, Soukos et al.⁶⁶ desenvolveram uma pesquisa para investigar os efeitos da TFD sobre patógenos endodônticos em fase planctônica, bem como sobre *Enterococcus faecalis*. Para o estudo os autores utilizaram azul de metileno associado a uma fonte de luz vermelha (laser diodo) pelo tempo de 5 minutos. De acordo com o

relatado, a TFD eliminou 97% do biofilme formado pela *Enterococcus faecalis*, e por isso, conforme os pesquisadores, a TFD pode ser utilizada como tratamento coadjuvante ao tratamento endodôntico tradicional na finalidade de dizimar as bactérias residuais nos canais radiculares.

No ano de 2007, Foschi et al.³³ publicaram um estudo onde avaliaram a inativação fotodinâmica de *Enterococcus faecalis* presentes em canais unirradiculares de dentes extraídos. Após preparo dos canais, estes foram infectados com a bactéria e três dias depois a infecção foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Após isso os autores realizaram a TFD utilizando laser diodo (665nm) associado ao fármaco fotossensibilizador azul de metileno. Depois, o conteúdo do canal foi levado a placas de Petri contendo meio de cultura para crescimento microbiano para posterior contagem das unidades formadoras de colônia. De acordo com os pesquisadores, a TFD reduziu 77,5% das bactérias, enquanto que o uso somente da luz diminuiu 40,5% e o fármaco por si só diminuiu somente 19,5% das bactérias, o que reforça a necessidade de se determinar a concentração ótima da droga fotossensibilizadora e também dos parâmetros de luz para proporcionar maior morte bacteriana.

Em 2008, Fimple et al.²⁹ realizaram um estudo in vitro onde avaliaram o potencial fotodinâmico do azul de metileno em biofilmes compostos por múltiplas espécies de bactérias (*Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Prevotella intermedia*) no interior de canais radiculares de dentes humanos extraídos. Para isso, o fotossensibilizador foi incubado no interior do canal

radicular por um período de 10 minutos seguido de exposição ao laser vermelho com fluência de 30 J/cm². Tal metodologia promoveu uma redução de 80% de bactérias quando da contagem das UFC.

Também no ano de 2008, Christodoulides et al.¹⁷ realizaram um estudo clínico randomizado onde foi avaliada a eficácia da TFD como um tratamento adjunto ao tratamento periodontal não cirúrgico. 24 pacientes com doença periodontal crônica foram divididos de forma aleatória em dois grupos, onde um passou pela raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido de TFD e o outro foi tratado somente com a terapia convencional (RAR). Os pacientes foram monitorados 3 e 6 meses após o tratamento, e, de acordo com os pesquisadores, os pacientes que foram submetidos ao tratamento convencional associado a TFD apresentaram redução significativa no sangramento gengival quando comparado aos pacientes que foram tratados com a terapia convencional.

Fontana et al.³⁴, em 2009, investigaram o efeito da TFD utilizando o azul de metileno associado à luz vermelha para a redução do número de bactérias presentes na placa dental, comparando a ação da TFD em biofilme denso e na forma planctônica. Na pesquisa, os autores, previamente à TFD, pré-incubaram a droga fotossensível por 5 min, e então realizaram a associação do fármaco azul de metileno com a luz vermelha. Conforme o estudo, a terapia promoveu a morte de 63% das bactérias presentes na suspensão, porém reduziu somente 32% quando realizada em biofilme denso, o que se pôde concluir que a TFD foi mais eficaz quando utilizada sobre células planctônicas.

Ainda no ano de 2009, Haukvik T et al.⁴⁰ desenvolveram um estudo onde avaliaram as ações fototóxicas de diferentes soluções aquosas de curcumina sobre bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Para isso, os autores utilizaram curcumina variando a concentração de 1-25µM e luz azul com irradiância de 17mW/cm² e dose variando de 5 a 30 J/cm². Previamente à TFD, os pesquisadores pré-incubaram, com o fotossensibilizador, as bactérias por 30 min. De acordo com os pesquisadores, a sobrevivência das bactérias foi calculada por porcentagem comparada aos grupos controles e as soluções que se mostraram mais eficientes para promover a morte bacteriana tanto de Gram-positivas quanto de Gram-negativas foram as que continham o solvente dimetilsulfóxido, polietilenoglicol e o copolímero Plurônico.

Em 2010, Gonzales et al.³⁶ organizaram uma revisão de literatura sobre uma nova abordagem para inativação de microrganismos, a TFD. De acordo com o estudo, cepas de *Streptococcus aureus* se tornaram resistentes a certos tipos de antibióticos. Adicionalmente, infecções fúngicas também se tornaram muito resistentes a medicamentos antifúngicos, tornando-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas que promovessem a morte microbiana sem que houvesse o desenvolvimento de cepas resistentes. De acordo com o autor, doenças cutâneas originadas por *Streptococcus aureus* resistentes a terapia convencional com antibióticos ou ainda por espécies de fungos são indicadas para o tratamento com TFD. Portanto o autor conclui que o

desafio da TFD é encontrar uma janela terapêutica in vivo onde microrganismos multi-resistentes possam ser eliminados eficientemente de forma que não prejudique o tecido circundante.

Goulart et al.³⁷ realizaram um estudo no ano de 2010 onde avaliaram a ação fotodinâmica contra a principal bactéria causadora da periodontite, a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. No estudo foi utilizada a combinação do fármaco fotossensível rosa bengala com luz LED azul sobre bactérias na fase planctônica como também em forma de biofilme denso. Os autores concluíram que a TFD inativa o *A. actinomycetemcomitans* tanto em culturas planctônicas como em biofilme, porém o último em menor quantidade. A ação contra as bactérias ocorreu mesmo quando a droga fotossensível foi administrada em pequenas concentrações. Além disso, os autores relataram que a TFD não causou danos às células de fibroblastos tratadas sob as mesmas condições.

Mima et al.⁵⁰, em 2010, pesquisaram a eficácia da TFD utilizando hematoporfirina associada com luz LED azul e luz LED vermelha contra *Candida albicans* em língua de camundongos. Para isso os autores, após imunossupressão dos camundongos, aplicaram o fármaco fotossensível via oral em 3 concentrações distintas (400, 500, ou 1000 mg / l), esperaram 30 minutos para que o fármaco penetrasse nas células e então irradiaram o dorso da língua dos camundongos com LED. A fluência utilizada para ambos os LEDs foi de 305 J/cm². Após isso, amostras do dorso da língua foram tiradas com auxílio de *swabs* estéreis e colocadas para crescimento microbiológico em estufa por 48 horas. Posteriormente,

os pesquisadores realizaram a contagem das unidades formadoras de colônia e verificaram que a terapia foi altamente eficiente na remissão do biofilme de *Candida albicans* sem prejudicar o tecido lingual.

Dovigo et al.²², em 2011, avaliaram a eficácia da TFD utilizando a associação de fonte de luz LED azul e fotossensibilizador curcumina. Para isso, os autores pré-incubaram o fármaco fotossensível pelo tempo de 20 minutos e depois aplicaram a luz LED por aproximadamente 29 minutos (fluência de 37,5 J/cm²). Após isso, os pesquisadores realizaram a diluição seriada e o plaqueamento em meio de cultura específico para *Candida albicans*, na finalidade de analisar as células viáveis. De acordo com o estudo, tal associação demonstrou uma redução estatisticamente significativa na viabilidade de *Candida albicans* após a TFD tanto para cultura do tipo planctônicas como em biofilmes.

Também no ano de 2011, Pereira et al.⁵⁶ realizaram uma pesquisa onde avaliaram a susceptibilidade de biofilmes de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus mutans* à TFD. Para essa investigação, os autores, após promoverem o crescimento de biofilme em discos de acrílico contidos em meio de cultura suplementados com sacarose, realizaram a TFD utilizando azul de metileno como droga fotossensibilizadora e laser vermelho. O tempo de irradiação com luz foi de 98 segundos, o que gerou uma densidade de energia no valor de 350 J/cm². Em seguida, os discos foram mergulhados em solução fisiológica estéril para dissolução do biofilme. Após isso, realizou-se a diluição seriada seguida de plaqueamento em placas de *Petri* com meio de cultura

específico para crescimento microbiológico das espécies investigadas e posterior contagem das UFCs. Os autores concluem, conforme os resultados, que houve redução significativa na viabilidade de todos os microrganismos presentes nos biofilme, porém tal diminuição foi maior quando o teste foi sobre biofilmes contendo uma única espécie do que nos grupos onde havia a associação de 2 ou mais espécies nos biofilmes. Adicionalmente, os pesquisadores concluem que a fotossensibilização letal ocorreu predominantemente nas camadas mais externas dos biofilmes e que a TFD mediada por azul de metileno pode ser uma terapia eficaz no controle de biofilmes da cavidade oral.

Ainda em 2011, Wong et al.⁷⁴ realizaram um estudo para avaliar se o azul de metileno, um fotossensibilizador seguro e barato, é eficaz na inativação de enterovírus. Para isso, os pesquisadores, após inocularem os vírus em células de rato, incubarem essas células infectadas e realizarem 3 ciclos de congelamento e descongelamento, pipetaram os vírus sobrenadante e os armazenaram para posterior desenvolvimento de maior quantidade do antígeno. Posteriormente, alíquotas das suspensões virais foram pipetadas e incubadas com 450 µl de azul de metileno (0,05-0,5 mM) por 120 min em cada poço de uma placa de *Well* de 24 poços antes de serem expostas a diferentes doses de luz LED com o auxílio de um equipamento para a realização da TFD que mantinha a umidade e temperatura constantes. Para verificar como a TFD afetou as proteínas virais, teste PCR foi realizado. De acordo com os autores, a TFD foi capaz de inativar enterovírus em suspensão, promoveu danos ao material

genético e às proteínas virais, além de ter inibido a viabilidade viral em superfícies sólidas e reduzido a transmissão do vírus de uma superfície sólida para um rato neonatal.

Ainda no ano de 2011, Soukos et al.⁶⁷ publicaram uma revisão de literatura sobre a eficácia da TFD no controle de biofilmes orais. De acordo com os autores, esse tratamento vem evoluindo gradualmente e promovendo resultados cada vez mais efetivos na redução quantitativa de microrganismos existentes na cavidade oral, sendo considerada uma alternativa aos antimicrobianos existentes no mercado bem como aos meios mecânicos de eliminação de placa dental. Os pesquisadores concluem reportando que a TFD é um técnica promissora, mas que ainda necessita de muitos estudos para se estabelecer os parâmetros ideais de luz e concentração do fármaco fotossensível para que sua eficácia seja amplificada.

Florez³¹, no ano de 2012, realizaram um estudo onde analisaram a eficácia da TFD sobre células planctônicas de *Streptococcus mutans*. Para isso, os autores utilizaram cepas bacterianas padrão, as quais foram divididas em grupos e estes, expostos aos corantes (CUR, Hipericina e Photogem). Em seguida os grupos expostos à CUR foram irradiados por LED azul (450nm±10nm), os grupos expostos à hipericina foram irradiados por LED amarelo (590±10nm) e os expostos ao Photogem foram irradiados por LED vermelho (630±5nm), o que caracterizou a TFD. Os autores, conforme seus resultados, concluíram que das drogas fotossensíveis utilizadas e dos protocolos investigados, apenas a

hipericina mostrou efeito letal sobre *Streptococcus mutans*, mostrando que sua associação com LED vermelho tem potencial para controle bacteriano de *S. mutans* em saliva. Adicionalmente ao estudo em células planctônicas, os autores pesquisaram o potencial dos mesmos fármacos fotossensibilizadores associados a irradiação com luz sobre o biofilme formado em pastilhas de esmalte e , de acordo com seus resultados, observaram que os protocolos utilizados não foram eficientes para reduzir o biofilme cariogênico.

