



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

INGRID GOMES PEREZ OCCHI

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DO
CORANTE ERITROSINA
UTILIZADO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

Maringá
2014

INGRID GOMES PEREZ OCCHI

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DO
CORANTE ERITROSINA
UTILIZADO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá-UEM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada

Orientadora: Prof^a Dr^a Mitsue Fujimaki

Maringá
2014

INGRID GOMES PEREZ OCCHI

AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DO CORANTE
ERITROSINA UTILIZADO PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá-UEM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mitsue Fujimaki

Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dr^a. Raquel Sano Suga Terada

Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dr^a. Daniele Toniolo Dias Ferreira Rosa

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Maringá, 2014.

Dedicatória

À Deus,

pela infinita bondade e misericórdia.

*Aos meus pais Wilson e Deise, à minha irmã Bárbara e ao meu namorado
Glemerson,*

pelo amor, incentivo e paciência.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois foi meu auxílio e força em todos os momentos, e por Sua permissão pude alcançar esta grande vitória. Toda honra e glória a Deus.

À minha amada Família,

*Ao meu pai **Wilson Perez Occhi,***

Antes mesmo de eu sonhar em ser mestre, o senhor já sabia que este seria meu caminho. Obrigada por sempre ter investido em minha educação, sem me cobrar nada além do meu empenho e dedicação. Se hoje eu alcancei esta vitória, não foi só por meu esforço, pois reconheço que o senhor batalhou muito para que um dia eu pudesse chegar até aqui.

*À minha mãe **Deise Gomes Occhi,***

Em todos os momentos da minha vida a senhora se fez presente, e não mediu esforços para me ver bem, ainda que isso significasse dizer um “não”. Um exemplo para mim, meu porto seguro. Feliz de quem tem uma mãe e uma amiga na mesma pessoa. Obrigada por todos os ensinamentos e correções. Dizem que ninguém nasce sabendo ser mãe, mas se um dia Deus achar graça e me fizer ser mãe, desejo ser como a senhora.

*À minha irmã **Bárbara Gomes Perez Occhi,***

Mesmo que eu não demonstre constantemente o amor que tenho por você, eu sou grata a Deus por ter escolhido você para ser minha irmã. Com você eu dividi os melhores momentos da minha vida, e também os piores. Este não é diferente. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Ainda que a distância possa um dia nos separar, sei que ela jamais será suficiente para romper os laços que nos unem. Eu te amo, e sempre estarei contigo.

*Ao meu namorado **Glemerson Alexandre,***

Ao cruzar nossos caminhos Deus já conhecia todas as coisas. Hoje sou uma pessoa mais feliz por ter você ao meu lado. Desejo que esta seja apenas a primeira vitória que compartilho contigo. Obrigada por abrir meus olhos e me incentivar sempre a ser uma pessoa melhor.

*Aos primos **Lineu Occhi, Glaciany Garcia Occhi, Laiany Garcia Occhi, Luany Garcia Occhi e Luan Garcia Occhi,***

Enquanto estive longe da minha família foram vocês que com muito amor me acolheram. Sou grata por todo o carinho e cuidado que dispensaram a mim. Que Deus retribua a vocês todo este amor.

Aos meus amigos,

*À amiga **Ana Laura dos Santos,***

Quando dividimos o mesmo espaço (e que espaço) com uma pessoa a amizade acaba sendo colocada a prova todos os dias. Mesmo com nossas diferenças sei que nossa amizade é verdadeira. Agradeço sua paciência e companheirismo, foi bom poder contar contigo para dividir minhas preocupações e alegrias.

*Às amigas **Giuliana Gonzales, Carolina Leite Guimarães, Bruna de Rezende Marins, Vanessa Satiko Yamashita, Denise Tiemi Uchida, Karina Cainé, Tháisa Nogueira Palozzi Farias,***

Minhas amigas do tempo do colégio. Jamais me esquecerei de vocês. O tempo e a distância não foi capaz de diminuir o carinho que sinto. Ainda que o contato tenha se perdido entre algumas de nós, sou muito grata a todas, pois colaboraram para que hoje eu chegasse até aqui. O mestrado é apenas mais um passo desta caminhada, e há algum tempo atrás eram vocês que caminhavam ao meu lado.

*Aos amigos **Adalberto Alferes de Souza e Daniel Poletto,***

Durante a graduação sempre estiveram ao meu lado, me ajudando, aprendendo e ensinando. Sinto muita saudade daquele tempo. Obrigada por terem contribuído com o meu crescimento profissional, e muito mais pela amizade que construímos ao longo desses anos.

*Às irmãs do mestrado **Mariele Andrade do Nascimento e Tallita Foglietto da Silva,***

Com toda certeza vocês são pessoas que quero levar comigo para toda a vida. Obrigada pelos bons momentos que passei com vocês, alguns eu diria inesquecíveis. Uma sempre ajudando a outra, seja com uma palavra amiga ou na correção de um trabalho, não importa, mas desejo que seja sempre assim. Muito sucesso a cada uma de vocês, pois são mais que merecedoras!

Aos amigos de trabalho,

À minha turma do mestrado, Alessandro Gavazzoni, Aline Gabriela Candido, André Barbisan de Souza, Daniele Esteves Pepelascov, Joana Yumi Teruya Uchimura, Larissa Cristina de Oliveira Ferraz, Mônica Yuri Orita Misawa, Paula Morigi Granero, Vitor Marques Sapata

Foi muito bom crescer academicamente com vocês. Agradeço por compartilharem seus conhecimentos e desejo a todos muito sucesso.

À Lidiane Viziolo de Castro e Ana Cláudia Nogueira,

Nunca imaginei que acabaria aprendendo alguma coisa sobre física. Vocês tornaram minha experiência com a física mais simples e agradável. Agradeço vocês por fazerem todas as horas que ficamos juntas esperando as leituras do experimento mais divertidas. O assunto nunca faltava, fosse ele sério ou apenas para descontrair. Obrigada pela ajuda, respeito e paciência.

À Diogo Pelloso, Lísia Nishimori Tomita, Tânia Harumi Uchida e Raquel Fernanda Isis Mincoff,

Obrigada por terem me ajudado a enfrentar e superar os desafios que encontrei nesta caminhada, e por terem me ensinado tanto.

Aos amigos dos laboratórios de farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Livia Galvão, Eliane Melo, Bruna Benso, Talita Graziano, Irlan Almeida, Luiz Eduardo Ferreira,

Todos vocês de alguma forma me ajudaram no tempo que passei em Piracicaba, tornando minha estadia mais tranquila e agradável. Fiquei muito feliz por ter tido a chance de viver esta experiência durante meu mestrado, e por ver que pessoas boas existem e estão por toda a parte. Obrigada e muito sucesso a todos, foi uma experiência ímpar!

Aos mestres,

*À minha orientadora **Prof^a Dr^a Mitsue Fujimaki,***

Deus conhece todas as coisas, e creio que tudo que Ele faz é de maneira perfeita. Eu me sinto privilegiada por ter sido orientada pela senhora. Muito além dos conhecimentos científicos, sempre estive preocupada em transmitir também conhecimentos que contribuíram com meu crescimento pessoal. Tudo faz parte de um processo, e hoje graças aos seus conselhos, sempre repassados com muita paciência, eu posso notar o quanto cresci nestes dois anos. Muito obrigada por tudo!

*Às professoras **Dr^a Raquel Sano Suga Terada,** e **Dr^a Renata Corrêa Pascotto,***

Por toda a colaboração e conhecimentos repassados a mim durante esses dois anos de mestrado, e de reuniões do grupo de pesquisa, sou imensamente grata.

*Aos professores **Dr Mauro Luciano Baesso,** **Dr^a Franciele Sato,** **Dr Pedro Luis Rosalen,** e **Dr^a Isolde Previdelli,***

Todas as diferentes áreas do conhecimento caminham juntas, e poder trabalhar integrando diferentes áreas me fez crescer demais. Sempre prontos a ajudar, independente da vida atarefada que levam. Sou muito grata a vocês por tudo!

*À professora **Dr^a. Daniele Toniolo Dias Ferreira Rosa,***

Pela disponibilidade, interesse, compreensão e contribuições para a finalização deste trabalho. Muito obrigada.

*Ao meu querido professor de graduação **Fábio Mitugui Nishi,***

Com muita paciência foi meu mestre durante a graduação, me ensinando com amor a Odontologia, e sempre me incentivando a trilhar a busca pela carreira acadêmica. Obrigada por sempre ter acreditado no meu potencial.

Agradecimentos institucionais,

*Ao **Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá,** e todos seus funcionários e alunos, pela participação no meu crescimento científico, profissional e pessoal.*

*À **CAPES,** pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*À **todos** aqueles que de alguma forma merecem a minha gratidão, Não sou capaz de me lembrar de maneira justa de todos aqueles que estenderam sua mão de alguma forma, ou que até mesmo sem querer acabaram me ajudando. Peço a Deus, conhecedor de tudo, que retribua a todos.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	
2.1. CÁRIE DENTAL.....	17
2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA.....	18
2.2.1. FONTES DE LUZ.....	19
2.2.2. FOTOSSENSIBILIZADORES.....	20
2.3. ERITROSINA.....	20
2.4. PERMEABILIDADE DENTINÁRIA.....	20
2.5. ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	21
2.6. CÁRIE <i>IN VITRO</i> – ESTERILIZAÇÃO DOS BLOCOS DE DENTINA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
4. METODOLOGIA	
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.2. CONSIDERAÇÕES LEGAIS E ÉTICAS.....	25
4.3. MATERIAIS	
4.3.1. FOTOSSENSIBILIZADOR.....	25
4.3.2. PREPARO DOS BLOCOS DE DENTE.....	26
4.4. INDUÇÃO DE CÁRIE <i>IN VITRO</i>	27
4.5. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DOS CORANTES PELA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA (PAS).....	28
4.6. ESTUDOS PILOTOS	
4.6.1. ESTUDO PILOTO 1 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE ERITROSINA EM DENTINA BOVINA (n=20).....	30
4.6.2. ESTUDO PILOTO 2 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA DENTINA HIDRATADA E DESIDRATADA E REMOÇÃO DA “SMEAR LAYER” (n=6).....	31
4.6.3. ESTUDO PILOTO 3 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE EM DIFERENTES TEMPOS DE APLICAÇÃO DE ERITROSINA A	

5% (n=6).....	33
4.6.4. ESTUDO PILOTO 4 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA ILUMINAÇÃO COM LÂMPADA DE XENÔNIO EM BLOCOS DE DENTINA POR 10, 15 E 30 MINUTOS (n=4).....	34
4.6.5. ESTUDO PILOTO 5 – AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DO RAIOS ULTRA-VIOLETA DO FLUXO LAMINAR EM BLOCOS DE DENTINA POR 15 MINUTOS (n=10)...	35
4.7. EXPERIMENTOS	
4.7.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PERDA EM ESPESSURA E DA PERMEABILIDADE DE ERITROSINA A 5% EM DENTES CARIADOS DURANTE 5, 7 E 10 DIAS (n=9).....	35
4.7.2. EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE ERITROSINA A 0,3 E 5% EM DENTINA HÍGIDA E DENTINA APÓS FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. mutans</i> UA159 POR 5 DIAS (n=22).....	36
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS	
5.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PERDA EM ESPESSURA E DA PERMEABILIDADE DE ERITROSINA A 5% EM DENTES CARIADOS DURANTE 5, 7 E 10 DIAS (n=9).....	38
5.2. EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DE ERITROSINA A 0,3 E 5% EM DENTINA HÍGIDA E DENTINA APÓS FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. mutans</i> UA159 POR 5 DIAS (n=22).....	39
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS.....	48
9. ANEXOS	

9.1. ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	53
9.2. ANEXO 2 – PROTOCOLO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	55
9.3. ANEXO 3 – GRÁFICOS DO ESTUDO PILOTO 2.....	58
9.4. ANEXO 4 – GRÁFICOS DO ESTUDO PILOTO 3.....	61
9.5. ANEXO 5 – GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 1.....	64
9.6. ANEXO 6 – GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 2.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da célula fotoacústica.

Figura 2. Espectrômetro Fotoacústico.

Figura 3. Estrutura química da eritrosina.

Figura 4. Espectros de absorção da eritrosina a 5% (vermelho) e eritrosina a 0,3% (azul).

Figura 5. Molar hígido com rizogênese incompleta.