Ainda em 2012, Rezusta et al.⁶¹ pesquisaram o efeito da TFD mediada por hipericina associada a luz LED sobre várias espécies de cândida (*Candida albicans* strains, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*), e também a fototoxicidade sobre queratinócitos e fibroblastos dérmicos na finalidade de determinar possíveis efeitos colaterais. Para isso, os autores utilizaram 3 concentrações diferentes de hipericina (0,625, 1,25, 2,5 e 40 μM) associadas ao LED na dose de 18 J/cm². Conforme os autores, para se obter redução numérica das espécies, houve a necessidade de aumentar significativamente a concentração do fármaco bem como da dose de energia utilizada. Adicionalmente, os pesquisadores verificaram que tanto os queratinócitos quanto os fibroblastos não sofreram alterações quando se utilizou concentrações do fármaco menores do que 1 μM e doses abaixo de 37 J/cm², concluindo que TFD com hipericina como fármaco fotossensível parece ser adequado para o tratamento contra *Candida albicans*.

2.3 Digluconato de Clorexidina 0,12%

Davies et al.²⁰, em 1954, realizou uma pesquisa sobre um novo antimicrobiano de elevada eficácia, o digluconato de clorexidina. Segundo o autor e seus colaboradores, o antimicrobiano apresentou boa ação bacteriostática contra bactérias Gram - negativas, porém demonstrou menor ação contra Gram - positivas. Quando avaliaram sua eficácia contra esporos, verificaram que tal agente antimicrobiano não possuía ação alguma contra aqueles.

No ano de 1989, Feist et al.²⁷ realizaram uma revisão de literatura buscando analisar o uso da CHX na Periodontia, no controle da placa bacteriana, assim como suas perspectivas para o futuro. Para isso, os pesquisadores avaliaram vários métodos de aplicação (soluções para bochecho, gel de CHX, irrigação supra e subgengival, e fio dental embebido na solução de CHX. De acordo com os autores, diferentes resultados foram observados devido a variação das concentrações utilizadas bem como a duração do tratamento. Os pesquisadores concluíram que a CHX promove alguns efeitos colaterais mas por outro lado tem uma atuação positiva na redução da microbiota analisada.

No ano de 1998, Siqueira⁶⁵ realizou um estudo para investigar a efetividade de 4 soluções descontaminantes (hipoclorito de sódio 5,25%, glutaraldeído 2%, gluconato de clorexidina 2%, e 70% de álcool etílico) na intenção de eliminar esporos de *Bacillus subtilis* em cones de guta - percha. Conforme relata o autor, a solução mais eficaz na eliminação dos esporos existentes na superfície dos cones foi o hipoclorito de sódio a

5,25%, o qual promoveu a eliminação desses esporos após ter ficado somente 1 min em contato com os cones. Adicionalmente, o pesquisador concluiu que as outras 3 soluções químicas não mostraram eficiência alguma para descontaminação dos cones mesmo após 10 min de contato.

Gonçalves et al.³⁵, no ano de 2006, avaliaram a contaminação gerada pelo aerosol formado durante o uso da baixa - rotação para profilaxia dental. Para isso, os pesquisadores selecionaram 15 voluntários que passaram por profilaxia em 2 períodos de tempo. Na primeira fase os participantes passaram pelo tratamento e o aerosol formado foi coletado diretamente em placas de *Petri* localizadas na frente do cirurgião-dentista e da auxiliar e uma terceira placa posicionada sobre o tórax do paciente, a 30 cm de sua cavidade oral. Posteriormente, as placas foram colocadas em estufa para crescimento microbiológico e a contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada. Após 30 dias os voluntários passaram pelo mesmo tratamento, porém 10 minutos antes foram orientados para que fizessem bochecho com CHX 0,12% pelo tempo de 1 minuto. O aerosol liberado foi coletado da mesma maneira que na fase 1 e as placas foram levadas para crescimento microbiológico. De acordo com os autores, a pesquisa demonstrou que o uso da solução antimicrobiana previamente à profilaxia dental reduziu consideravelmente o número de microrganismos gerados.

No ano de 2008, Semenoff et al.⁶³ realizaram uma pesquisa onde analisaram a efetividade da CHX a 0,12% e 2% sobre alguns microrganismos. Tal estudo avaliou as duas diferentes concentrações

estocadas em condições de armazenamento (1- geladeira (7°C); 2- estufa (45°C) e 3- temperatura controlada (25°C) sobre *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* em um período de 30 dias. Para isso, os pesquisadores inocularam as placas de *Petri* contendo os meios de cultura ideais para crescimento de cada microrganismo estudado com o respectivo patógeno e após isso depositaram discos de papel absorvente embebidos com as soluções teste no interior das placas para avaliarem o halo de inibição formado após crescimento em estufa. Conforme reportado pelos pesquisadores, as diferentes condições de armazenamento não influenciaram a efetividade antimicrobiana da CHX sobre os microrganismos testados.

Em 2009, Kosutic et al.⁴⁵ realizaram um estudo randomizado onde avaliaram o efeito antimicrobiano de várias substâncias (cetrimida, CHX, povidine esterilizado e solução salina todos na concentração de 1%) utilizadas previamente a procedimentos cirúrgicos em odontologia. Os pesquisadores selecionaram 120 pacientes, os quais foram divididos em 4 grupos. Após a utilização dos antimicrobianos, amostras bacterianas foram coletadas do fórnix do vestíbulo dos pacientes imediatamente antes, 5 minutos após iniciada a cirurgia e no final da mesma. De acordo com os autores, houve uma redução estatisticamente significativa na contagem bacteriana durante os procedimentos em que anti-sépticos foram utilizados. Adicionalmente, os pesquisadores relataram que a CHX

foi a melhor opção para procedimentos que demoraram mais do que uma hora.

No ano de 2010, Mima et al.⁵¹ realizaram um estudo onde avaliaram o poder desinfetante de diferentes concentrações de solução de CHX sobre próteses totais colonizadas por cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol. Os pesquisadores investigaram a eficácia de solução de CHX nas concentrações de 0,2%, 1% e 2%. Para isso, próteses totais estéreis foram contaminadas com cepas do fungo estudado e colocadas em estufa para crescimento microbiológico. Após isso, cada prótese foi mergulhada nas soluções teste pelo tempo de 10 min e posteriormente amostras da solução foram pipetadas, diluídas, plaqueadas em placas contendo meio de cultura específico para *Cândida albicans* e incubadas em estufa a 37 graus para posterior contagem das unidades formadoras de colônia. Os autores concluíram que a CHX é eficaz na desinfecção de próteses contaminadas com *Cândida albicans* resistentes ao fluconazol, sendo que a solução que se mostrou mais efetiva foi a CHX 2%.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

➤ *Objetivos Gerais*

Frente ao exposto, neste estudo in vitro avaliou-se a ação da terapia fotodinâmica utilizando LED azul e curcumina sobre amostra representativa de microbiota bacteriana bucal.

➤ *Objetivos Específicos*

Avaliar o efeito das seguintes variáveis independentes (tratamentos de TFD):

- ✓ Curcumina 1,5g/L e LED com dose de 3 J/ cm^2 ($30 \text{ mW/cm}^2 \times 1 \text{ min}$).
- ✓ Curcumina 3,0g/L e LED com dose de 15 J/cm^2 ($30\text{mW/cm}^2 \times 5 \text{ min}$).

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAI E MÉTODO

➤ *Obtenção de microbiota oral representativa.*

Devido a gama de microrganismos existentes na cavidade oral decidimos não trabalhar com patógenos específicos e sim com amostras representativas das espécies aeróbias comumente encontradas na cavidade oral dos pacientes. Para tal, foram obtidas amostras salivares de 4 voluntários previamente selecionados da Clínica de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Foram selecionados aqueles que, após anamnese, atenderam aos seguintes critérios de inclusão:

- não apresentar sinais e sintomas de doenças;
- não etilista;
- não tabagista;
- maior de 18 anos;
- não estar utilizando antimicrobianos ou outras soluções de bochecho;
- não ter usado antibióticos no último mês;
- não estar utilizando creme dental com ação antimicrobiana;
- não ter se submetido à profilaxia profissional na última semana;

Os voluntários foram selecionados segundo rotina estabelecida pelo CONEP/CEP^{Anexo 2}, a saber:

- Os voluntários receberam informações detalhadas a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios.

- A adesão do paciente à pesquisa foi livre e voluntária.

- Ao voluntário coube a decisão de se retirar do experimento em qualquer momento.

- A recusa de participação não implicou em prejuízos ou sanções para o voluntário.

- A colaboração na investigação não implicou em ônus ou ganho financeiro para o voluntário.

- Sua identidade foi mantida em sigilo.

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa- FOAr (n^o do processo: 68/10)^{Anexo 1}, 10 mL de saliva de cada voluntário foi coletada em tubos *Falcon* de 50 mL estéreis. A seguir foram processadas individualmente por rotina microbiológica a fim de determinar o conteúdo bacteriano no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade, sob responsabilidade da Profa. Dra. Juliane G. Tonomaru. Após essa determinação, a amostra que conteve maior quantidade de microrganismos foi selecionada para a realização dos experimentos.

➤ **Fotossensibilizador utilizado - Curcumina.**

O fármaco fotossensível utilizado foi a curcumina, um corante amarelo ouro extraído do rizoma do Açafrão da Índia (*Curcuma Longa*) - Figura 1.



FIGURA 1 - *Curcuma longa* em corte transversal.

Nesse estudo foi usada a solução aquosa concentrada de sal de curcumina – a curcumina –, que foi fornecida pela PDT Pharma de Cravinhos – SP, Figura 2. Esta foi diluída em água destilada e imediatamente aplicada nos testes que foram realizados devido a sua baixa estabilidade em meio aquoso.



FIGURA 2 - Solução “mãe” de Curcumina (3g/L).

Para se obter o fotossensibilizador estéril, a curcumina diluída foi filtrada em membrana esterilizada com poros de diâmetro de 0,22 μm como mostrado na Figura 3.