Figura 6. Dente incluído em resina acrílica no momento do corte.

Figura 7. Micrômetro digital usado para verificar as espessuras (Mitutoyo®).

Figura 8. Placa de 96 poços de fundo côncavo.

Figura 9. Expressão utilizada para calcular o comprimento de difusão térmica (μ_s).

Figura 10. Profundidade de leitura a amostra para cada frequência da luz modulada.

Figura 11. Microscópio digital.

Figura 12. Permeação do esmalte de unha vermelho através do bloco de dentina bovina.

Figura 13. Esquema de distribuição da amostra do estudo piloto 2.

Figura 14. Evolução dos sinais fotoacústicos em função da variação de frequência do modulador para verificação da permeação de eritrosina a 0,3 % em um bloco de dentina hidratado (úmido) e outro desidratado (seco).

Figura 15. Esquema de distribuição da amostra do estudo piloto 3.

Figura 16. Tubos avaliados após o período de 72h em estufa a 37° C.

Figura 17. Esquema de distribuição da amostra do experimento 2.

Figura 18. Espectro obtido por meio de FT-RAMAM.

Figura 19. Profundidade de permeação da eritrosina a 5% nos diferentes tempos de indução de cárie (C=controle; T5=5 dias; T7=7 dias; T10=10 dias).

Figura 20. Profundidade de permeação da eritrosina em dentina hígida (S) e dentina cariada (C).

Figura 21. Profundidade de permeação da eritrosina a 0,3% (T1) e a 5 % (T2).

Figura 22. Avaliação de superfície no microscópio eletrônico de varredura (MEV). (A) Superfície pulpar do bloco de dentina sem indução de cárie, em aumento de 200x. (B) Superfície pulpar do bloco de dentina submetido à indução de cárie, em aumento de 200x.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Profundidade de permeação do corante eritrosina (0,3 e 5 %) em blocos de dentina humana hidratados ou desidratados. Alguns blocos passaram pelo processo de remoção de "smear layer" com ácido fosfórico a 37%.

Tabela 2. Profundidade de permeação (μm) da eritrosina 5% em dentina com 1 e 5 minutos de aplicação.

Tabela 3. Efeito antimicrobiano do raio ultra-violeta do fluxo laminar em blocos de dentina por 15 minutos após os períodos de 24, 48 e 72h.

Tabela 4. Perda de espessura dos nos diferentes períodos de formação de biofilme e profundidade de permeação da eritrosina a 5%.

Tabela 5. Permeação do corante eritrosina nas concentrações de 0,3 e 5% em dentina hígida e cariada.

Tabela 6. Mediana de permeação (μm) e amplitude interquartílica dos diferentes grupos.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento que utiliza um corante não tóxico (fotossensibilizador) e uma fonte de luz adequada, que na presença de oxigênio, associam-se para produzir agentes citotóxicos. A TFD tem efeito tópico e por isso é muito importante conhecer a capacidade que o fotossensibilizador possui de permear os tecidos para que as bactérias sejam alcançadas e inativadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a profundidade de permeação da eritrosina em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica, comparando: (a) a profundidade de permeação da eritrosina em duas concentrações diferentes (0,3% e 5%); (b) a profundidade de permeação da eritrosina em dentina hígida e dentina cariada *in vitro*; (c) a profundidade de permeação da eritrosina a 5% em dentina com indução de cárie durante diferentes períodos (5, 7 e 10 dias). Após aprovação pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP - da Universidade Estadual de Maringá – UEM (CAAE 14398113.2.0000.0104), foram selecionados apenas terceiros molares com rizogênese incompleta. Os dentes foram seccionados em blocos de dentina com aproximadamente 1 mm de espessura, os quais foram submetidos ao processo de indução de cárie *in vitro* por formação de biofilme de *S. mutans UA159* durante 5 dias, de forma que metade do mesmo dente permaneceu hígida para ser avaliada como controle. Após a aplicação da eritrosina (0,3 ou 5 %) pela face oclusal, a avaliação da permeação do corante foi realizada pela técnica de espectroscopia fotoacústica. A eritrosina a 5 % foi detectada a uma profundidade média maior (710um) que a eritrosina a 0,3 % (151um) e não houve diferença quando comparamos a dentina cariada com a hígida. Com relação aos diferentes intervalos de tempo de formação de biofilme, a eritrosina a 5% seguiu um padrão de permeação semelhante para todos os períodos de tempo avaliados, assim como no grupo controle. Conclui-se que a eritrosina parece ser um fotossensibilizador promissor para a aplicação na TFD em lesões de cárie, pois demonstrou ter potencial de permeação, atingindo uma profundidade suficiente para alcançar os microrganismos, tornando assim possível sua inativação. Os resultados sugerem que a concentração e volume da eritrosina podem influenciar na sua permeação em dentina humana. Entretanto, a dentina cariada apresentou padrões de permeação semelhantes à dentina hígida, sugerindo que não houve alteração na rota de permeação do corante na dentina.

Palavras chaves: Terapia Fotodinâmica; Eritrosina; Espectroscopia Fotoacústica

ABSTRACT

The photodynamic therapy (PDT) is a treatment which uses a non-toxic dye (photosensitizer) and a suitable light source, and with the oxygen presence they combine to produce cytotoxic agents. The PDT has topical effect, so it is important to know the capacity that photosensitizer has to permeate the tissues so that the bacteria can be reached and inactivated. This study aimed to evaluate the penetration depth of erythrosine in dentin by the technique of photoacoustic spectroscopy by comparing: (a) the permeation depth of erythrosine in two different concentrations (0.3 % and 5 %), (b) the permeation depth of erythrosine in dentin with and without caries-like lesions artificially developed by biofilm formation with *S. mutans* UA159 for 5 days; (c) and the permeation depth of erythrosine in dentin with caries-like lesions artificially developed by different periods of biofilm formation (5, 7 and 10 days). After the Standing Committee on Ethics in Research Involving Humans - COPEP - the State University of Maringá - UEM approval (CAAE 14398113.2.0000.0104), we selected only third molars with incomplete root formation. The teeth were sectioned into dentin blocks with approximately 1 mm thick, which were submitted to the in vitro caries induction model with *S. mutans* UA159 biofilm formation for 5 days, and the other half of the same tooth was held to be evaluated as the sound group. After the erythrosine (0.3 or 5 %) application on the occlusal surface, the evaluation of the dye permeation was performed by photoacoustic spectroscopy. The erythrosine at 5 % could be detected in a greater average depth (710um) than the erythrosine at 0.3 % (151um), and there was no significant difference between caries-like and the control group. With respect to the different time intervals of biofilm formation , the erythrosine at 5 % followed a higher permeation standard for all the evaluated periods, as well as in the control group. We conclude that erythrosine seems to be promising photosensitizer for application in photodynamic therapy caries. It shown to have a high permeation potential, reaching a sufficient depth to reach the microorganisms, thus making possible its inactivation. The results suggest that the concentration and volume of erythrosine may influence its permeation in dentin. However, the decayed dentine showed similar patterns of healthy dentin, suggesting no change in the permeation of the dye into the dentin route.

Key-words: Photodynamic Therapy; Erythrosin; Photoacoustic Spectroscopy

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é ainda um grande problema de saúde pública na maioria dos países industrializados, afetando mais de 50% das crianças, aproximadamente 80% dos adolescentes (MOURADIAN; WERH; CRALL, 2000) e quase 100% da população adulta (PETERSEN et al., 2005). O tratamento clássico para as lesões cariosas envolve a remoção do tecido cariado e posterior preenchimento com material adequado, o qual, durante um longo período de tempo a partir do início do século XX, tem sido encarado como a solução para as cavitações pelos cirurgiões-dentistas (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Mais recentemente, uma visão atual que rege a Dentística Contemporânea com procedimentos de mínima intervenção e máxima conservação tem sido desenvolvida, por meio da realização de micro-restaurações com o uso de sistemas adesivos e de preparos conservadores com remoção mínima do tecido cariado (GRANVILLE-GARCIA et al., 2009). Estes procedimentos conservadores justificam-se, pois nenhum material restaurador substitui o tecido dentário, não havendo necessidade de realizar remoção de tecido sadio com finalidade de prevenir outras cáries no mesmo dente, também denominada extensão preventiva (PORTO; PEREIRA; NETTO, 2008). Dentro do contexto de procedimentos conservadores, há também as situações de lesões profundas, em que se realiza a remoção parcial do tecido cariado, envolvendo apenas a dentina superficial infectada e posterior selamento da cavidade. Este método tem sido defendido uma vez que bactérias cariogênicas isoladas de sua fonte nutritiva por uma restauração com suficiente integridade morrem ou permanecem em um estado quiescente, não constituindo risco à saúde dentária (RICKETTS et al., 2006; THOMPSON et al., 2008). Entretanto, ainda existem controvérsias quanto à manutenção dessa dentina afetada e contaminada por bactérias, assim como a própria resistência por parte dos profissionais em manter essa camada na tentativa de conservação (KIDD, 2004; THOMPSON et al., 2008).

Neste contexto de novas terapias com abordagem minimamente invasiva, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como possível coadjuvante, uma vez que tem mostrado eficácia contra microrganismos envolvidos no processo da cárie dentária (BAPTISTA, 2009; MAISCH et al., 2009; LIMA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009; BOLEAN et al., 2010), além de proporcionar vantagens como rápida morte da célula bacteriana (ZANIN et al., 2003). Esta modalidade de terapia emprega a combinação de luz visível em comprimento de onda adequado, um corante, chamado de fotossensibilizador e oxigênio molecular geralmente presente nos tecidos (PAULINO et al., 2005). A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotossensibilizador) e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células (MACHADO, 2000). Considerando o potencial antimicrobiano da TFD e a possibilidade de inativação das bactérias da dentina cariada, o emprego de materiais presentes na rotina

odontológica pode ser uma estratégia simples, viável, de baixo custo e promissora para a máxima conservação de estrutura dentária, diminuindo a destruição do dente e até mesmo podendo evitar o tratamento endodôntico. Entretanto, é importante saber a profundidade de permeação do fotossensibilizador e da luz utilizada na TFD para garantir que eles atinjam a extensão total do tecido cariado para promover o efeito terapêutico desejado (NOGUEIRA et al., 2013). Sabendo que a profundidade máxima em que se encontra *Streptococcus* em dentina é cerca de 200 μm (LOVE; MCMILLAN; JENKINSON, 1997), e considerando o efeito tóxico da TFD, é importante que o fotossensibilizador permeie pelo menos 200 μm na dentina para atingir e inativar as bactérias causadoras da doença cárie.

Diversos fotossensibilizadores e fontes de luz têm sido estudados em termos de capacidade antimicrobiana (WILSON; BURNS; PRARTEN, 1996; WILLIAMS et al., 2003; PAULINO et al., 2005; ZANIN et al., 2006; BEVILACQUA et al., 2007; GIUSTI et al., 2008; MAISCH et al., 2009; LIMA et al., 2009; BOLEAN et al., 2010), entretanto, a eritrosina tem apresentado resultados *in vitro* promissores, como bom rendimento quântico de oxigênio singlete quando sensibilizado pela luz halógena (NAGATA et al., 2012) e atividade antimicrobiana contra microrganismos G-positivos e G-negativos (WOOD et al., 2006). Além disso, a eritrosina apresentou uma profundidade de permeação em dentina hígida entre 600 e 850 μm (NAGATA et al., 2012). Estudos recentes investigaram a permeabilidade dentinária de fotossensibilizadores (NOGUEIRA et al., 2013; MELO et al., 2013). Os corantes verde malaquita, azul de metileno e azul de orto-toluidina, em concentração de 0,01%, têm a capacidade de permear aproximadamente 90 μm em dentina hígida, com tempo de aplicação de 1 minuto (NOGUEIRA et al., 2013). Já em condições de dentina cariada, tanto *in situ* quanto *in vitro*, o corante azul de orto toluidina a 0,01 % aplicado por 5 minutos apresentou taxa de permeação próxima de 50 μm , sendo que o nível de desmineralização da dentina não influenciou nos resultados (MELO et al., 2013). Entretanto, pouco se conhece sobre a permeação dentinária da eritrosina em situações que simulam condições clínicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cárie Dental

A cárie dental é uma doença infecciosa crônica multifatorial modulada por fatores comportamentais e de etiologia microbiana fortemente influenciada pelos carboidratos da dieta e pela ação dos componentes salivares (VIEIRA, 2012; PORTO; PEREIRA; NETTO, 2008). Esta doença determina, inicialmente, uma dissolução localizada dos componentes inorgânicos dos dentes, devido aos ácidos orgânicos provenientes do metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis da dieta. Com a progressão do processo, ocorre a dissolução dos minerais da dentina e desnaturação do colágeno (PORTO; PEREIRA; NETTO, 2008). Não é considerada uma doença transmissível, pois embora ocorra a transmissão vertical de microrganismos associados à ocorrência da doença por parte de pais e cuidadores de crianças, isto não ocorre a partir do ponto de vista da população (FRAZÃO, 2012).

A partir do século XIX, com o advento da Revolução Industrial, a disposição e consumo de sacarose aumentaram, corroborando assim com o aumento na incidência e prevalência da doença cárie, tornando-se em meados do século XX a situação mais severa já observada da doença na Europa (PORTO; PEREIRA; NETTO, 2008). Apesar de ser uma doença que pode ser facilmente prevenida, a cárie dentária continua sendo um grande problema de saúde pública na maioria dos países industrializados (BÖNECKER et al., 2012), afetando 60-90% das crianças em idade escolar e a grande maioria dos adultos. É também a doença bucal mais prevalente em vários países asiáticos e latino-americanos. Embora, de momento, parece ser menos comum e menos grave na maior parte da África, a previsão é de que, à luz da evolução das condições de vida e os hábitos alimentares, a incidência de cárie dentária aumentará em muitos dos países em desenvolvimento. As principais razões para este aumento são a exposição inadequada de fluoretos e o aumento do consumo de açúcar (PETERSEN; LENNON, 2004).

A prevalência no Brasil passou de moderada a baixa, todavia ainda que a redução no desenvolvimento e progressão da doença tenha alcançado uma grande parte da população, os indivíduos com fatores de risco extremos não foram beneficiados. Apesar das diferenças na prevalência de cárie para as diferentes populações socioeconômicas, ambos experimentaram declínio de cárie significativo. Isso demonstra que os fatores que influenciam o declínio alcançou a população brasileira em uma base ampla. Considerando o tamanho do Brasil e as poucas medidas preventivas que atingiram todo o país, foram identificadas três razões principais para explicar a redução da cárie: a) a fluoretação da água, b) uso generalizado de dentífrícios fluoretados, c) ampliação de programas preventivos em escolas (CURY et al., 2004).

O tratamento desta doença consiste na remoção dos agentes etiológicos, por meio da instrução de higiene oral e de uma dieta saudável (com baixa ingestão de açúcares), além da remoção dos sintomas da doença, como dor e

cavidades nos dentes. Em um estágio avançado, o biofilme fica retido em cavidades resultantes do processo de desmineralização dos tecidos dentais, e torna-se difícil a remoção apenas com a escovação. Para que se possa restaurar a integridade do dente, de modo que o paciente possa limpar eficazmente é necessário fazer a remoção do tecido infectado. A discussão a respeito de quanto tecido deve ser removido, a fim de deter o processo de cárie não é nova, entretanto não há nenhuma evidência clara de que é deletério deixar dentina infectada, mesmo que seja macia e molhada, antes do selamento da cavidade (KIDD, 2004).

Alguns autores têm estudado a associação de antibióticos com materiais de selamento usados em cavidades com dentina infectada remanescente (FERREIRA et al., 2013), no entanto, sabemos que os microrganismos tendem a se tornarem resistentes a essas substâncias e conseqüentemente os antibióticos tornam-se ineficazes e, além disso, fortalecem os microrganismos (FU; FANG; YAO, 2013). Embora muitos pesquisadores estudem técnicas minimamente invasivas, em um estudo realizado em 2013 para investigar as atitudes e comportamento dos dentistas do norte da Alemanha, observou-se que a maioria dos cirurgiões-dentistas entrevistados utilizam a técnica de remoção total do tecido cariado, não sendo portanto adeptos das técnicas minimamente invasivas (SCHWENDICKE et al., 2013).

A abordagem cautelosa pode ser preferível à escavação vigorosa porque menos polpas serão expostas e ao selar a dentina do meio bucal ocorrerá a interrupção na progressão da lesão. Os processos de reparação de esclerose tubular e dentina terciária são encorajados, reduzindo, assim, a permeabilidade da dentina remanescente. Os microrganismos residuais estarão em um ambiente muito diferente, sepultados pelo selo da restauração em um lado e pela reduzida permeabilidade da dentina remanescente por outro lado (KIDD, 2004).

Neste contexto de mínima intervenção, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido bastante estudada. Consiste em uma técnica baseada na intervenção mínima com ação seletiva, removendo apenas tecido cariado necrosado (dentina infectada), preservando a estrutura dentária sadia (dentina afetada), e está de acordo com os mesmos princípios biológicos de remoção parcial de tecido cariado em que se respaldam outras técnicas de comprovada efetividade (AMMARI; MOLITERNO, 2005).

2.2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento médico que utiliza luz visível em um comprimento de onda adequado para ativar um agente de fotossensibilização (fotossensibilizador) na presença de oxigênio molecular. A exposição do fotossensibilizador a luz resulta na formação de espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete, que são capazes de induzir a inativação de células (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007; PAULINO et al., 2005;

MACHADO, 2000; WILSON; BURNS; PRARTEN, 1996; NAGATA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2013).

Esta reação decorrente da excitação eletrônica do corante pela luz pode ocorrer por dois mecanismos diferentes: (Mecanismo tipo I) transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental e resultar em produtos oxidados ou da (Mecanismo tipo II) transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico (MACHADO, 2000). Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente.

Atualmente, a TFD tem sido aplicada principalmente para o tratamento de degeneração macular, miopia patológica, câncer de esôfago, pulmão e de pele, e no tratamento de lesões pré-cancerosas em pacientes com esôfago de Barret (NAGATA, 2012). Porém este tratamento tem despertado grande interesse dos pesquisadores, uma vez que tem mostrado eficácia contra microrganismos envolvidos no processo da cárie dentária (BAPTISTA, 2009; MAISCH et al., 2009; LIMA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2009; BOLEAN et al., 2010), além de proporcionar vantagens como rápida morte da célula bacteriana (ZANIN et al., 2003).

2.2.1. Fontes de luz

O requisito básico para uma fonte de luz eficiente na TFD é que ela alcance o espectro de ativação (espectro de absorção eletrônica) do fotossensibilizador (geralmente o pico mais longo do comprimento de onda) e que neste comprimento de onda sua potência de luz seja suficiente (WILSON; PATTERSON, 2008). Desta forma, o fotossensibilizador deve ter a absorvância máxima conseguida por uma fonte de luz adequada e complementar; por exemplo, um fotossensibilizador azul deve ser irradiado por uma luz vermelha, a qual é absorvida mais, e ambas são cores complementares (NAGATA et al., 2012).

Na literatura encontram-se três classes principais de fontes de luz empregadas na TFD: Laser, diodo emissor de luz (em inglês, LED) e lâmpada halógena. O laser apresenta algumas vantagens, como o monocromatismo e sua alta eficiência (>90%) de acoplamento em fibras ópticas individuais; no entanto, possui um custo elevado (NAGATA et al., 2012) e também pode causar a desnaturação térmica excessiva durante a irradiação, na forma de carbonização, coagulação e de fusão nas estruturas dos dentes, dos tecidos periodontais e da polpa (CHUI et al., 2013). O diodo emissor de luz apresenta o menor custo entre os sistemas de laser. É muito conveniente e confiável, no entanto, ele tem um único comprimento de onda e requer uma unidade separada para cada fotossensibilizador devido aos diferentes comprimentos de onda de absorção. A luz halógena apresenta a vantagem de poder ter seu espectro de emissão filtrado, podendo assim combinar com qualquer

fotossensibilizador e possuir um baixo custo, no entanto, ela não pode ser eficientemente acoplada em feixes de fibra óptica, e também pode causar aquecimento (NAGATA et al., 2012; WILSON; PATTERSON, 2008).

Muitos estudos lançam mão da luz vermelha (laser ou LED), combinados com fotossensibilizadores de cor azul, como Azul de Metileno e Azul de Orto-toluidina, e apresentam bons resultados. Já o uso da luz azul ainda é pouco estudado e difundido (NAGATA et al., 2012). Entretanto, considerando a propriedade do comprimento de onda, a luz azul seria mais promissora como fonte de luz na TFD do que a luz vermelha, pois a luz azul apresenta um efeito antimicrobiano (CHUI et al., 2013).

2.2.2. Fotossensibilizadores

As características ideais de um fotossensibilizador promissor para a TFD são a estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico às células normais. Alguns dos fotossensibilizadores estudados mais comuns são o azul de metileno, azul de orto-toluidina, verde malaquita, porém poucos artigos investigam o uso dos fotossensibilizadores vermelhos que já fazem parte da rotina odontológica, como a eritrosina (NAGATA, 2012).

2.3. Eritrosina

A eritrosina tem apresentado resultados *in vitro* promissores, como bom rendimento quântico de oxigênio singlete quando sensibilizado pela luz halógena (NAGATA et al., 2012; PELLOSI et al., 2013) e atividade antimicrobiana contra microrganismos G-positivos e G-negativos (WOOD et al., 2006). Além disso, a eritrosina apresentou uma profundidade de permeação em dentina hígida entre 600 e 850 μm (NAGATA et al., 2012). Outra vantagem deste corante sobre os demais fotossensibilizadores é que os dentistas já usam a eritrosina na sua rotina clínica para corar e visualizar a placa dental na forma de solução ou comprimidos, provando que esta tem plena aceitação para uso na boca (WOOD et al., 2006).

2.4. Permeabilidade Dentinária

A permeabilidade dentinária é determinada, em parte, pela natureza da superfície da dentina (PASHLEY; LIVINGSTON, 1978). A resistência à difusão de fluídos através da dentina é dependente da presença ou ausência de tecido pulpar e da presença ou ausência de fragmentos na superfície. Essa resistência é diminuída quando os dentes são armazenados por uma semana, e uma possível explicação para este aumento da taxa de permeação pode ser que os odontoblastos, considerados como agentes que causam a resistência intratubular, provavelmente se desintegram lentamente neste período, reduzindo assim a resistência a permeação de fluídos (PASHLEY; LIVINGSTON; GREENHILL, 1978).

É importante conhecer a capacidade de permeação do agente fotossensibilizador e da luz utilizada na TFD para garantir que eles atinjam a extensão total do tecido cariado, promovendo assim o efeito terapêutico desejado (NOGUEIRA et al., 2013).

Para o estudo do desenvolvimento da cárie dentária, muitos modelos têm preconizado a utilização de dentes bovinos, já que são facilmente obtidos em larga escala e com uma composição mais uniforme do que a dos dentes humanos. Além disso, a superfície plana do dente bovino é relativamente maior e não apresenta lesões de cárie ou outros defeitos (YASSEN; PLATT; HARA, 2011).

Estudos recentes investigam a permeabilidade em dentina humana de fotossensibilizadores (NOGUEIRA et al., 2013; MELO et al., 2013). Os corantes verde malaquita, azul de metileno e azul de orto-toluidina, em concentração de 1%, têm a capacidade de permear aproximadamente 90 μm , com tempo de aplicação de 1 minuto (NOGUEIRA et al., 2013). Em condições de dentina cariada, tanto *in situ* quanto *in vitro*, o corante azul de orto toluidina a 0,1 % aplicado por 5 minutos apresentou taxa de permeação próxima de 50 μm e o nível de desmineralização não influenciou nos resultados (MELO et al., 2013).

2.5. Espectroscopia Fotoacústica (ASTRATH, 2011)

Esta técnica consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observada quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás (podendo ser o próprio ar), acoplada a um microfone. A luz é absorvida e transformada em energia térmica por um processo de relaxação não radioativa. O aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com a mesma. Essa variação de pressão do gás é detectada pelo microfone que resulta no Sinal Fotoacústico, e a intensidade do sinal gerado dependerá da frequência de modulação da luz incidente. A configuração da célula fotoacústica (figura 1) consiste de uma amostra colocada dentro de uma célula, a uma distância da janela de vedação transparente, em contato de um lado pelo gás (ar) e do outro pelo suporte metálico, considerando que nem o ar nem o suporte absorvem a radiação incidente. Um microfone capacitivo é acoplado na parede lateral da célula em contato com o gás, o qual capta as variações de pressão do ar.