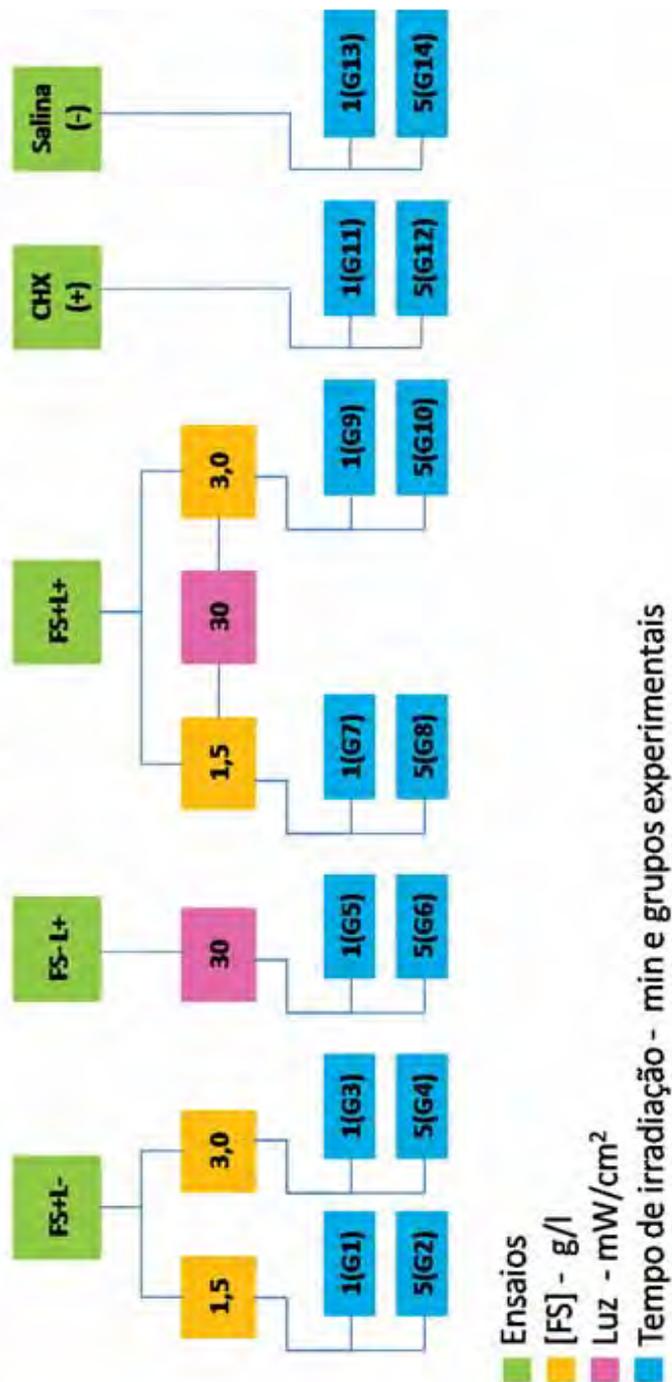


FIGURA 3 - Filtro com membrana esterilizadora.

➤ Ensaaios

Para os ensaios experimentais foi preparado o inóculo (contaminante) utilizando 9 mL de salina (cloreto de sódio a 0,85%) e 1mL de saliva. Após isso, em cada poço da placa de *Well* foram pipetados 500 µL do inóculo (saliva diluída) e mais 500 µL das substâncias teste (CHX 0,12% ou CUR 1,5g/L ou 3,0g/L ou SAL) para cada tempo (1 min e 5 min). O número de repetições realizadas para cada teste foi 6, sendo 14 grupos , o que gerou um total de 84 ensaios antimicrobianos, conforme Quadro 1 na página seguinte.

Quadro 1: Grupos e condições experimentais.



Na seqüência, os tratamentos foram realizados de acordo com o quadro acima descrito e conforme Figura 4 localizada na página seguinte,

onde na primeira linha da placa de *Well* foram realizados os tratamentos somente da solução de 3,0 g/L de CUR (500 µL de inóculo + 500 µL de CUR 3,0g/L) pelo período de tempo de 1 min sem a presença de luz (FS+ L-, **G3**). Imediatamente após o tempo de 1 min do FS em contato com o inóculo, as amostras foram diluídas e plaqueadas.

Subseqüentemente se iniciou o tratamento do inóculo com a solução de 1,5 g/L de CUR (500 µL de inóculo + 500 µL de CUR 1,5g/L) também pelo tempo de 1 min e com ausência de iluminação (FS+ L-, **G1**). Imediatamente após, as amostras foram diluídas de forma seriada e plaqueadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura universal para crescimento microbiológico (ágar sangue enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro).

O mesmo se repetiu para os grupos **G11** (CHX 0,12% em contato com o inóculo por 1 min sem iluminação) e **G13**(SAL em contato com o inóculo por 1 min na ausência de luz). Após cada teste, as amostras foram diluídas e plaqueadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura universal para crescimento microbiológico (ágar sangue enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro).



FIGURA 4 - Tratamentos sem a presença de luz pelo tempo de 1 min.

Conforme realizado para o tempo de 1 minuto, as soluções também foram testadas com o período de tempo de 5 minutos em contato com o contaminante e na ausência de luz. Para isso, uma nova placa de *Well* foi necessária, além de novas soluções com as mesmas concentrações. Os grupos testados foram **G2** (500 μ L de inóculo + 500 μ L de CUR 1,5g/L), **G4** (500 μ L de inóculo + 500 μ L de CUR 3,0g/L), **G12** (500 μ L de inóculo + 500 μ L CHX 0,12%) e **G14** (500 μ L de inóculo + 500 μ L de SAL). Após cada teste, as amostras também foram diluídas de forma seriada e plaqueadas em seguida.

Depois, para a realização dos testes com a presença de luz e conseqüentemente para o desenvolvimento desse método inovador para descontaminação/ desinfecção da cavidade oral baseado na utilização de TFD com LED azul e CUR foi necessário o desenvolvimento de um

equipamento LED para TFDA, o qual foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP – CEPID. Esse dispositivo contém 54 LEDs azuis (450nm \pm 10 nm) para irradiar os poços das placas de *Well* contendo as soluções analisadas - Figuras 5 e 6.

Tal dispositivo é composto por duas partes: A) caixa de comando que permite o controle da intensidade da irradiância emitida e do tempo de emissão (Potência) e, B) caixa de testes, que contém os LEDs, três *coolers* para refrigeração e suporte para posicionamento da placa de *Well*, permitindo que a irradiância seja aplicada. Esse equipamento foi denominado *Biotable* – Figuras 5 e 6.

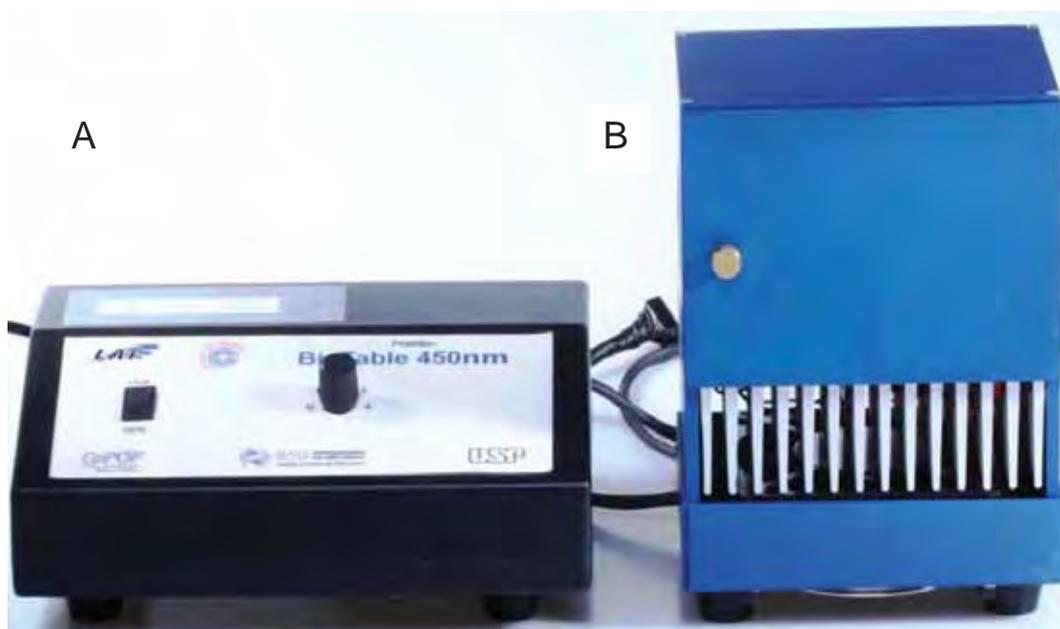


FIGURA 5 - *Biotable*: caixa de comando (A) e caixa teste (B).

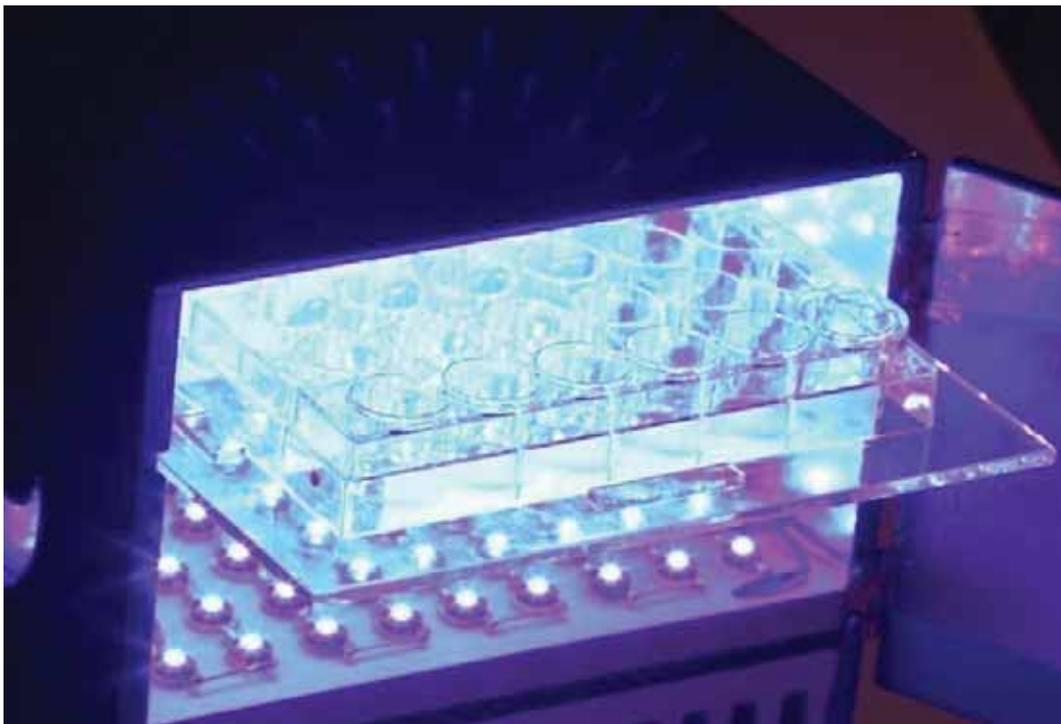


FIGURA 6 - *Biotable*: Disposição dos LEDs e posicionamento da placa de *Well*.

Nesse estudo utilizou-se a densidade de potência de 30 mW/cm^2 , o que promoveu duas doses de energia diferentes, uma de 3 J/cm^2 quando irradiado pelo tempo de 1 minuto e outra de 15 J/cm^2 quando irradiado pelo tempo de 5 minutos..

Após os tratamentos sobre as diferentes substâncias teste, foi realizado o teste para analisar o potencial antimicrobiano da luz por si só (FS- L+). Para isso, $500\mu\text{L}$ de inóculo + $500\mu\text{L}$ de SAL (**G5**) foram pipetados em 6 poços da placa de *Well*, a qual logo em seguida foi processada no dispositivo *biotable* para irradiação com LED pelo tempo de 1 min (Figura 7). Na seqüência as amostras foram diluídas de forma seriada e plaqueadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura

universal para crescimento microbiológico (ágar sangue enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro).

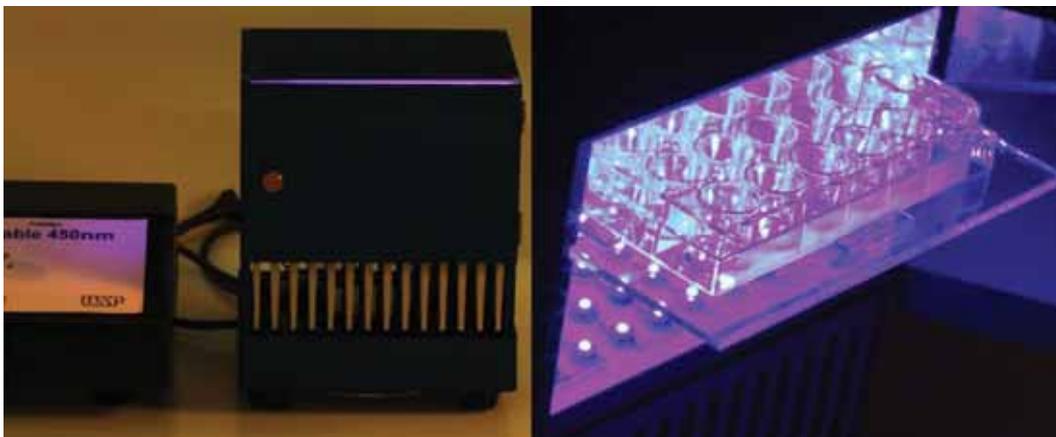


FIGURA 7 - Verificação da efetividade da luz *per se* na redução microbiana.

O mesmo foi realizado para o grupo **G6** (FS-L+), porém este permaneceu dentro da *biotable* sob ação da irradiação pelo tempo de 5 min. Após, as amostras foram diluídas e plaqueadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura universal para crescimento microbiológico (ágar sangue enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro).

Na seqüência, os testes para analisar a eficácia da TFDA para redução da quantidade de patógenos presentes na cavidade oral foram realizados, sendo que o primeiro grupo avaliado foi o **G7** (FS+L+) - 500 μ L de inóculo + 500 μ L de CUR 1,5g/L associados ao LED - pelo tempo de 1 min. Imediatamente depois a diluição seriada e o plaqueamento foram realizados. O mesmo aconteceu com o grupo **G9** (500 μ L de inóculo+ 500 μ L de CUR 3,0g/L associados ao LED).

Logo em seguida o grupo **G8** (FS+L+), composto por 500 μ L de inóculo + 500 μ L de CUR 1,5g/L associados ao LED pelo tempo de 5 min

foi testado, e suas amostras foram diluídas e plaqueadas imediatamente após. O mesmo aconteceu com **G10** (500µL de inóculo + 500 µL de CUR 3,0g/L associados ao LED).

Uma vez que se utilizou macro concentrações de CUR, não houve tempo de incubação previamente à exposição ao LED.

Após cada teste executado, 100 µL do conteúdo de cada poço da placa de *Well* foi diluído de forma seriada em 900 µL de salina contidos em ependorfes conforme especificado em “A” da Figura 8.

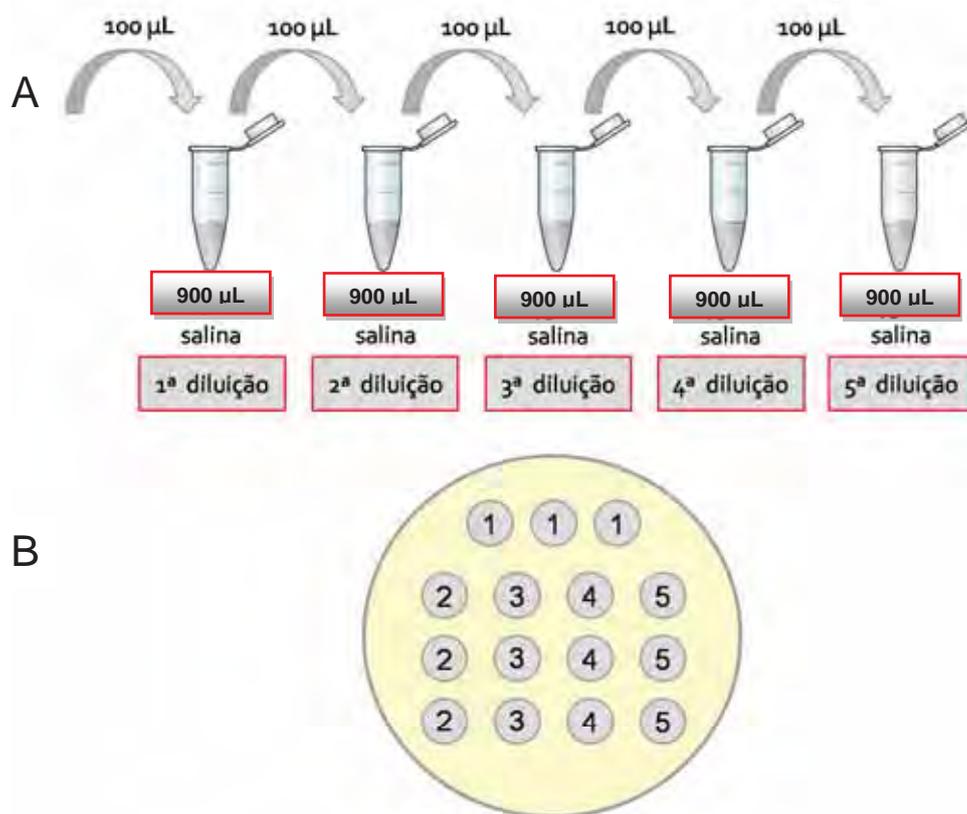


FIGURA 8 - Diluição decimal seriada (A) e plaqueamento utilizando a técnica da gota (B).

Terminada a diluição decimal seriada, alíquotas de 20 μ L foram semeadas, utilizando-se a técnica da gota, em placas de *Petri* contendo ágar sangue (BHI – *Brain Heart Infusion* enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro), que é um meio universal de crescimento microbiológico conforme Figura B do esquema anteriormente apresentado e Figura 9 abaixo.

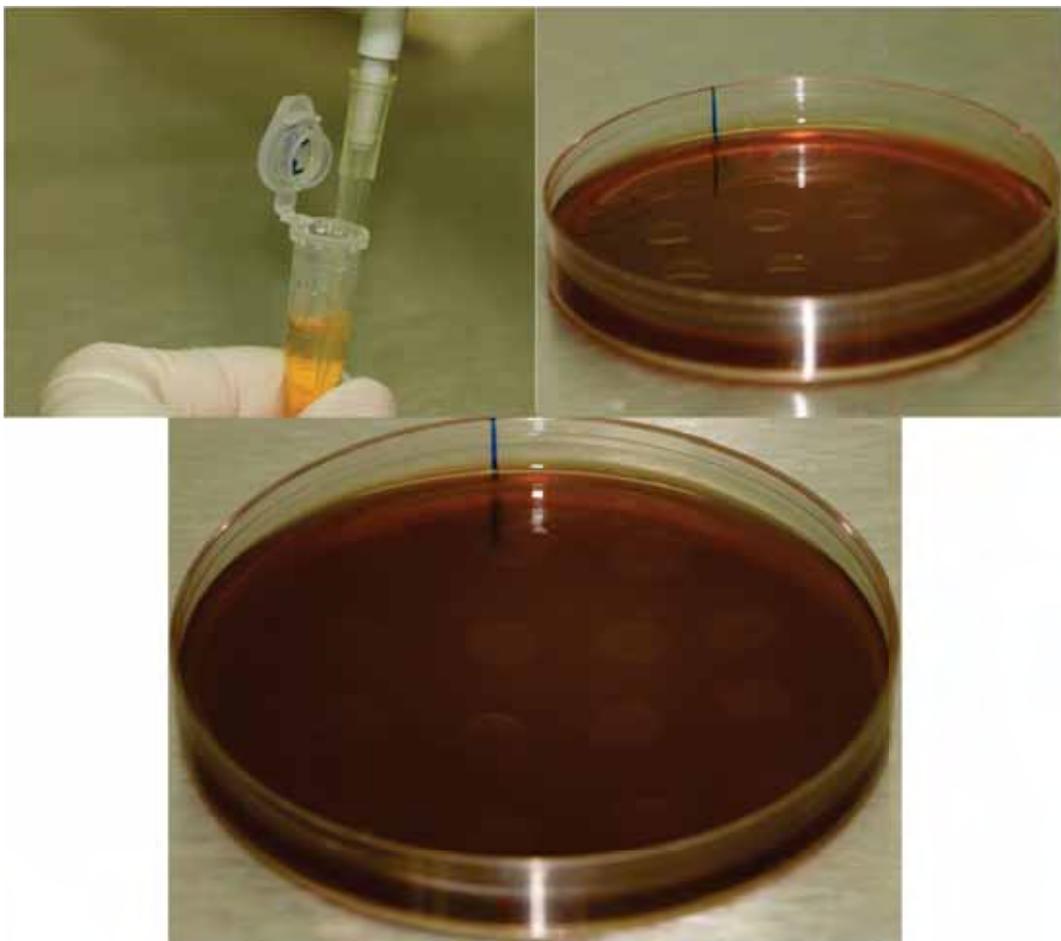


FIGURA 9 - Plaqueamento em placas de *Petri* contendo meio de cultura universal para crescimento microbiológico (ágar sangue enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro) com uso da técnica da gota.

Esperou-se que as gotas secassem e somente após isso as placas foram devidamente enumeradas, identificadas e colocadas para crescimento microbiológico em microaerofilia, permanecendo em estufa à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas conforme demonstrado na Figura 10.



FIGURA 10 - Identificação das placas e colocação das mesmas em estufa em condições de microaerofilia à $37^{\circ}\text{C}\pm 1$.

Todo o procedimento foi padronizado e realizado por um único operador. O plaqueamento foi realizado em triplicata, e após o crescimento em estufa em microaerofilia a contagem das UFCs que cresceram em cada placa foi realizada por um pesquisador devidamente treinado, conforme Figuras 11 abaixo e 12 da página subsequente.