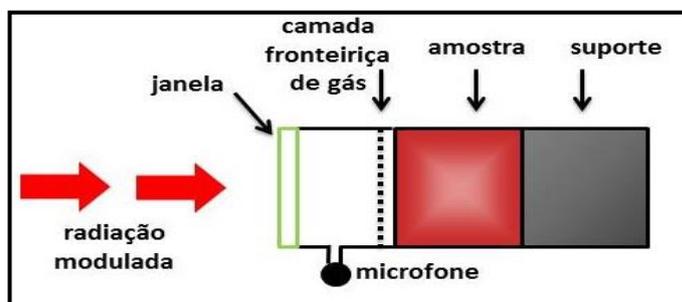


Figura 1. Representação da célula fotoacústica.

A fração de luz, incidente na amostra, que for absorvida pelas moléculas pode ser convertida em calor. Este calor gerado pode chegar até a superfície da amostra e contribuir para o sinal fotoacústico, dependendo da profundidade do ponto de geração que é definido como a frequência de modulação da luz utilizada. Com esta técnica, pode-se realizar separação espectral das contribuições dos diferentes constituintes das formulações que contribuírem para a absorção óptica descrita pelo espectro total do sistema. Além disso, o método é não destrutivo, porque permite que a amostra testada possa ser reutilizada para outros ensaios, quando não oxidada pela luz incidente.

No arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para a realização dos experimentos (figura 2), a fonte de luz é uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel®, modelo 68820), com potência de 1000 W, e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. O monocromador (Oriel®, modelo 77250 (1/8 m) pode ter suas fendas de entrada e saída ajustadas em 3,16 mm ou 1,56 mm. A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico, (Stanford Research Systems®, modelo SR 540) que, com um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador Lock-in (EG & G Instruments®, modelo 5110). Antes de passar pelo modulador de frequência, o feixe de luz passa ainda por filtros de banda larga para que sejam eliminadas ordens superiores de difração. As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja excitada na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A luz atinge o interior da célula fotoacústica após ser transmitida através de uma janela de quartzo, já que este material é transparente na região espectral de emissão da lâmpada. O microfone acoplado à célula fotoacústica (Brüel & Kjaer®, modelo BK 2669) está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sincronizado), que fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB.

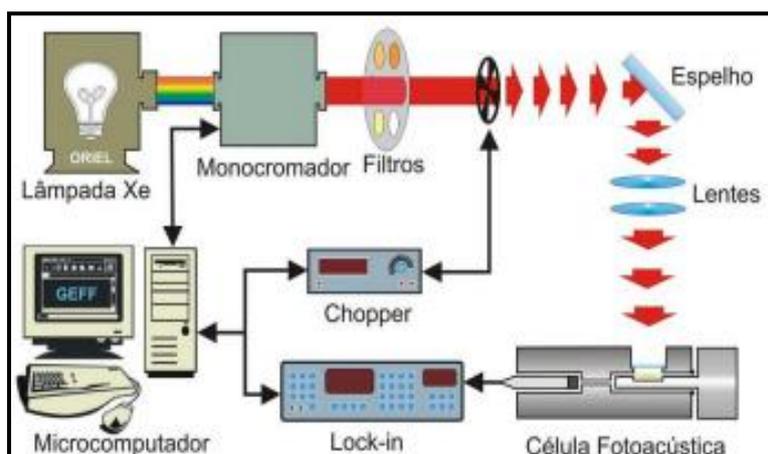


Figura 2. Espectrômetro Fotoacústico

Esse instrumento mede sinais da ordem de alguns nanovolts até um volt. Os sinais são obtidos em quadratura, de maneira que se obtém tanto a intensidade quanto a fase do sinal fotoacústico.

A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz é obtida a partir do sistema de aquisição de dados via interface GPIB em um microcomputador. Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal é então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

2.6. Cárie in vitro - Esterilização dos blocos de dentina

Para que a amostra de blocos de dentina possa ser submetida ao desafio cariogênico garantindo a especificidade dos microrganismos inoculados (CARVALHO et al., 2009) e evitando a infecção cruzada é necessária uma prévia esterilização. A esterilização deve resultar na destruição completa de todos os microrganismos (CARVALHO et al., 2009; AMAECHA; HIGHAM; EDGAR, 1999; SPERANDIO; SOUZA; OLIVEIRA, 2001; THOMAS et al., 2007), porém esta não deve afetar as propriedades biomecânicas dos tecidos dentários (CARVALHO et al., 2009; AMAECHA; HIGHAM; EDGAR, 1999).

Várias metodologias, como o gás de óxido de etileno, a autoclavagem a vapor e a seco e radiação gama têm sido utilizadas para conseguir amostras dentárias livres de microrganismos. Desinfetantes, tais como o glutaraldeído a 2%, formalina a 10% e hipoclorito de sódio também têm sido utilizados para reduzir o número de microrganismos (SPERANDIO; SOUZA; OLIVEIRA, 2001).

A esterilização com o gás de óxido de etileno é o método mais antigo de esterilização, porém causa um pequeno efeito sobre os tecidos dentários. A autoclavagem a vapor está disponível em clínicas odontológicas é o método de esterilização mais fácil. Também é segura e barata. No entanto, pode causar amolecimento do esmalte e dentina (THOMAS et al., 2007). A radiação gama é eficaz para a eliminação dos microrganismos e, além disso, não causa alterações significativas na dureza e permeabilidade do esmalte e dentina (SPERANDIO; SOUZA; OLIVEIRA, 2001; THOMAS et al., 2007; LEE et al., 2007).

A radiação ultravioleta (UV) também é utilizada como método de esterilização. Os raios UV (200-400nm) são altamente antimicrobianos, devido a isto são amplamente aplicados para esterilização de objetos inanimados, além de serem usados em infecções de feridas agudas para matar agentes patogênicos sem danificar os tecidos. Entretanto, a penetração da luz UV é limitada e óptica, e pode causar danos no DNA das células irradiadas (GUPTA et al., 2013).

Dentre os métodos citados, a irradiação gama parece ser a mais aceitável, pois mantém a integridade estrutural dos tecidos dentários, porém é importante que todas as amostras sejam esterilizadas pela mesma dose de irradiação (AMAECHA; HIGHAM; EDGAR, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a profundidade de permeação da eritrosina em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica.

3.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Comparar a profundidade de permeação da eritrosina em duas concentrações diferentes: 0,3% e 5%.
- Comparar a profundidade de permeação da eritrosina em dentina hígida e dentina cariada *in vitro*.
- Comparar a profundidade de permeação da eritrosina a 5% em dentina com indução de cárie durante diferentes períodos (5 dias, 7 dias e 10 dias).

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento experimental

Este é um estudo *in vitro* no qual foram utilizados dentes humanos para a avaliação da permeabilidade do corante eritrosina utilizado na terapia fotodinâmica. Inicialmente foram realizados estudos pilotos para uma avaliação inicial da permeabilidade dentinária.

4.2. Considerações Legais e Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - COPEP - da Universidade Estadual de Maringá – UEM, CAAE 14398113.2.0000.0104 (Anexo 1), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) para a utilização de dentes humanos.

4.3. Materiais

4.3.1. Fotossensibilizador

O corante eritrosina (figura 3) com absorção na região de 450 a 560nm, e pico em 526 nm foi utilizado nesta pesquisa, na concentração de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ (5%) e $3 \times 10^{-7} \text{M}$ (0,3%). Os corantes foram preparados em água destilada e armazenados em frasco de vidro âmbar protegidos da luz para minimizar a degradação.

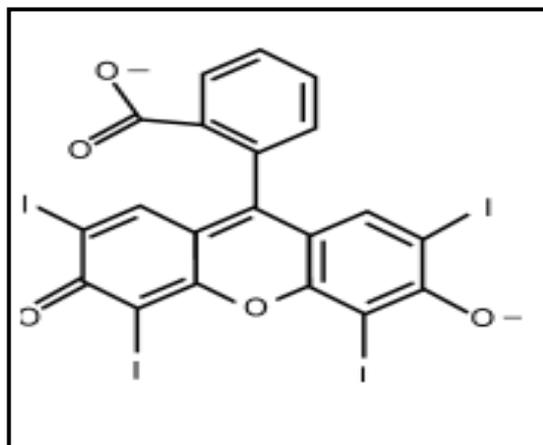


Figura 3. Estrutura química da eritrosina.

Os espectros da eritrosina a 0,3 e 5% foram obtidos a partir da espectrofotometria (figura 4).

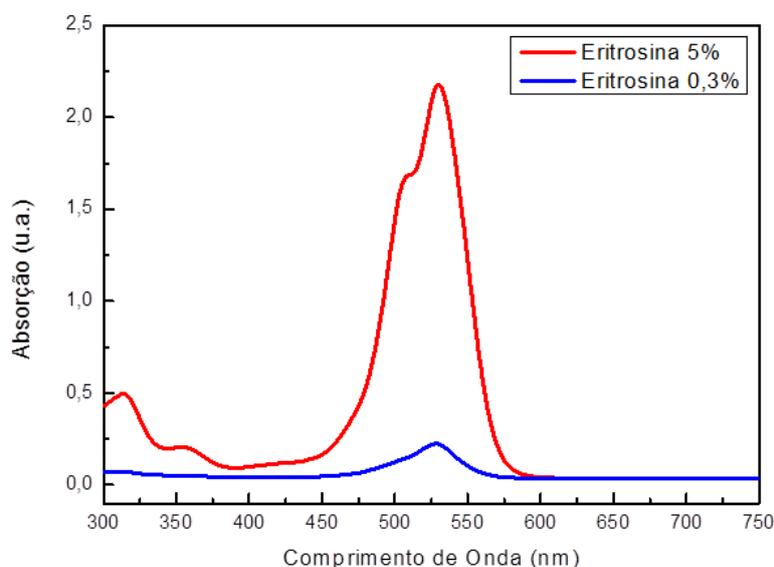


Figura 4. Espectros de absorção da eritrosina a 5 % (vermelho) e eritrosina a 0,3 % (azul).

4.3.2. Preparo dos blocos de dente

Para avaliação da permeação do corante em dentina, dentes hígidos e com rizogênese incompleta (figura 5) do banco de dentes da Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Maringá foram utilizados. No total foram selecionados 41 dentes, que deram origem a 58 blocos de dentina. Cada dente deu origem a uma fatia de dentina, e em alguns casos, esta fatia dava origem a dois blocos de dentina.



Figura 5. Molar hígido com rizogênese incompleta.

Logo após a extração, os dentes foram armazenados em tubos contendo 5 ml de solução fisiológica 0,9% estéril. Os dentes foram incluídos em resina acrílica (figura 6) e cortados em forma de disco por uma serra de diamante acoplada a um aparelho de corte (IsoMet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, USA), sob refrigeração constante. Os blocos de dentina foram

confeccionados da seguinte forma: (1) corte para remoção da porção oclusal dos dentes a 3 mm da junção cimento-esmalte, e após a remoção da porção oclusal uma pequena marcação com esmalte de unha vermelho era realizada para indicar a face oclusal; (2) corte a 1,3 mm de distância do primeiro em dentina, de forma a obter uma fatia de 1mm de espessura; (3) o esmalte foi removido com auxílio de uma ponta diamantada em alta rotação; (5) para dar forma aos blocos de dentina foram utilizados discos de lixa para polimento; (6) utilização da politriz com lixa de granulação 600 para ajustes na espessura dos blocos, sendo que o ajuste era feito sempre na superfície pulpar (contrária à aplicação do corante). Ao final, foram obtidos blocos com espessuras conferidas por meio da utilização de um micrômetro digital Mitutoyo® (figura 7).

As amostras foram armazenadas em recipientes individuais devidamente identificados contendo 5 mL de soro fisiológico para manter a hidratação natural da dentina.

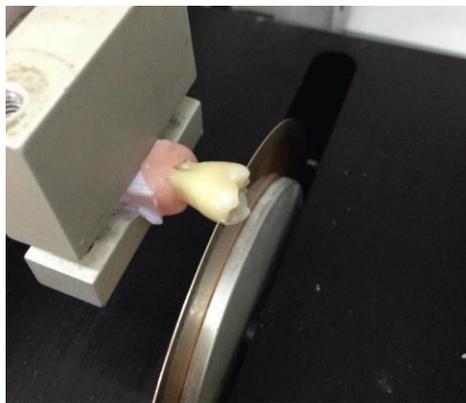


Figura 6. Dente incluído em resina acrílica no momento do corte.



Figura 7. Micrômetro usado para verificar as espessuras (Mitutoyo®).

4.4. Indução de cárie in vitro

Para simular condições clínicas de desenvolvimento de cárie, foi utilizada uma adaptação do modelo proposto por Cunha et al., 2013 (Anexo 2), para induzir lesões de cárie artificiais nos blocos de dentina. As amostras foram submetidas ao processo de esterilização por meio de irradiação gama no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) - USP, Piracicaba/SP afim de garantir a especificidade dos microrganismos inoculados, tendo sido aplicada uma dose de 14,5KGy.

O biofilme foi formado nos blocos de dentina estéreis e revestidos de saliva utilizando *Streptococcus mutans* UA 159 (ATCC 700610, sorotipo c). Toda a saliva utilizada foi coletada de um único doador, e foi clarificada por centrifugação (6350rpm, 4°C, 10 min), esterilizada e diluída (1:1) em tampão de adsorção (AB: 50mM de KCl, 1mM de KPO₄, 1mM de CaCl₂, 0,1mM MgCl₂ e

pH de 6,5), e suplementada com o inibidor de protease de fenilmetilsulfonilofluoreto (PMSF) a uma concentração final de 1mmol/L.

Os blocos de dentina foram colocados de maneira asséptica em placas de 96 poços com fundo côncavo (figura 8), e inoculados com cerca de 1×10^6 UFC/ml de meio de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight - LMW*), com adição de 1% (m/v) de sacarose (200 μ L/poço), e incubados a 37°C e 5% de CO₂.

Os biofilmes foram inicialmente cultivados sem perturbação durante 24 horas, e, em seguida, o meio de cultura foi substituído a cada 24 horas durante 5 dias (total de 120 horas).

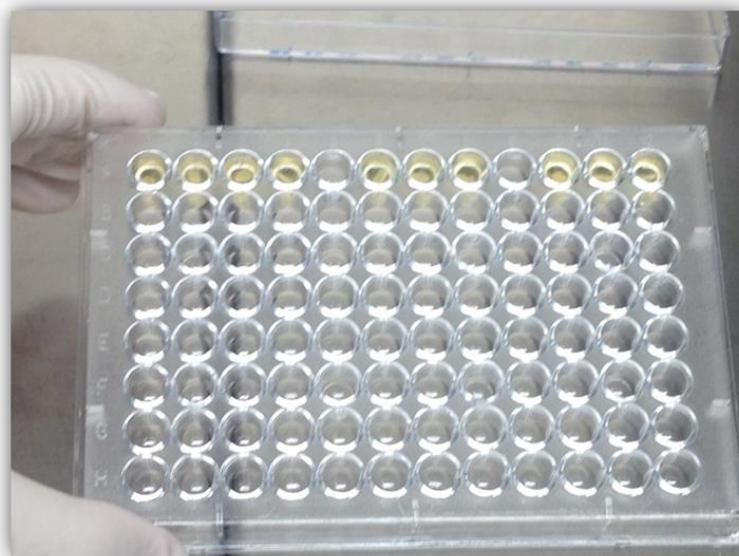


Figura 8. Placa de 96 poços de fundo côncavo.

4.5. Avaliação da permeabilidade dentinária dos corantes pela Espectroscopia Fotoacústica (PAS)

Para avaliação da profundidade de permeação do corante em dentina foi utilizada a técnica da espectroscopia fotoacústica. O sinal fotoacústico foi determinado por varredura de comprimento de onda de 300 a 750 nm.

Primeiramente o sinal fotoacústico das duas faces (oclusal e pulpar) de todos os blocos de dentina humana foram lidos sem aplicação do corante, para comprovar a ausência de banda no comprimento de onda referente ao espectro de absorção do corante (região de 450 a 560nm).

Determinado o sinal fotoacústico dos blocos de dentina, aplicou-se sobre a face oclusal 4 μ L de eritrosina na concentração de 3×10^{-7} M (0,3%) ou na concentração de 5×10^{-6} M (5%) com auxílio de pipeta volumétrica, e esperou-se um determinado tempo, que variou de 1 a 30 minutos, para permitir a permeação. O bloco corado foi colocado na célula fotoacústica para leitura das duas faces. Primeiramente realizou-se leitura da face oclusal, em seguida da face oposta (pulpar) para detecção do corante utilizando a frequência de 16 Hz. Quando o corante não era detectado nesta face, o dente era lixado até se

encontrar a presença do corante nesta frequência, e a partir disto a frequência do modulador (chopper) foi variada (10, 25, 50 e 75 Hz) para verificar as diferentes profundidades.

Para saber a profundidade da amostra em que estava sendo feita a leitura em cada frequência, o comprimento de difusão térmica (μ_s) foi calculado utilizando a expressão abaixo (figura 9), onde D corresponde a difusividade térmica (cm^2/s) e f é a frequência de modulação do feixe de luz incidente (Hz). O valor de difusividade térmica da dentina (D) utilizado neste estudo foi de $0,0025\text{cm}^2/\text{s}$ (Nogueira et al., 2013). Este parâmetro fornece a camada da amostra (no lado da incidência da luz) que a radiação absorvida e convertida em calor contribui para a geração do sinal fotoacústico.

$$\mu_s = \sqrt{\frac{D}{\pi f}}$$

Figura 9. Expressão utilizada para calcular o comprimento de difusão térmica (μ_s).

Desta forma, quanto maior a frequência, menor é a profundidade da leitura (figura 10). Para calcular a profundidade em que o corante foi detectado na amostra, o valor correspondente ao comprimento de difusão térmica (μ_s) da maior frequência em que foi observado sinal fotoacústico (banda de absorção do corante) foi subtraído da espessura do bloco de dentina. Por exemplo: em um bloco de dentina com espessura de $900\mu\text{m}$ que apresentou sinal fotoacústico na frequência de 75Hz ($\mu_s=32\mu\text{m}$), considerou-se que a profundidade de permeação do corante foi de $868\mu\text{m}$ ($900-32=868\mu\text{m}$).

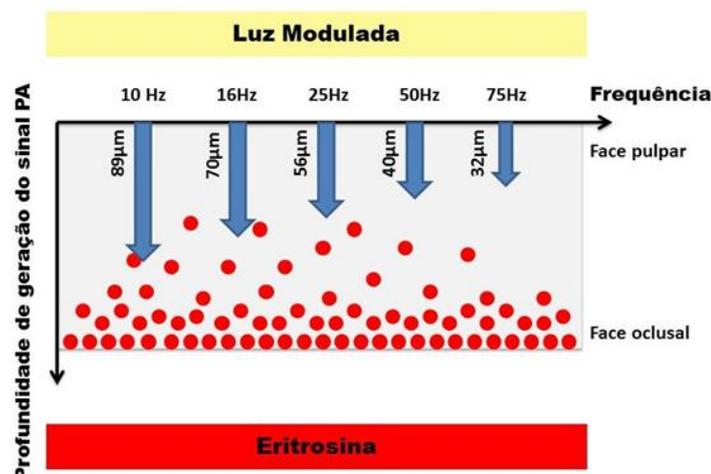


Figura 10. Profundidade de leitura na amostra para cada frequência da luz modulada.

4.6. Estudos Pilotos

4.6.1. Estudo Piloto 1 - Avaliação da permeabilidade de eritrosina em dentina bovina (n = 20)

Os dentes bovinos (incisivos) foram obtidos em um abatedouro da região.

Neste estudo piloto foram confeccionados 20 blocos de dentina bovina de 5x5x2mm, onde a porção vestibular era indentificada com esmalte de unha vermelho, e as laterais do bloco eram protegidas com esmalte de unha incolor. Uma alíquota 5 μ L de corante eritrosina a 0,3% era aplicada na porção vestibular, por um período de 10 minutos.

Com auxílio de um microscópio digital (figura 11) a permeação do corante foi verificada por transparência na lateral do dente e no lado oposto à aplicação, de maneira qualitativa.



Figura 11. Microscópio digital.

Todos os blocos de dentina bovina apresentaram um padrão de permeação superior em velocidade em profundidade quando comparado à de dentina humana. A permeação do esmalte de unha vermelho, aplicado para identificar a superfície em que o corante foi aplicado (oclusal) pôde ser observada pela translucidez da dentina sem o auxílio do microscópio digital (figura 12), deixando nítida esta superioridade, uma vez que esta permeação do esmalte de unha não foi observada em nenhum espécime de dentina humana. Assim, a utilização de dentes bovinos neste projeto foi descartada.



Figura 12. Permeação do esmalte de unha vermelho através dos túbulos de dentina bovina.

4.6.2. Estudo Piloto 2 - Avaliação da permeabilidade da dentina hidratada e desidratada e remoção da "smear layer" (n= 6)

Nesta etapa foram utilizados 6 blocos de dentina humana obtidos apenas de dentes jovens, com dimensão de 4x4x0,6mm.

Avaliou-se a questão da hidratação da dentina, aplicação do ácido para remoção da "smear layer" e a concentração do corante (figura 13).

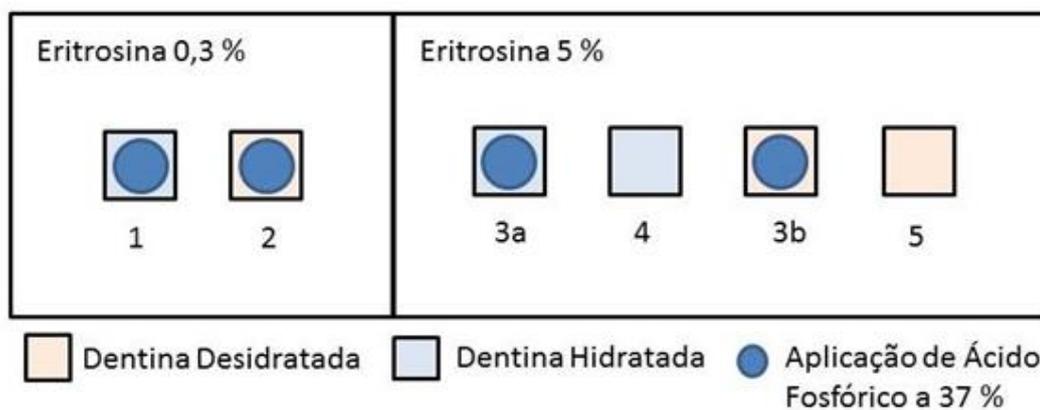


Figura 13. Esquema de distribuição da amostra do estudo piloto 2.

A remoção da "smear layer" foi realizada com aplicação de ácido fosfórico a 37% na superfície oclusal dos espécimes por 15 segundos, seguida de lavagem para remoção do ácido em água corrente e secagem com auxílio de papel absorvente de forma a não desidratar totalmente a dentina, para que as fibras colágenas não viessem a colabar. Para simular a condição de dentina desidratada, os espécimes ficaram fora do soro fisiológico por uma hora antes da aplicação do corante.

O corante foi aplicado por 30 minutos com auxílio de pipetas volumétricas. Para a concentração de 0,3% de eritrosina foi aplicada uma alíquota de 6 μ L, enquanto para a eritrosina a 5% aplicou-se 4 μ L.

A profundidade de permeação do corante foi verificada por meio de espectroscopia fotoacústica. No momento da leitura a frequência do modulador de luz foi variada.

Os resultados da permeabilidade da dentina hidratada estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que houve pouca diferença de permeação da eritrosina entre os blocos que foram desidratados, daqueles que foram lidos imediatamente após serem retirados do soro fisiológico (figura 14). Da mesma maneira, observou-se pequenas diferenças quando da aplicação ou não de ácido fosfórico 37% por 15 segundos.

Tabela 1. Profundidade de permeação do corante eritrosina (0,3 e 5 %) em blocos de dentina humana hidratados ou desidratados. Alguns blocos passaram pelo processo de remoção de "smear layer" com ácido fosfórico a 37%.

Concentração de Eritrosina (%)	Quantidade de Corante (μL)	Condição da Dentina	Ácido Fosfórico	Espécime	Profundidade de Permeação (μm)
0,3	6	Hidratada	Sim	1	544
		Desidratada*		2	572
5	4	Hidratada	Sim	3a	290
			Não	4	572
		Desidratada*	Sim	3b	560
			Não	5	560

* 1 hora fora do soro fisiológico para desidratar.