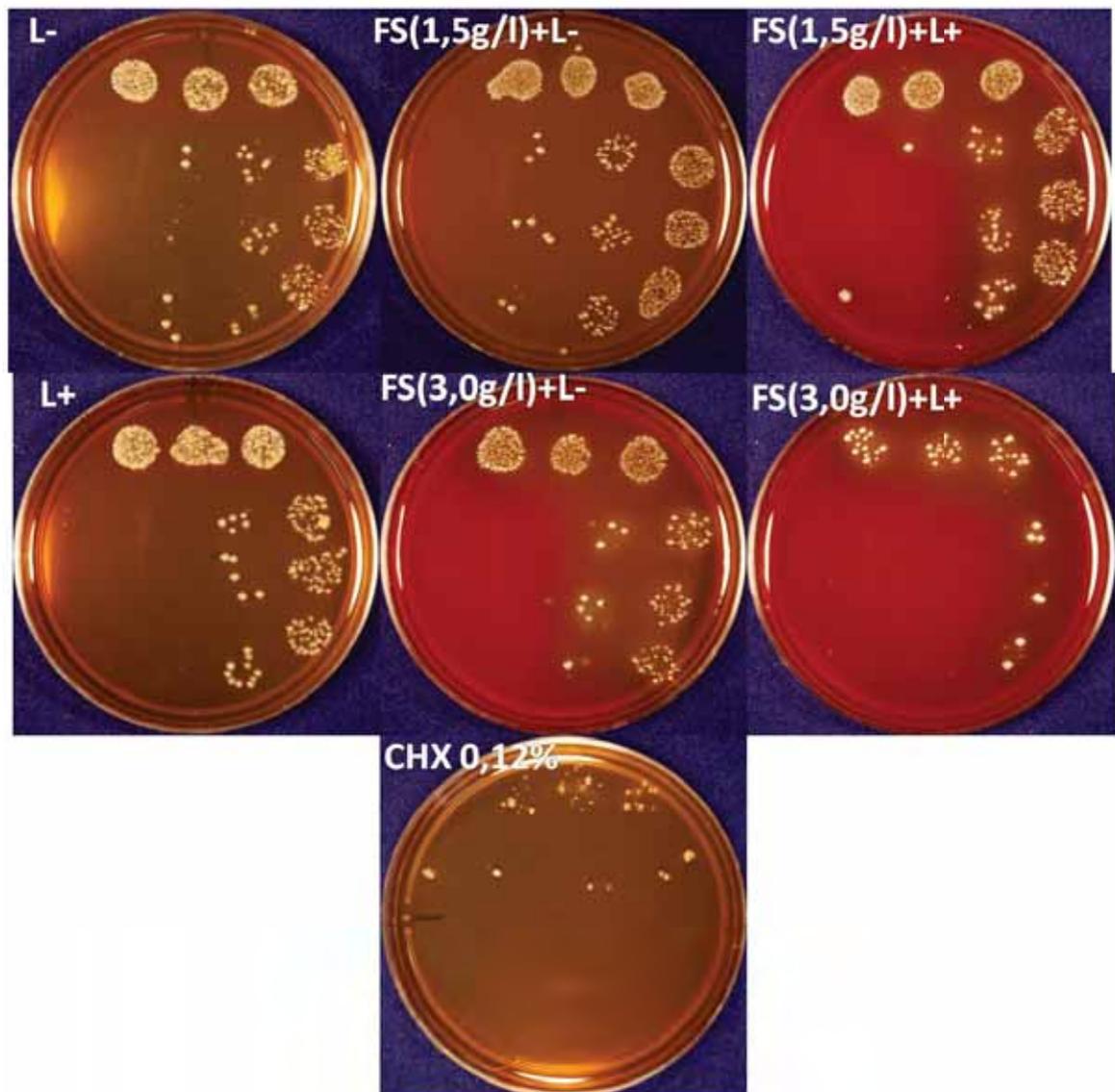


FIGURA 11 - Contagem das UFC/ml em \log_{10}/mL para os testes realizados com o tempo de 1 min com ou sem irradiação.

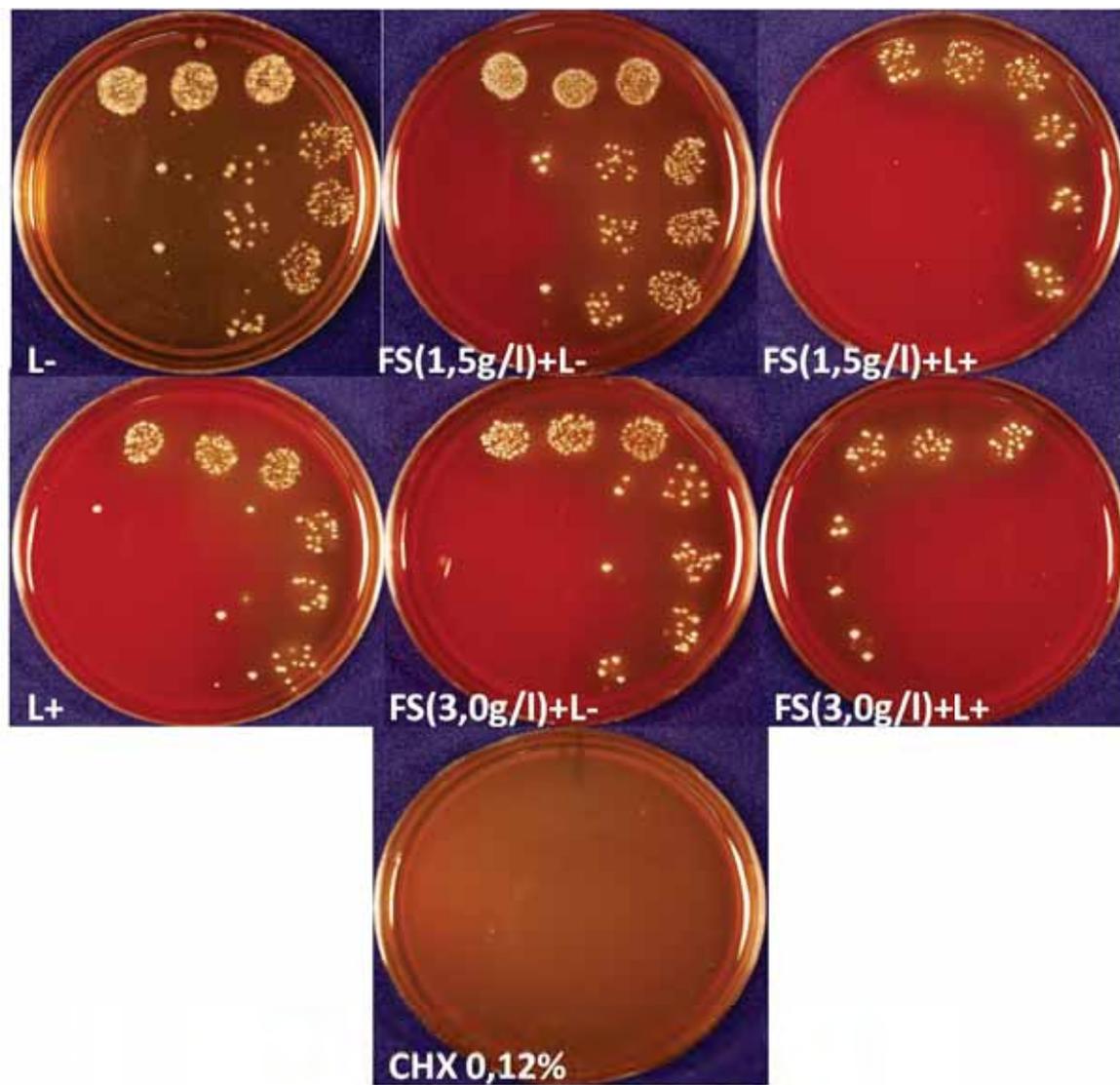


FIGURA 12 - Contagem das UFC/ml em \log_{10}/mL para os testes realizados com o tempo de 5 min com ou sem irradiação.

RESULTADO

RESULTADO

4 RESULTADO

Após a contagem de UFC/mL, os valores encontrados foram transformados em \log_{10} . Os pressupostos para aplicação de teste paramétrico foram atendidos conforme pode ser observado no teste de normalidade dos dados - Shapiro-Wilk ($n < 50$) e homogeneidade das variâncias – Levene, Quadro 2 abaixo e Tabela 1 na página seguinte.

Quadro 2 - Testes de Normalidade

Tratamento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estatística	df	Sig.	Estatística	df	Sig.	
Contagem	G1	,321	6	,053	,872	6	,233
	G2	,220	6	,200*	,876	6	,250
	G3	,279	6	,157	,794	6	,052
	G4	,225	6	,200*	,922	6	,522
	G5	,136	6	,200*	,974	6	,917
	G6	,189	6	,200*	,912	6	,447
	G7	,183	6	,200*	,907	6	,417
	G8	,160	6	,200*	,941	6	,664
	G9	,208	6	,200*	,960	6	,818
	G10	,184	6	,200*	,912	6	,453
	G11	,165	6	,200*	,960	6	,818
	G13	,355	6	,018	,599	6	,000
	G14	,337	6	,032	,798	6	,056

- *. Limite inferior de significância
- a - Contagem é constante quando G12 é omitido.

Tabela 1- Teste de Homogeneidade de Variâncias^a

		Estatística			
		Levene	df1	df2	Sig.
Contagem	- Baseado em Média	2,078	12	65	,031
	- Baseado em Mediana	1,772	12	65	,072
	- Baseado na Mediana e com ajuste do grau de liberdade (df)	1,772	12	31,667	,098
	- Baseado na Média ajustada	2,052	12	65	,033

A análise dos dados, com os valores de média, desvio padrão, erro padrão e intervalo de confiança para cada um dos tratamentos analisados pode ser observada na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2- Análise da ação antimicrobiana de diferentes tratamentos, Araraquara 2012

	N	Média	DP	EP	Máximo	Mínimo
G1	6	6,4917	,07985	,03260	6,41	6,63
G2	6	6,0767	,06346	,02591	6,00	6,15
G3	6	5,3300	,17470	,07132	5,20	5,66
G4	6	5,1467	,11147	,04551	5,00	5,28
G5	6	6,9150	,06473	,02643	6,83	7,00
G6	6	6,9517	,04956	,02023	6,90	7,04
G7	6	6,1500	,06753	,02757	6,08	6,26
G8	6	4,9933	,10539	,04302	4,88	5,15
G9	6	5,3400	,28157	,11495	4,97	5,78
G10	6	4,3483	,19115	,07803	4,15	4,66
G11	6	3,8483	,22569	,09214	3,48	4,11
G12	6	,0000	,00000	,00000	,00	,00
G13	6	6,9667	,06802	,02777	6,83	7,00
G14	6	6,8883	,16534	,06750	6,57	7,04
Total	84	5,3890	1,79806	,19618	,00	7,04