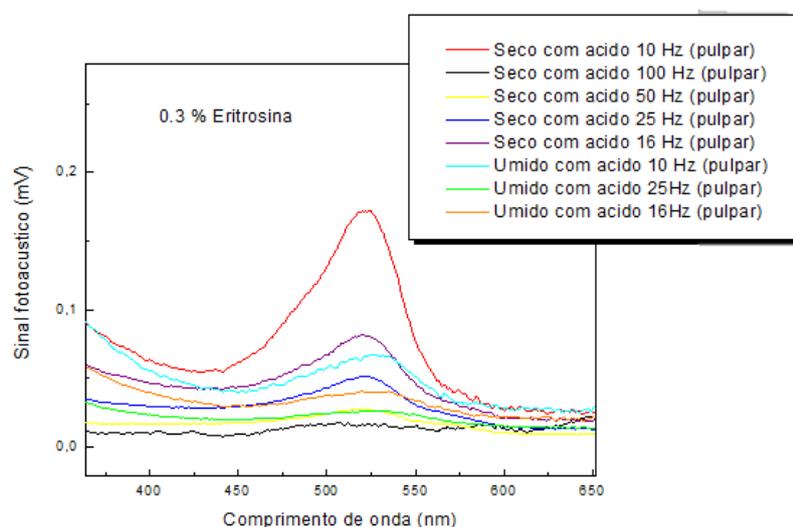


Figura 14. Evolução dos sinais fotoacústicos em função da variação de frequência do modulador para verificação da permeação de eritrosina a 0,3 % em um bloco de dentina hidratado (úmido) e outro desidratado (seco).

Em relação à utilização da dentina hidratada ou desidratada para os testes deste trabalho, foi descartado seguir os testes com dentina desidratada para mimetizar a condição clínica. Além disso, foi também descartada a utilização do ácido para remoção da "smear layer", considerando o risco de causar injúrias à polpa num procedimento clínico da terapia fotodinâmica.

Os demais gráficos de permeação referentes a este estudo piloto encontram-se disponíveis no Anexo 3.

4.6.3. Estudo Piloto 3 - Avaliação da permeabilidade em diferentes tempos de aplicação de eritrosina a 5% (n=6)

Neste estudo foram utilizados 3 dentes, cada dente deu origem a dois blocos de dentina (2x3x0,6mm), sendo que um bloco receberia aplicação do corante por 1 minuto e no outro bloco do mesmo dente o corante foi aplicado por 5 minutos (figura 15).

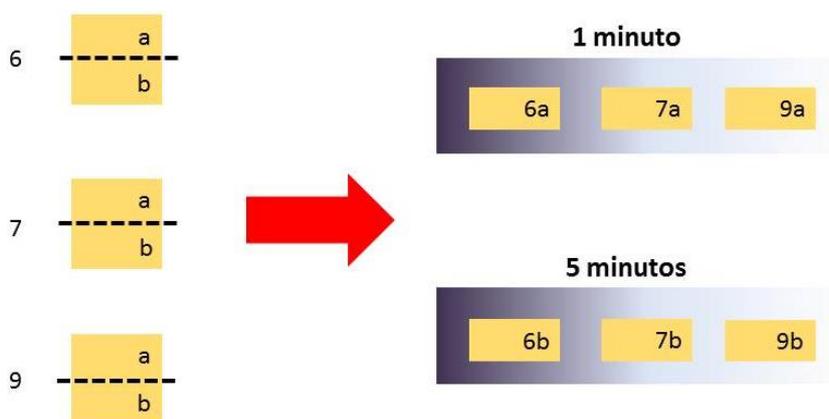


Figura 15. Esquema de distribuição da amostra do estudo piloto 3.

Uma alíquota de 4 μ L de eritrosina a 5% foi aplicada, respeitando o tempo de aplicação de cada grupo. A profundidade de permeação do corante foi verificada por meio de espectroscopia fotoacústica, e foi aplicado o teste T-student para verificar se houve diferença na profundidade de permeação em diferentes tempos de aplicação do corante.

A Tabela 2 apresenta os resultados de permeação de eritrosina a 5% nos tempos de 1 e 5 min, sendo realizada em metades de um mesmo dente.

Tabela 2. Profundidade de permeação (μ m) da eritrosina 5% em dentina com 1 e 5 minutos de aplicação.

Tempo (min)	Espécime	Espessura Inicial (μ m)	Profundidade de Permeação (μ m)
1	6 a	597	144
	7 a	527	457
	9 a	602	60
5	6 b	600	544
	7 b	606	578
	9 b	588	61

Os gráficos de permeação referentes a este estudo piloto encontram-se disponíveis no Anexo 4. Para possibilitar uma comparação com estudo anterior de permeabilidade dentinária de eritrosina (NAGATA, 2012), optou-se por realizar os experimentos com tempo de aplicação do corante de 30 minutos.

4.6.4. Estudo Piloto 4 - Avaliação do efeito antimicrobiano da iluminação com lâmpada de xenônio em blocos de dentina por 10, 15 e 30 minutos (n=4)

Neste estudo piloto foi verificada a capacidade de esterilização de blocos de dentina com aproximadamente 1mm de espessura utilizando iluminação com lâmpada de xenônio por 10, 15 e 30 minutos. Para tal, foram utilizados 4 blocos de dentina (4x4x1mm), divididos em 3 grupos: G10 - 10 minutos (n=1); G15 - 15 minutos (n=1); e G30 - 30 minutos (n=2).

Os dentes ficaram armazenados em potes plásticos contendo soro fisiológico, e ficaram expostos à uma lâmpada de xenônio com 1000W de potência respeitando o tempo de cada grupo.

Após, os dentes foram transferidos assepticamente para tubos de vidro contendo tioglicolato, dentro do fluxo laminar. Os espécimes e um vidro contendo apenas tioglicolato (controle negativo) foram mantidos em estufa a 37°C e observados após 72h para verificar se houve crescimento bacteriano (contaminação do meio).

Depois do período de 72h, todos os tubos contendo os espécimes apresentaram crescimento bacteriano (figura 16), ou seja, não houve esterilização dos blocos de dentina a partir da iluminação com a lâmpada de xenônio, que emite espectros do ultravioleta até o infravermelho, inviabilizando a utilização deste método para esterilizar os espécimes de dentina que deveriam ser submetidos ao protocolo de indução de cárie com biofilme de *S. mutans*.

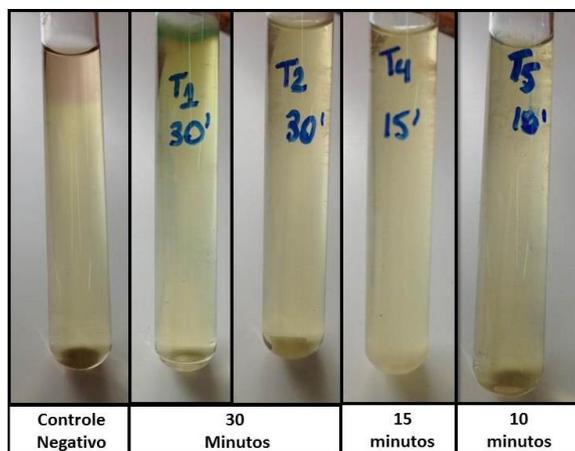


Figura 16. Tubos avaliados após o período de 72h em estufa a 37° C.

4.6.5. Estudo Piloto 5 - Avaliação do efeito antimicrobiano do raio ultra-violeta do fluxo laminar em blocos de dentina por 15 minutos (n=10)

Para testar o potencial de esterilização da luz ultravioleta, foi realizado um estudo com 10 blocos de dentina. Dentro do fluxo laminar, os blocos eram

deixados expostos por 15 minutos à luz UV, e depois eram virados do outro lado a fim de que a outra superfície também ficasse 15 minutos em contato com a luz UV. Após os blocos foram transferidos a tubos devidamente codificados contendo 10 ml de meio tioglicolato. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C e observados após 24, 48 e 72 horas para verificar se ocorreu o crescimento bacteriano.

A tabela 3 mostra que após 24 horas de incubação, 40% das amostras apresentaram turvação do meio, e esse número cresceu para 80 e 100% para os períodos de 48 e 72 horas, respectivamente, inviabilizando a utilização deste método para a esterilização dos blocos de dentina.

Tabela 3. Efeito antimicrobiano do raio ultra-violeta do fluxo laminar em blocos de dentina por 15 minutos após os períodos de 24, 48 e 72h.

Dente	Contaminação do meio		
	24h	48h	72h
1	Não	Sim	Sim
2	Não	Não	Sim
3	Não	Não	Sim
4	Sim	Sim	Sim
5	Sim	Sim	Sim
6	Sim	Sim	Sim
7	Sim	Sim	Sim
8	Não	Sim	Sim
9	Não	Sim	Sim
10	Não	Sim	Sim

4.7. Experimentos

4.7.1. Experimento 1 - Avaliação da perda em espessura e da permeabilidade de eritrosina a 5% em dentes cariados durante 5, 7 e 10 dias (n=9)

Foram utilizados 5 dentes neste experimento, afim de verificar qual o período seria mais eficiente para provocar a cárie artificial sem perder muito em espessura. Os dentes foram divididos ao meio, dando origem a 9 blocos de dentina, divididos em 3 grupos: G5 - 5 dias de ensaio com biofilme (n=4); G7 - 7 dias (n=2); e G10 - 10 dias (n=3).

Todos os blocos de dentina tiveram suas espessuras verificadas antes do passarem pelo processo de esterilização por radiação gama. Após o período determinado de ensaio com biofilme, o excesso de biofilme foi retirado com auxílio de banho ultrassônico, os espécimes foram armazenados separadamente em frascos contendo solução fisiológica a 0,9%, devidamente identificados, e suas espessuras foram verificadas novamente com auxílio de um micrômetro.

Após as análises de espessura, uma alíquota de 4 μL de corante eritrosina a 5% foi aplicada em cada bloco de dentina por 30 minutos, e a profundidade de permeação do corante foi medida por meio da espectroscopia fotoacústica.

4.7.2. Experimento 2 - Avaliação da permeabilidade de eritrosina a 0,3 e 5% em dentina hígida e dentina após formação de biofilme de *S. mutans* UA159 por 5 dias (n=22)

Foram selecionados 11 dentes jovens (figura 17), e após a confecção dos blocos de dentina, estes foram divididos ao meio com auxílio de um disco diamantado para peça reta, afim de que uma metade permanecesse hígida, e a outra fosse submetida ao desafio cariogênico, totalizando 22 blocos de dentina, divididos em 4 grupos: G1 - dentina hígida e eritrosina a 0,3% (n=5); G2 - dentina cariada e eritrosina a 0,3% (n=5); G3 - dentina hígida e eritrosina a 5% (n=6); e G4 - dentina cariada e eritrosina a 5% (n=6).

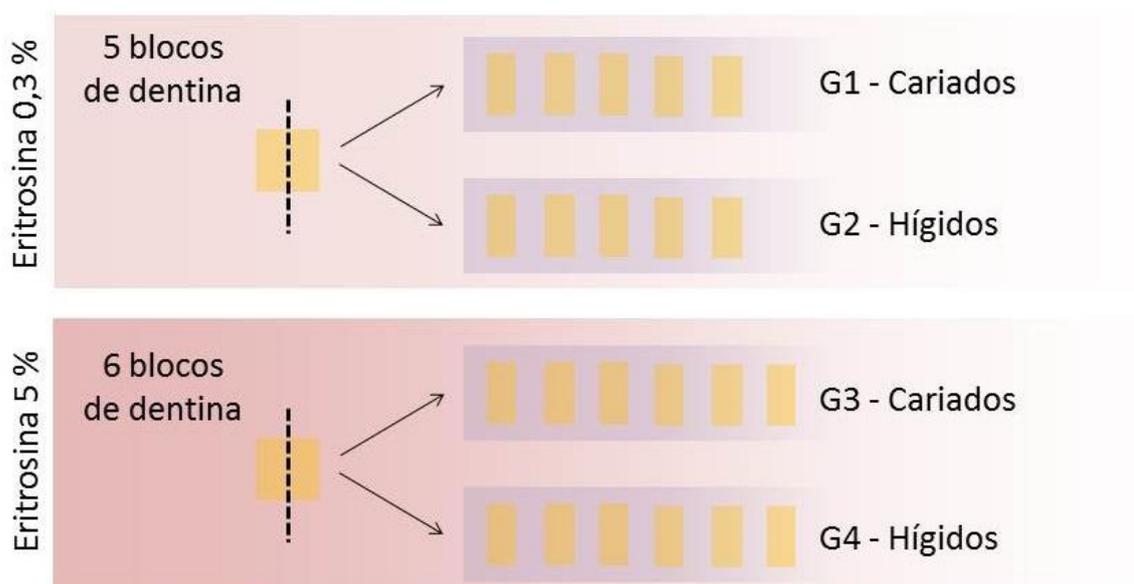


Figura 17. Esquema de distribuição da amostra do experimento 2.