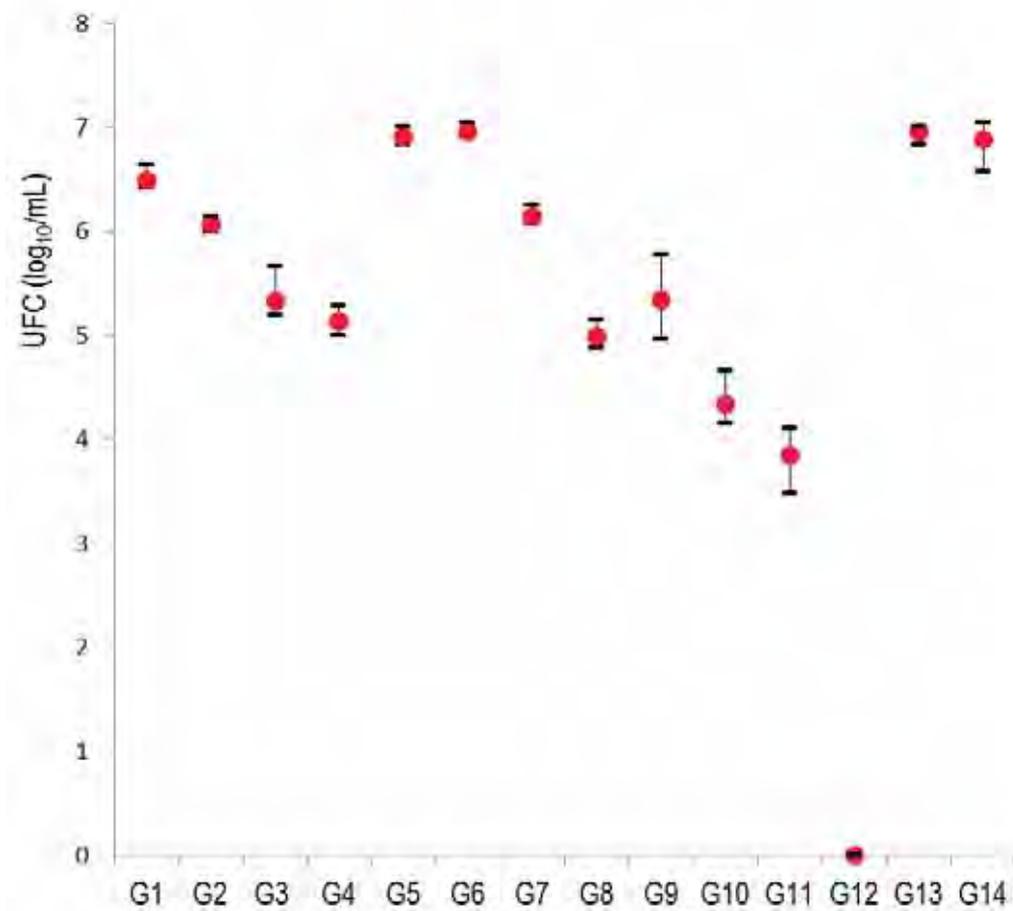
Para a análise dos resultados obtidos, os dados foram submetidos à ANOVA one way. O resultado desta análise pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado do teste Anova para redução bacteriana em função de diferentes tratamentos, Araraquara 2012

	Soma dos Quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.
Entre grupos	266,968	13	20,536	1047,831	,000
Intra-grupos	1,372	70	,020		
Total	268,340	83			

- Significância para $p < 0,05$ (Confiabilidade de 95%)

Para identificar os tratamentos com diferenças estatisticamente significativas foi utilizado o teste post Hoc de Tukey HSD de comparações múltiplas, demonstrado na página seguinte – Figura 13:



G1 – FS (1,5g/L)+L- por 1'.

G2 – FS(1,5g/L)+L- por 5'.

G3 – FS(3,0g/L)+L- por 1'.

G4 – FS(3,0g/L)+L- por 5'.

G5 – SAL+L+ por 1'.

G6 – SAL+L+ por 5'.

G7 – TFD(L+FS1,5g/L) por 1'.

G8 – TFD(L+ FS1,5g/L+) por 5'.

G9 – TFD(L+ FS3,0g/L+) por 1'.

G10 – TFD(L+ FS3,0g/L+) por 5'.

G11 – CHX 0,12% por 1'.

G12 – CHX 0,12% por 5'.

G13 – SAL por 1'.

G14 – SAL por 5'.

FS = Fotossensibilizador

L = Luz

CHX = Clorexidina

SAL = Salina

TFD= Terapia Fotodinâmica

Figura 13 - Média e intervalo de confiança dos tratamentos realizados em UFC/mL.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O cirurgião-dentista, sua equipe auxiliar e seus pacientes estão expostos a uma série de riscos à saúde, sendo que o principal deles é a constante exposição ao conteúdo microbiológico (bactérias, vírus e fungos) existente no aerosol formado durante procedimentos clínicos rotineiros como profilaxia com baixa-rotação, uso de jato de bicarbonato de sódio e utilização da turbina de alta-rotação^{1, 7-8, 16, 24, 38-39, 48, 49-50, 52, 54-55, 58-60, 68, 78}.

Mesmo que o cirurgião-dentista e sua equipe utilizem EPIs durante a consulta odontológica, a contaminação causada pelo aerosol permanece em suspensão no ambiente por períodos que variam de alguns minutos até 24 horas após os procedimentos^{1, 7-8, 16, 48, 58-59}, significando que tanto o cirurgião-dentista e sua equipe, quanto os pacientes estão constantemente expostos ao risco de contaminação cruzada^{8, 15, 26, 54}.

O bochecho prévio com agentes antimicrobianos é o procedimento clínico mais recomendado para reduzir quantitativamente o número de bactérias existentes na cavidade oral do paciente, diminuindo assim o risco da contaminação cruzada no consultório odontológico^{20, 27, 35, 45, 51, 63, 65}.

Dentre os antimicrobianos mais utilizados a solução de digluconato de clorexidina à 0,12% é a mais efetiva e, devido a isso, considerada padrão ouro para testes de redução ou controle antimicrobiano tanto in vitro como in vivo^{20, 27, 35, 45, 51, 63, 65}.

No entanto, o uso constante deste antimicrobiano tem como efeito colateral alterações no paladar e pigmentação acastanhada em dentes, restaurações e língua^{20, 35, 65}.

Atualmente, a Terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) voltou a ser objeto de grande investigação devido ao surgimento de cepas microbianas resistentes aos antibióticos. Tal terapêutica surgiu no século XX, quando Oscar Raab investigava o potencial citotóxico de uma série de corantes e observou que baixas concentrações de acridina foram letais para *Paramecium caudatum* quando expostos a luz do dia²¹. No entanto, o sucesso inicial dos antibióticos fez com que a TFDA não fosse plenamente estudada e aprimorada²¹.

A TFDA é um tratamento minimamente invasivo e muito eficaz contra doenças causadas por fungos, vírus e bactérias. Consiste da associação de um agente fotossensibilizador com uma luz visível na intenção de provocar necrose celular e morte microbiana^{2, 9, 21, 71}.

A ação fotodinâmica se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz levando seus elétrons para um estado excitado de energia, fazendo com que as moléculas do fármaco permaneçam excitadas. Quando excitadas, essas moléculas tornam-se altamente reativas e instáveis, tendendo a voltar para seu estado fundamental de energia^{2, 9, 21}. Na tentativa de retornar ao seu estado energético natural, uma parte da energia adquirida durante o processo de excitação é utilizada para promover a travessia intersistema do fármaco, ficando este com um nível de energia intermediário. Uma vez no estado

intermediário, ao retornar ao seu estado natural, o agente fotossensibilizador pode liberar essa energia em forma de emissão de luz por fosforescência ou ainda interagir com moléculas adjacentes de duas maneiras distintas^{9, 21, 76}. A primeira maneira é a reação Tipo I, a qual acontece quando há a troca de elétrons ou íons hidrogênio entre o corante e as biomoléculas existentes nos tecidos, células, originando radicais livres como o peróxido de hidrogênio, as hidroxilas reativas e os superóxidos^{2, 9, 21, 76}.

O segundo tipo de interação é denominado reação do Tipo II, e caracteriza-se pela interação do corante com o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$) presente nos tecidos, originando o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que é altamente reativo e provoca danos aos microrganismos via oxidação irreversível dos componentes celulares. Muitos autores relatam danos à membrana celular, às mitocôndrias e ao núcleo celular, levando o microrganismo à morte celular por necrose ou apoptose^{2, 9, 21, 76}.

De acordo com Wainwright⁷¹ em 1998, existem diversos sítios de ação da Terapia fotodinâmica sendo que cada um promoverá um resultado diferente. Quando a ação ocorre no líquido intersticial há a formação de hidroxilas reativas com conseqüente produção de peróxido de hidrogênio, superóxidos e hidroperóxidos que resultarão em processos oxidativos no interior da célula microbiana. Se a ação ocorrer sobre a parede celular (lipídios insaturados), há a formação de hidroperóxidos os quais levarão a um aumento da permeabilidade iônica da membrana celular. Quando a Terapia fotodinâmica age sobre a capa protéica, ocorre

a oxidação das proteínas que constituem essa cobertura, com conseqüente degradação protéica, acarretando na perda da capacidade patogênica da célula microbiana. Quando a ação ocorre sobre o envelope viral protéico, ocorre a inativação enzimática levando a perda da capacidade de reparação e conseqüente morte da célula microbiana. Em se tratando da ação sobre resíduos de ácidos nucléicos, tem-se a oxidação das bases, resultando em degradação dos nucleotídeos, gerando quebra da fita de RNA/DNA ou ainda mutação e inibição da divisão celular. Por fim, quando a ação ocorre sobre enzimas da célula microbiana, é possível observar a oxidação daquelas com conseqüente inibição das funções dos ribossomos, acarretando na perda da patogenicidade e inibição da divisão celular.

Adicionalmente, Wainwright ⁷¹ relatou que apesar das bactérias possuírem uma série de enzimas antioxidantes que promovem proteção contra alguns tipos de radicais livres, elas não conseguem impedir o processo oxidativo imposto pelo oxigênio singleto (1O_2). O autor também acredita que seja improvável o surgimento de cepas resistentes a essa modalidade terapêutica, já que esse tratamento independe de uma via metabólica-alvo, concluindo que a TFDA para a inativação de microrganismos em suspensão, *in vitro*, é altamente eficaz.

Estudos de Yamada Junior et al. ⁷⁵, Fimple et al. ²⁹, Fontana et al. ³⁴ dentre outros já mostravam que um grande número de bactérias bucais é susceptível a essa terapia. Dentre elas, especificamente como método de desinfecção ou controle microbiano, incluem-se a redução bacteriana em

canais radiculares, em bolsas periodontais, lesões de cárie e sítios com peri-implantite ⁷⁵, o que além de minimizar a quantidade desses microrganismos patogênicos na cavidade oral do paciente também diminui a chance dos mesmos serem espalhados para o ambiente odontológico por meio de gotículas de aerossol podendo levar a infecção cruzada e/ou direta.

Neste estudo investigou-se o potencial descontaminante da TFD mediada por LED azul (450±10nm) associado ao fármaco de origem natural denominado curcumina. Essa investigação demonstrou que a TFD foi significativamente eficaz na redução quantitativa de microrganismos presentes na saliva humana quando comparada com grupos controle negativo. No presente estudo, conforme os resultados, é possível relatar que nos grupos controle positivo (**G11** e **G12**) foi evidente que houve redução microbiana em todas as amostras. No entanto, em **G12** houve redução total de microrganismos, uma vez que nenhuma UFC/mL foi observada na placa de *Petri*. Tal resultado está em concordância com estudos de Davies et al. ²⁰, Feist et al. ²⁷, Siqueira ⁶⁵, Gonçalves et al. ³⁵, Semenoff et al. ⁶³, Kosutic et al. ⁴⁵ e Mima et al. ⁵¹ onde é possível se observar a eficiência da clorexidina na redução microbiana, já que a mesma é um agente antimicrobiano extremamente eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo, atualmente, considerada o padrão ouro quando se trata de redução quantitativa de microrganismos da cavidade oral. Quando se compara com os grupos controle negativo (**G13** e **G14**) a diferença fica mais evidente, uma vez que **G13** e **G14** não

passaram por tratamento algum, portanto não apresentaram qualquer redução numérica dos patógenos presentes na saliva humana.