A composição orgânica e inorgânica de cada dente foi avaliada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-RAMAM), a fim de excluir os que não apresentavam composição semelhante aos demais. Todos os dentes incluídos no estudo apresentaram composição orgânica e inorgânica semelhante (figura 18), o que pôde ser observado pelos picos do espectro.

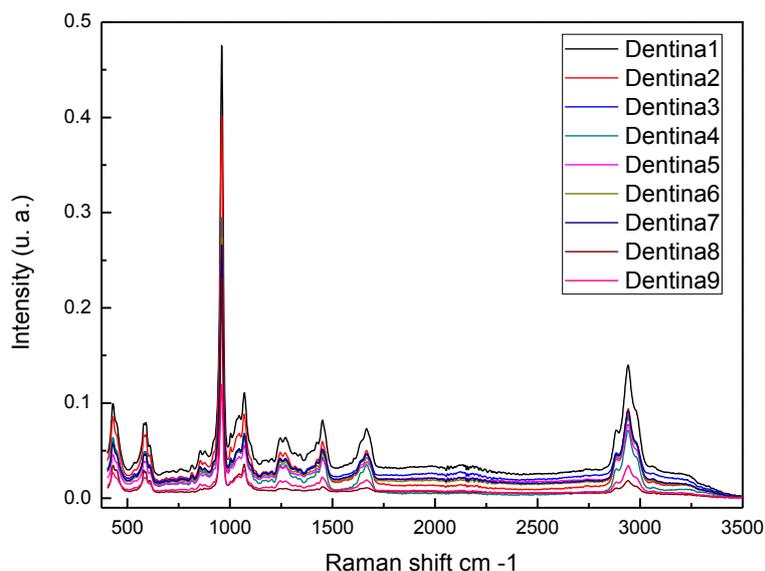


Figura 18. Espectro obtido por meio de FT-RAMAM.

As amostras dos grupos G2 e G4 foram submetidas a esterilização por radiação gama previamente ao processo de indução de cárie por 5 dias. A aplicação do corante foi igual para ambas as concentrações (4 μ L por 30 minutos).

Foram realizadas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificar a superfície pulpar das amostras.

4.8. Análise Estatística

Além da estatística descritiva, em alguns casos foram aplicados testes estatísticos com nível de significância fixado em 5% no aplicativo R.

No experimento 1, para verificar se houve diferença na profundidade de permeação do corante nos diferentes tempos de indução de cárie aplicou-se o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

No experimento 2, a igualdade das variâncias foi avaliada pelo teste de Bartlett e F com 5% de significância ($p=0,005$), portanto, há evidência de que as suposições de normalidade e variância constante não foram atendidas. Diante disto, utilizou-se de transformações na variável resposta (profundidade) - log e raiz de log. Após isto, aplicou-se novamente o teste one way ANOVA e também a estatística não-paramétrica de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1 - Avaliação da perda em espessura e da permeabilidade de eritrosina a 5% em dentes cariados durante 5, 7 e 10 dias (n=9)

Os resultados da permeabilidade da eritrosina a 5% após formação de biofilme por 5, 7 e 10 dias estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Perda de espessura dos nos diferentes períodos de formação de biofilme e profundidade de permeação da eritrosina a 5%.

Tempo	Perda (µm)	Profundidade de Permeação (µm)	Media	DP	Mediana
5 dias	13	954	932,00	43,56	951,00
	18	948			
	41	867			
	8	959			
7 dias	31	809	883,50	105,35	883,50
	16	958			
10 dias	9	939	925,33	14,01	926,00
	5	926			
	19	911			
Controle*	-	945	922,33	47,26	945,00
	-	954			
	-	868			

* O grupo controle (blocos de dentina hígidos com aplicação de eritrosina a 5%) foi retirado do grupo G3 do experimento 2.

Ao avaliar a perda em espessura dos blocos de dentina nos diferentes tempos de indução de cárie verificamos que todos os espécimes apresentaram perda, variando de 5 a 45 µm. Observou-se uma variabilidade entre os dentes avaliados, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes tempos de formação de biofilme.

A profundidade de permeação do corante comparada em blocos com diferentes tempos de formação de biofilme não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), sugerindo que o processo de indução de cárie não interferiu na permeação do corante (figura 19).

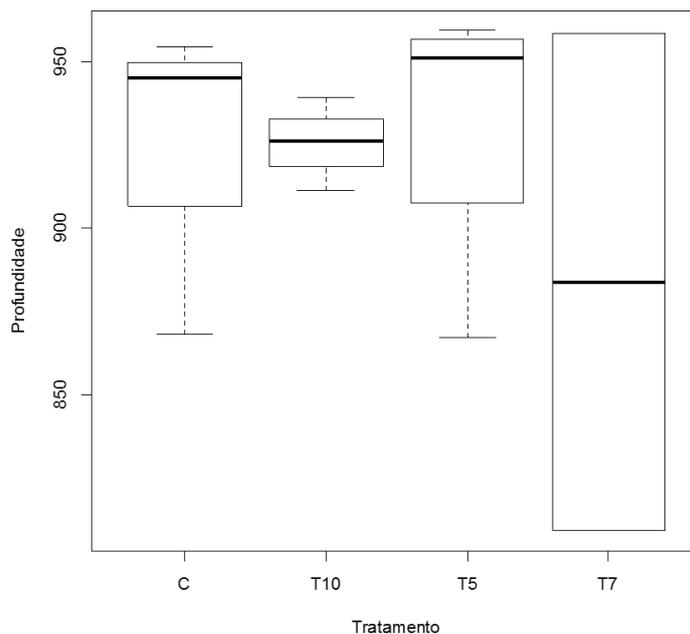


Figura 19. Profundidade de permeação da eritrosina a 5% nos diferentes tempos de indução de cárie (C=controle; T5=5 dias; T7=7 dias; T10=10 dias).

5.2. Experimento 2 - Avaliação da permeabilidade de eritrosina a 0,3 e 5% em dentina hígida e dentina após formação de biofilme de *S. mutans* UA159 por 5 dias

Os resultados da permeabilidade da eritrosina a 0,3 e 5% em dentina hígida e dentina cariada após formação de biofilme por 5 dias estão apresentados na Tabela 5. Verificou-se que a diferença na profundidade de permeação da dentina cariada em relação a hígida apresentou alta variabilidade.

Tabela 5. Permeação do corante eritrosina nas concentrações de 0,3 e 5% em dentina hígida e cariada.

Grupo	Concentração de Eritrosina (%)	Condição da Dentina	Dente	Espessura (μm)	Profundidade de Permeação (μm)
G1	0,3	Hígida (a)	11 a	995	148
			12 a	990	151
			19 a	1078	108
			20 a	1029	997
			26 a	958	926
G2		Cariada (b)	11 b	961	151
			12 b	994	118
			19 b	943	188
			20 b	918	177
			26 b	936	84
G3	5	Hígida (a)	3 a	977	945
			13 a	1052	954
			14 a	950	868
			17 a	977	231
			18 a	1005	157
			22 a	990	165
G4		Cariada (b)	3 b	887	855
			13 b	920	888
			14 b	979	947
			17 b	958	212
			18 b	899	151
	22 b		1007	975	

Na Tabela 6, podemos observar os valores medianos de permeação e a amplitude interquartilica (3º quartil-1º quartil=amplitude interquartilica). Nota-se que a eritrosina a 5%, tanto em dentina hígida (G3) quanto em dentina cariada (G4), conseguiu permear uma profundidade superior àquela alcançada pela eritrosina a 0,3% (G1 e G2).

Tabela 6. Mediana de permeação (μm) e amplitude interquartilica dos diferentes grupos.

	Grupos				Condição da Dentina		Concentração de Eritrosina	
	G1	G2	G3	G4	Hígida	Cariada	0,3%	5%
Mediana	151,00	151,00	549,50	871,50	231,00	188,00	151,00	861,50
1º quartil	148,00	118,00	181,50	372,75	154,00	84,00	125,50	200,25
3º quartil	926,00	177,00	925,75	932,25	935,50	871,50	185,25	945,50
Amplitude Interquartilica	778,00	59,00	744,25	559,50	781,50	720,50	59,75	745,25

O valor mediano da profundidade de permeação da eritrosina em dentina cariada foi próximo ao valor mediano encontrado em dentina hígida (Figura 20). Entretanto, ao comparar as diferentes concentrações de eritrosina (Figura 21), nota-se que o valor mediano da eritrosina a 5% é consideravelmente superior ao encontrado para a concentração de 0,3%, entretanto há valores muito discrepantes, distorcendo a compreensão do comportamento das diferentes concentrações.

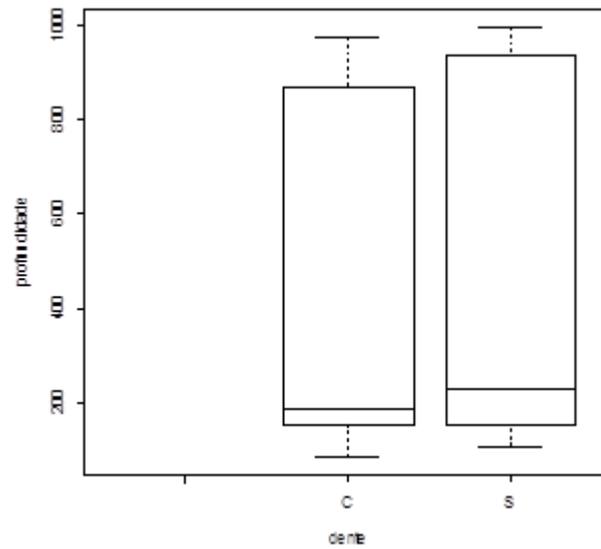


Figura 20. Profundidade de permeação da eritrosina em dentina hígida (S) e dentina cariada (C).

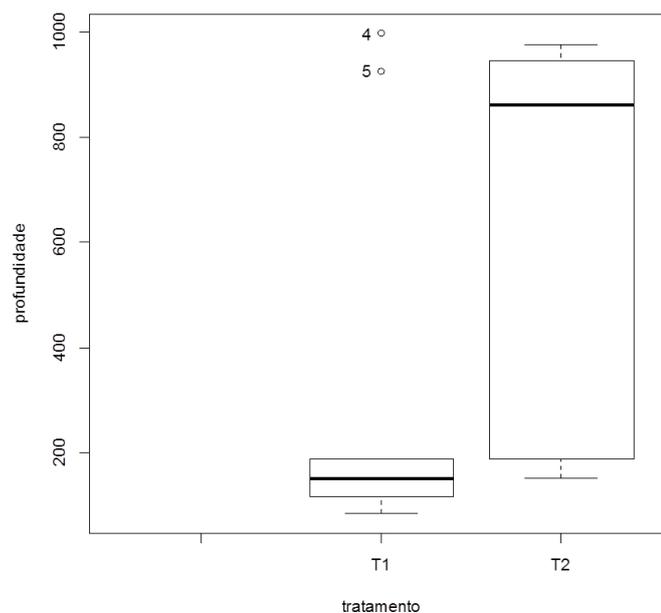


Figura 21. Profundidade de permeação da eritrosina a 0,3% (T1) e a 5% (T2).

Não houve diferença significativa na profundidade de permeação da eritrosina comparando dentina hígida e cariada ($p=0,60$), e o mesmo não ocorreu ao comparar as diferentes concentrações ($p<0,05$), ao realizar as duas transformações na variável resposta (profundidade). Diante disto, utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e este também indicou que há diferença significativa ($p=0,03$) entre as diferentes concentrações estudadas.

Ao comparar a superfície pulpar de um bloco de dentina hígida com um de dentina cariada através da microscopia eletrônica de varredura, observamos que a superfície que passou pelo processo de indução de cárie apresentou-se mais irregular (figura 22).