Os grupos **G1**, **G2**, **G3** e **G4** os quais avaliaram o poder descontaminante do fotossensibilizador por si só mostraram que a curcumina em menor concentração não promoveu redução microbiana significativa, porém **G3** e **G4**, que possuíam a maior concentração de curcumina, apresentaram maior eficácia na redução de patógenos do que os grupos **G1** e **G2**. Essa diferença se dá devido à maior concentração do fármaco e ao maior tempo que o inóculo ficou exposto a ele, demonstrando que a efetividade da curcumina está diretamente relacionada com sua concentração e o tempo que permanece em contato com o contaminante, o que indica que este estudo está coerente com os trabalhos de Fimple et al.²⁹, Florez et al.³¹, Fontana et al.³⁴, Wainwright⁷¹ e Wilson⁷², os quais defendem que a concentração da droga fotossensível utilizada e sua toxicidade influenciam diretamente na eficácia da Terapia fotodinâmica. Adicionalmente, é importante salientar que esse fármaco possui elevado potencial antimicrobiano contra bactérias, fungos e, vírus^{4, 10, 14, 23, 30, 43, 70}, o que o torna especialmente atrativo quando se trata de descontaminação oral com a finalidade de reduzir o risco de contaminação cruzada^{5-6, 38, 46}, uma vez que a clorexidina é eficaz contra bactérias, no entanto não existem relatos na literatura sobre sua capacidade de promover morte viral.

Ao se comparar os grupos **G8** e **G9** é possível dizer que não houve diferença significativa entre eles, podendo-se concluir que a eficiência da

Terapia fotodinâmica está diretamente relacionada com a concentração utilizada do fármaco e com o tempo de exposição dele aos microrganismos e a luz, uma vez que **G8** - grupo com a menor concentração do fármaco, porém o maior tempo de exposição à luz - apresentou praticamente o mesmo efeito de **G9**, grupo com maior concentração de curcumina, porém menor tempo de exposição à luz. Isso demonstra claramente que os dois fatores de variação estão intimamente relacionados, provando assim que a Terapia fotodinâmica é uma técnica totalmente dependente da associação do fármaco fotossensível à luz com comprimento de onda específico para o agente fotossensibilizador eleito⁹. Tal resultado está em concordância com os encontrados nos trabalhos de diversos autores^{19, 29, 33-34, 36-37, 40, 47, 50, 56, 61, 64, 66-67, 69, 71-74, 77}, assim como nos trabalhos de Chan et al.¹² em 2003, Dovigo et al.²² em 2011, a qual, em sua investigação verificou menor número de UFC/mL quando utilizou fármacos fotossensíveis em maior concentração (1000 mg/L).

Nos grupos **G5** e **G6**, onde se avaliou a efetividade descontaminante da luz *per se* foi possível observar que ela não foi eficaz para a redução quantitativa dos microrganismos presentes na saliva humana, já que quando comparada aos grupos controle negativo (**G13** e **G14**) não houve diferença entre eles. É possível que esse resultado tenha sido obtido pelo pouco tempo de exposição à fonte de luz, uma vez que a literatura relata que o potencial da luz na redução de patógenos em geral é moderado, como é o caso do trabalho desenvolvido por Soukos et al.⁶⁶ o qual avaliou a eficiência da TFD sobre patógenos endodônticos em fase

planctônica e verificaram que a luz utilizada na pesquisa (laser diodo) promoveu redução significativa na viabilidade desses microrganismos. Outro fator que deve ser levado em consideração é a possibilidade de ter ocorrido crescimento bacteriano devido ao aquecimento do dispositivo utilizado para irradiação dos poços da placa de *Well*, facilitando a proliferação bacteriana. Isso fica evidente quando se compara o grupo **G14** com o **G6**, onde este possuiu um valor mínimo de crescimento bacteriano maior do que o valor mínimo de crescimento bacteriano do grupo **G14** (controle negativo).

Os resultados obtidos para o grupo **G7** demonstraram que a associação do fármaco fotossensibilizador com a luz promoveu uma pequena redução numérica dos patógenos, porém tal diminuição não foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle negativo (**G13** e **G14**). No entanto, quando comparada ao controle positivo (**G11** e **G12**), foi possível notar que houve uma diferença significativa. Isso pode ter ocorrido devido à baixa concentração do fármaco e ao pouco tempo de exposição deste à luz, uma vez que a maioria dos trabalhos relata que, previamente a Terapia fotodinâmica, a droga fotossensível foi pré-incubada por um determinado tempo para que existisse a penetração daquele no interior da célula microbiana, o que aumenta o potencial letal da terapia, uma vez que quanto mais fármaco no interior da célula microbiana, maior a formação de oxigênio singleto e radicais livres^{29, 33, 34, 37, 50, 56, 61, 66, 72, 74}. Nesse estudo não foi realizada a pré-incubação da droga ao inóculo pelo fato de termos trabalhado com elevadas

concentrações do fármaco e também para testarmos se a Terapia fotodinâmica seria eficiente de imediato, ou seja, sem exposição prévia do inóculo à droga fotossensível. Conforme os resultados, ficou evidente que mais estudos devem ser realizados para se ajustar os parâmetros (concentração da droga e dose de energia) e assim podermos transportar essa técnica para a rotina clínica diária.

Já o grupo **G8** apresentou uma redução representativa na quantidade de microrganismos que possuem a cavidade oral como habitat natural. Essa diminuição se mostrou significativa quando comparada com os grupos controle negativo, porém quando comparada com os controles positivos, não foi representativa, constatando mais uma vez que a clorexidina ainda é o padrão ouro para redução quantitativa de microrganismos^{20, 51}. No entanto, é necessário salientar que apesar da Terapia fotodinâmica não ter sido tão eficaz quanto a clorexidina, houve sim uma redução quantitativa de microrganismos planctônicos. Além do mais, quando se compara o efeito antimicrobiano do grupo **G8** com o **G7** é notável a diferença, o que demonstra que a eficácia da Terapia fotodinâmica é concentração do fármaco e dose de energia dependente^{2,}

9, 18, 22, 28-29, 31, 33-34, 36-37, 40, 47, 50, 56, 61, 66-67, 69, 71, 74, 77

Os resultados conseguidos para as amostras do grupo **G9** também representaram diminuição numérica desses microrganismos, e essa redução foi considerada estatisticamente significativa quando comparada com os grupos controle negativo, mas quando comparada aos grupos controle positivo houve diferença estatística para menos, o que indicou

menor eficácia do que o tratamento convencional com clorexidina 0,12%. Porém, quando se compara o grupo **G9** com o **G8** pela Figura 14 é possível perceber que não há diferença entre eles.

G10 foi o único grupo onde se observou uma maior proximidade com os resultados alcançados pelo controle positivo, demonstrando que ele foi eficaz na redução quantitativa dos patógenos existentes na saliva. Tal resultado se mostrou eficaz devido à associação da maior concentração da droga com o maior tempo de irradiação. Esse maior tempo de contato do fármaco com o inóculo pode ter favorecido a morte das bactérias devido à ação antimicrobiana da curcumina. Outro fator que deve ser levado em consideração e que é mais relevante do que o anteriormente citado é o fato de que o maior tempo de uso da Terapia fotodinâmica levou a maior formação de radicais livres e oxigênio singlete, promovendo maior morte microbiana. Esses resultados estão em concordância com diversos estudos anteriores, inclusive com os encontrados por Mima et al.⁵⁰, o qual avaliou a eficiência da TFD sobre *C. albicans* utilizando diferentes concentrações do fármaco de eleição e obteve melhores resultados quando do uso da maior concentração da droga fotossensível, salientando novamente que a eficácia da técnica está diretamente relacionada com a concentração da droga fotossensível de eleição bem como da dose de energia utilizada.

Quando se compara o grupo **G10** com o grupo **G11** é possível notar que o valor mínimo de UFC/mL encontrado em **G10** é muito próximo do valor máximo encontrado em **G11**. Esse resultado traduz a eficiência

desse tipo de técnica, porém, para a redução quantitativa dos microrganismos presentes na saliva humana e conseqüente diminuição da probabilidade de contaminação direta e cruzada, o uso da clorexidina 0,12% ainda é a melhor opção.

As principais limitações deste estudo foram a falta do período de espera para a penetração do fotossensibilizador, a utilização de fotossensibilizador com afinidade desconhecida para as bactérias bucais e a alta instabilidade do fármaco fotossensível utilizado.

Os resultados obtidos indicam que a Terapia fotodinâmica antimicrobiana possui grande potencial, porém esta técnica precisa ser ainda aperfeiçoada para que sua utilização clínica possa ser realizada com benefícios para pacientes, funcionários e profissionais.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos e guardando as limitações deste estudo in vitro, pode-se concluir que:

1) A eficácia da TFDA utilizando CUR e LED azul é concentração do fármaco e dose de irradiação dependente.

2) Os tratamentos antimicrobianos mais eficazes foram CHX 5% e CHX1% e CUR 3g/L irradiada por 5min.

3) Os tratamentos onde somente foi avaliada a eficácia da luz LED (**G5** e **G6**) para promover a morte dos patógenos apresentaram ação antimicrobiana mínima ou ausente quando comparados às soluções salinas (controle negativo).

Adicionalmente, de acordo com os resultados obtidos nessa investigação, é possível dizer que ainda há a necessidade de muitos outros estudos para melhor estabelecer os parâmetros ideais a serem utilizados para descontaminação oral geral. É importante salientar que é muito improvável que a Terapia fotodinâmica antimicrobiana substitua a clorexidina 0,12% devido ao elevado potencial antimicrobiano desta, no entanto, conforme já reportado anteriormente, não há relatos na literatura do efeito antiviral positivo da clorexidina, o que nos permite dizer que a Terapia fotodinâmica antimicrobiana pode ser utilizada associada àquela no intuito, principalmente, de promover redução viral, fator esse que é extremamente importante quando se trata de contaminação cruzada.

Portanto, todas as medidas que possam ser tomadas para reduzir os riscos que a equipe odontológica e os pacientes apresentam de se contaminar no ambiente odontológico devem ser impostas.

Referências

Referências*

1. Al Maghlouth A, Al Youself Y, Al Bagieh N. Qualitative and quantitative analysis of bacterial aerosols. *J Contemp Dent Pract.* 2004; 5: 91-100.
2. Allison RR, Bagnato VS, Sibata CH. Future of oncologic photodynamic therapy. *Future Oncol.* 2010; 6: 929-40.
3. Antunes L M G, Bianchi M L P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. *Rev Nutr.* 2004; 17: 89–96.
4. Araújo CAC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa L.* *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 723-8.
5. Barbeau J, ten Bokum L, Gauthier C, Prevostt AP. Cross - contamination potencial of saliva ejectors used in dentistry. *J Hosp Infect.* 1998; 40: 303-11.
6. Belíssimo-Rodrigues WT, Belíssimo-Rodrigues F, Machado AA. Infection control practices among a cohort Brazilian dentists. *Int Dent J.* 2009; 59:53-8.
7. Bennett AM, Fulford MR, Walker JT, Bradshaw DJ, Martin MV, Marsh PD. Microbiol aerosols in general dental practice. *Br Dent J.* 2000; 189: 664-7.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsb/uniform_requirements.html

8. Bentley CD, Burkhart NW, Crawford JJ. Evaluating spatter and aerosol contamination during dental procedures. *J Am Dent Assoc.* 1994; 125: 1168-70.
9. Brundish DE, Love WG. Photodynamic therapy comes of age. *Drugs.* 2000; 3: 1487-508.
10. Buescher R, Yang L. Turmeric. In: Lauro GJ, Francis FJ. *Natural food colorants science and technology.* New York: Marcel Dekker; 2000. Cap.9, p. 205-26.
11. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Dent.* 1994; 22: 273-8.
12. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2003; 18: 51-8.
13. Chen D-Y, Shien J-H, Tiley L, Chiou S-S, Wang S-Y, Chang T-J, et al. Curcumin inhibits influenza virus infection and haemagglutination activity. *Food Chemistry.* 2010; 119: 1346 – 51.
14. Chignell CF, Bilski P, Reszka KJ, Motten AG, Sik RH, Dahl TA. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 295–302.

15. Chinellato LEM, Scheidt WA. Estudo e avaliação dos meios de biossegurança para o cirurgião-dentista e auxiliares contra doenças infecto-contagiosas no consultório odontológico. *Rev FOB*. 1993; 1: 59-66.
16. Cristina ML, Spagnolo AM, Sartini M, Dallera M, Ottria G, Lombardi R, et al. Evaluation of the risk of infection through exposure to aerosols and spatters in dentistry. *Am J Infect Control*. 2008; 36: 304-7.
17. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, et al. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. A randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008; 79: 1638 – 44.
18. Dahl TA, Bilski P, Reszka KJ, Chigneli CF. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem Photobiol*. 1994; 59: 290-4.
19. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*. 1989; 151: 183-5.
20. Davies GE. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); Laboratory investigation of a new antibacterial agent of a high potency. *Br J Pharmacol Chemoter*. 1954; 9: 192-6.
21. Dougherty TJ. A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute. *J Clin Laser Med Surg*. 1996; 14: 219–21.

22. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87: 895-903.
23. Downham A, Collins P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int J Food Sci Technol.* 2000; 35: 5-22.
24. Edward W, Heederik D, Duchaine C, Green BJ. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J Environ Monit.* 2012; 14: 334-39.
25. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103:1545-57.
26. Faraco FN, Moura APF. Control of the risk of transmission of infectious diseases in dental office. Part 1. *Rev Paul Odont.* 1992; 6: 14-8.
27. Feist LS, De Micheli G, Sarian R. Chlorhexidine – the pros and cons regarding to its application in periodontics. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1989; 43: 20-3.
28. Feyh J. Photodynamic treatment for cancers of the head and neck. *J Photchem Photobiol B.* 1996; 36: 175-7.
29. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod.* 2008; 34: 728-34.

30. Finley J W. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot.* 2005; 95: 1075-96.
31. Florez FLE. PDT em micro-organismos cariogênicos [tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.
32. Floyd TL. *Electric circuit fundamentals*. 2nd ed. Merrill; 1991.
33. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 782-7.
34. Fontana CR, Abernethy AD, Som S, Ruggiero K, Doucette S, Marcantonio RC, et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. *J Periodontal Res.* 2009; 44: 751- 9.
35. Gonçalves LB, Ramos AL, Gasparetto A. Avaliação do efeito da clorexidina 0,12% na redução de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimentos de profilaxia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2006; 11: 88-92.
36. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol.* 2010; 145: 477-89.

37. Goulart RC, Bolean M, Paulino T de P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: S53–S60.
38. Grenier D. Quantitative analysis of bacterial aerosols in two different dental clinic environments. *Appl and Environ Microbiol.* 1995; 61: 3165-8.
39. Hallier C, Williams DW, Potts AJC, Lewis MAO. A pilot study of bioaerosol reduction using an air cleaning system during dental procedures. *Br Dent J.* 2010; 14: 209.
40. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids. Pharmazie.* 2009; 64: 666–73.
41. Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S. The inhibition of glutathione S-transferase activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 286-95.
42. Henry BS. Natural food colours. In: Hendry GAF, Houghton JD. *Natural food colorants.* 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic; 1996. p.40-79.
43. Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem.* 2006; 98: 720-4.

44. Jin Kim H, Seung Yoo H, Chul Kim J, Su Park C, Sun Choi m, Kim M, et al. Antiviral effect of Curcuma Longa Linn extract against hepatitis B virus replication. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 124: 189-96.
45. Kosutic D, Uglesic V, Perkovic D, Persic Z, Solman L, Lupi-Ferandin S, et al. Preoperative antiseptics in clean/contaminated maxillofacial and oral surgery: prospective randomized study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38: 160-5.
46. Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and occupational lung disease. *J Aerosol Sci.* 1994; 25: 1371-404.
47. Lambrechts SA, Demidova TN, Aalders MC, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci.* 2005; 4: 503-9.
48. Leggat PA, Kedjarune U. Bacterial aerosols in the dental clinic: a review. *Int Dent J.* 2001; 51: 39-44.
49. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 547-58.
50. Mima EGO, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 392-401.
51. Mima EGO, Pavarina AC, Vargas FS, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonized with fluconazole-resistant *Candida albicans*: in vitro study. *Mycoses.* 2010; 54: 506-12.

- 52.Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, William RM. Microbiologia médica. São Paulo: Manole; 1995.
- 53.Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, et al. Curcuminoids inhibit de angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 2000; 275: 10405 – 12.
- 54.Molinari JA. Infection control. Its evolution to the current standard precautions. J Am Dent Assoc. 2003; 134: 569-74.
- 55.Nogueira DP. Doença profissional por agente biológico em dentista. Rev Saúde Publ. 1982; 16: 303 -6.
- 56.Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2011; 26: 341–8.
- 57.Priyadarsini KI. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. J Photochem Photobiol C. 2009; 10: 81–95.
- 58.Prospero E, Savini S, Annino I. Microbial aerosol contamination of dental healthcare workers' faces and other surfaces in dental practices. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: 139-41.
- 59.Rautemaa R, Nordberg A, Wuolijoki-Saaristo K, Meurman JH. Bacterial aerosols in dental practice – a potential hospital infection problem?. J Hosp Infect. 2006; 64: 76-81.

60. Resende VLS, Abreu MHG, Paiva SM, Teixeira R, Pordeus IA. Factors associated with seroprevalence of hepatitis C among dentists at a large Brazilian city. *Virology*. 2009; 6: 228.
61. Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M, et al. *In vitro* fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochem Photobiol*. 2012; 88: 613-9.
62. Runnells RR. An overview of infection control in dental. *J Prosthet Dent*. 1988; 59: 625-9.
63. Semenoff TADV, Semenoff Segundo A, Biasolli ER, Bernabé DG, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of 0,12% and 2% chlorhexidine stored at different temperatures on some microorganisms *in vitro*. *R Periodontol*. 2008; 18: 49-54.
64. Sigusch BW, Pfitzner A, Albrecht V, Glockmann E. Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J Periodontol*. 2005; 76: 1100-5.
65. Siqueira JR. Effectiveness of four chemical solution in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta percha cones. *Endod. Dent. Traumatol*. 1998; 14: 124-6.
66. Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006; 32: 979 – 84.

67. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011; 55:143-66.
68. Szymanska J. Exposure to bacterial endotoxin during conservative dental treatment. *Ann Agric Environ Med*. 2005; 12:137-9.
69. Tolstykh PI, Stranadko EF, Koraboev UM, Urinov A, Tolstykh MP, Terekhova RP, et al. Experimental study of photodynamic effect on bacterial wound microflora. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2001; 2: 85-7.
70. Tonnesen HH, de Vries H, Karlsen J, Beijersbergen van Henegouwen G. Studies on curcumin and curcuminoids. IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci* 1987; 76:371–3.
71. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 13-28.
72. Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3: 412-8.
73. Wohrle D, Hirth A, Bogdahn-Rai T, Schnurpfeil G, Shopova M. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. *Russ Chem Bull*. 1998; 47: 807 –16.
74. Wong TW, Huang HJ, Wang YF, Lee YP, Huang CC, Yu CK. Methylene blue-mediated photodynamic inactivation as a novel disinfectant of enterovirus 71. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 2176–82.

75. Yamada Junior A, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. RGO. 2004; 52: 207-10.
76. Yamamoto M, Nagano T, Okura I, Arakane K, Urano Y, Matsumoto K. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, cincopropofirin III, with low host toxicity. Biometals. 2003; 16: 591-7.
77. Zanin ICJ, Brugnera Junior A, Gonçalves RB. Application of the photodynamic therapy in bacterial decontamination. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2002; 56: 7-11.
78. Zenkner CL. Cross-infection in dentistry: risk and guidelines. Rev Endod Pesq Ensino Online. 2006; 3: 1-7.

Anexos

Anexo 1 - Certificado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo CEPFO/CAr n 68/10).



Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Prevenção da contaminação cruzada em odontologia através de terapia fotodinâmica (PDT) utilizando LED azul e curcumina – efeito antibacteriano.

Eu, _____
 __, nacionalidade, _____, estado civil, _____, Profissão,
 _____, R.G no: _____, CIC/CPF no:
 _____,
 endereço, _____
 __,

declaro que, entendi claramente os objetivos e a importância desta pesquisa que são: avaliar a efetividade da Terapia Fotodinâmica (PDT) com o uso de LED e Curcumina na redução bacteriana da cavidade oral, bem como comparar o método de descontaminação oral utilizado hoje em dia com essa nova técnica proposta.

Informo que concordei de livre e espontânea vontade, em colaborar como voluntário, autorizando a realização dos procedimentos clínicos e as documentações fotográficas necessárias.

Estou ciente que não existirá **nenhum custo financeiro** para mim ou para a equipe de pesquisadores e autorizo a divulgação dos dados resultantes e de minhas imagens para fins científicos, didáticos e de extensão (publicação de artigo em revista, apresentação em palestras, seminários, material informativo para a população, etc) tendo a garantia que minha identidade será preservada.

Sei que poderei deixar de participar desta pesquisa a qualquer momento e por qualquer razão, sem nenhum ônus ou obrigação.

Estou ciente que os procedimentos a que serei submetido são seguros e consagrados na prática da pesquisa. Caso tenha qualquer outro desconforto, ou ainda queira tirar alguma dúvida ou necessitar de algum esclarecimento, fora do horário de atendimento, estou ciente que terei total acesso a equipe de pesquisa, a qualquer momento pelo telefone (16) 81232639 ou por e-mail dr_osmir@hotmail.com .

Alem disso, estou ciente que tenho toda liberdade para consultar o Comitê de Ética em Pesquisa, para obter informação adicional ou esclarecimentos em relação a esta pesquisa pelos telefones (16)3301-6432 ou (16)3301-6434.

Desta forma, uma vez lido e entendido tais esclarecimentos, e por estar em pleno acordo com o teor do mesmo, dato e assino esse termo de consentimento livre e esclarecido

Araraquara, _____/_____/200____

(NOME DO PACIENTE/RESPONSÁVEL)

Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior

Pesquisador Responsável

*Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, (31/07/2012)
Carolina Santezi Neto*