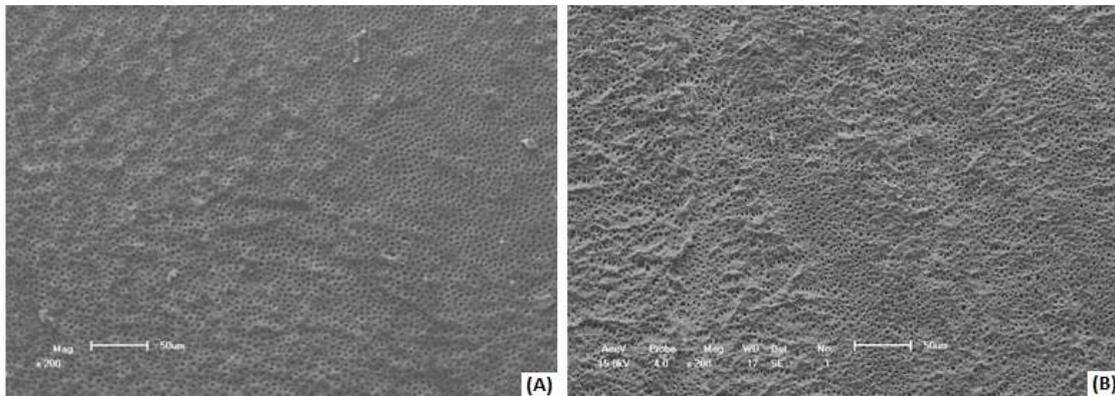


Figura 22. Avaliação de superfície no microscópio eletrônico de varredura (MEV). (A) Superfície pulpar do bloco de dentina sem indução de cárie, em aumento de 200x. (B) Superfície pulpar do bloco de dentina submetido à indução de cárie, em aumento de 200x.

6. DISCUSSÃO

De acordo com o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a permeabilidade do fotossensibilizador eritrosina em dentina após formação de biofilme para simular a condição clínica de cárie, tendo como controle o mesmo dente. Neste estudo encontramos que a eritrosina a 5 % foi detectada a profundidade maior que a eritrosina a 0,3 %, sendo que não houve grande diferença quando comparamos a dentina cariada com a hígida. Com relação aos diferentes intervalos de tempo de formação de biofilme, a eritrosina a 5% seguiu um alto padrão de permeação para todos os períodos de tempo avaliados.

Ao compararmos a profundidade mediana de permeação dentinária da eritrosina a 0,3 % (151 μm) com a profundidade mediana alcançada pela eritrosina a 5 % (861,5 μm), nota-se que a permeação é diretamente proporcional à concentração do corante, ou seja, quanto maior a concentração, maior será a profundidade que este consegue permear em dentina humana.

Este resultado foi semelhante ao de um estudo que avaliou a permeabilidade dentinária da eritrosina a 5 % através da espectroscopia fotoacústica, com frequência fixa de 16 Hz e aplicação de 4 μl do corante por 30 minutos (NAGATA, 2011). Neste estudo foram utilizados 2 blocos de dentina com 1100 μm de espessura e 3 blocos com 600 μm . Como resultados, encontrou-se que para um dos blocos de 1100 μm o corante foi encontrado na espessura de 850 μm , e nos demais blocos a partir de 600 μm . Porém é importante lembrar que a frequência fixada para a leitura era de 16 Hz, desta forma o corante foi encontrado aproximadamente 70 μm abaixo da superfície de leitura (pulpar). Os valores reais de permeação variaram de 530 a 780 μm . Este estudo (NAGATA, 2011) apresentou algumas limitações, tais como: o baixo número de amostras - não permitindo avaliar se houve uma variabilidade semelhante à encontrada no presente estudo; a não padronização da idade média dos dentes - aspecto importante, uma vez que quanto maior a idade do dente, mais atresico se tornam os túbulos dentinários, pela deposição de dentina ao longo da vida; e a frequência fixa do modulador de luz - poderia ter sido variada para ler diferentes espessuras da amostra.

Outro estudo de permeabilidade dentinária utilizando a espectroscopia fotoacústica e os corantes azul de metileno, verde malaquita e azul de orto-toluidina foi realizado com uma metodologia semelhante a anterior, diferenciando-se pelo tempo de aplicação - 1, 5 ou 30 minutos, concentração dos corantes - 0,01 e 0,001 %, e pelo volume de corante aplicado - 10 μl (NOGUEIRA et al., 2013). Os autores verificaram que com tempo de aplicação do corante de 5 ou 30 minutos, a profundidade média de permeação para o azul de metileno a 0,01 % foi de 190 μm , seguida de 144 e 130 μm para verde malaquita e azul de orto-toluidina, respectivamente. Esta diferença na profundidade de permeação encontrada nos corantes azul de metileno, verde malaquita e azul de orto-toluidina, sendo maior para eritrosina no presente

estudo, pode ser explicada pelas características químicas dos corantes, uma vez que a eritrosina é aniônica e hidrofílica e os outros corantes estudados são anfifílicos e catiônicos (NAGATA et al., 2012). Com relação as diferentes concentrações do corante, ASTRATH (2011) verificou que não foi possível detectar a presença dos corantes em dentina quando utilizados em baixas concentrações, o que corrobora com nossos resultados. Uma possível explicação para a menor permeação do corante em concentrações mais baixas, poderia ser o limite de detecção do método de leitura do corante. De acordo com NOGUEIRA et al., (2013) há um gradiente de concentração ao longo da dentina e é possível que a quantidade de corante em regiões mais profundas seja insuficiente para gerar o sinal fotoacústico, não sendo assim detectado. É possível também que o volume utilizado do corante para os testes tenha influenciado na permeação. Foi observado no estudo piloto 2 uma permeação semelhante em amostras de volume e concentrações diferentes, sugerindo que o aumento de volume do corante poderia promover uma maior permeação. Uma possível explicação para este comportamento é que em um volume maior, uma certa quantidade de moléculas ficariam aderidas às paredes tubulares ao longo da rota de permeação na dentina, e somente uma parte das moléculas alcançariam profundidades maiores.

Com relação a permeabilidade do corante em dentina hígida e cariada, encontramos no experimento 2 que o padrão de permeação da eritrosina, tanto na concentração de 0,3% quanto na de 5%, foi semelhante para dentina hígida e cariada.

Até o momento, apenas um trabalho foi encontrado na literatura avaliando a permeação de um fotossensibilizador em dentina simulando condições de cárie (MELO et al., 2013). Neste estudo o corante avaliado foi o azul de orto-toluidina a 0,01 %, com tempo de aplicação de 5 minutos e volume de 5 µl. Os autores utilizaram a técnica da microespectroscopia confocal raman para verificar a profundidade de permeação do corante em 3 grupos: controle; dentina cariada *in vitro*; e dentina cariada *in situ*. Os autores encontraram que o grupo de cárie *in vitro* permeou $46,1 \pm 4,5$ µm, e o grupo de cárie *in situ* e controle permearam $51,2 \pm 8,5$ e $44,8 \pm 5,6$ µm, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no experimento 2, os quais apresentaram permeação semelhante para dentina hígida e cariada. Mais estudos são necessários para verificar a causa deste padrão semelhante de permeação da dentina cariada.

Comparando os resultados de profundidade de permeação encontrados por MELO et al. (2013) com os encontrados em nosso trabalho, a permeação do azul de orto-toluidina foi inferior aos resultados encontrados para a eritrosina, tanto na concentração de 0,3 % quanto a 5 %. Como exposto anteriormente, esta menor permeação encontrada no trabalho de MELO et al. (2013) pode estar relacionada com a diferença na característica química dos corantes. Entretanto, outras limitações metodológicas podem ter influenciado a permeação do corante, como por exemplo a não padronização dos dentes,

considerando a alta variabilidade devido a composição de cada dente. No presente estudo tentamos nos cercar de cuidados para reduzir esta variabilidade, tais como: selecionar apenas dentes jovens (terceiros molares com risogênese incompleta); análise da composição orgânica e inorgânica por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-RAMAM), a fim de excluir os dentes que não apresentavam composição semelhante aos demais; e confeccionar 2 blocos de dentina de cada dente, a fim de usar uma metade como controle para aquela que foi submetida ao processo de indução de cárie.

Comparando os resultados do grupo controle deste estudo (MELO et al, 2013) com estudo anterior de permeação do azul de orto-toluidina (NOGUEIRA et al., 2013), no qual a profundidade alcançada pelo azul de orto-toluidina foi em média de 130 μm , para o mesmo tempo de aplicação do corante, este estudo apresentou profundidade de permeação inferior ($44,8 \pm 5,6 \mu\text{m}$). Algumas possíveis causas deste nível de permeação menor podem ser: a técnica de detecção do corante, sendo diferente neste estudo; o menor volume de corante aplicado, assim como discutido anteriormente, mesmo em baixas concentrações, com um volume maior de corante é possível alcançar uma profundidade maior em dentina; e a esterilização dos blocos de dentina, uma vez que neste estudo os autores esterilizaram todos os blocos de dentina em autoclave a 121°C por 15 minutos, podendo ter gerado alterações morfológicas na dentina. A autoclave é um método fácil, barato e acessível, porém pode causar amolecimento do esmalte e dentina (THOMAS et al., 2007). Frente a isto, no presente estudo utilizamos a radiação gama, que além de ter uma boa eficiência antimicrobiana não causa alterações consideráveis nas estruturas de esmalte e dentina (SPERANDIO; SOUZA; OLIVEIRA, 2001; THOMAS et al., 2007; LEE et al., 2007).

De acordo com os resultados obtidos no experimento 1, nota-se os diferentes tempos de formação do biofilme não interferiram na permeação da eritrosina a 5 %. Em um estudo com formação de biofilme *in vitro* por 5 dias e *in situ* por 14 dias a permeação do azul de orto-toluidina foi avaliada (MELO et al., 2013). Os autores verificaram que o modelo de formação de biofilme *in situ* por 14 dias apresentou maior área de desmineralização e lesões de cárie em maiores profundidades, quando comparado ao modelo *in vitro* por 5 dias. Entretanto concluíram que o nível de desmineralização da dentina não influencia na permeabilidade dentinária do corante, corroborando com nossos resultados.

Com relação ao estudo da permeabilidade do corante frente à diferentes tempos de aplicação (piloto 3), encontramos que com o tempo de 5 minutos de aplicação o corante conseguiu alcançar uma profundidade próxima da espessura total do bloco, assim como o padrão observado nos testes com 30 minutos de aplicação. Para 1 minuto de aplicação, esta permeação foi inferior, assim como os resultados encontrados no estudo de NOGUEIRA et al. (2013). O tempo de aplicação do fotossensibilizador parece ser um fator importante para

sua difusão através da dentina (GUGLIELMI et al., 2011). Entretanto, ainda que com 1 minuto de aplicação o corante permeie menos, a profundidade média alcançada foi de 220 μm , o que seria suficiente para inativar as bactérias, considerando que a profundidade máxima em que se encontra *Streptococcus* em dentina é cerca de 200 μm (LOVE; MCMILLAN; JENKINSON, 1997). Isto torna a terapia fotodinâmica com aplicação de eritrosina por 1 minuto uma alternativa viável clinicamente.

Mais estudos são necessários para verificar a relação da dentina cariada com a permeação do corante, pois ainda não se sabe o porquê esta apresenta um padrão de permeação semelhante ao da dentina hígida.

Algumas amostras não apresentaram permeação do corante, e não foi encontrada uma resposta para este comportamento, tornando necessários mais estudos para que este fenômeno possa ser explicado.

Outro fator que pode ser investigado é a quantidade mínima necessária de corante para inativar as bactérias, afim de calcular a concentração e volume utilizando os modelos matemáticos já existentes para tal.

7. CONCLUSÕES

A eritrosina parece ser um fotossensibilizador promissor para a aplicação na terapia fotodinâmica em lesões de cárie, pois demonstrou ter potencial de permeação, atingindo uma profundidade suficiente para alcançar os microrganismos, tornando assim possível sua inativação.

Os resultados sugerem que a concentração e volume da eritrosina podem influenciar na sua permeação em dentina humana. Entretanto, a dentina cariada apresentou padrões de permeação semelhantes à dentina hígida, sugerindo que não houve alteração na rota de permeação do corante na dentina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAECHA BT, HIGHAM SM, EDGAR WM. Effect of sterilisation methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. *Journal of Dentistry*. 1999; **27**: 313–316.

AMMARI MM, MOLITERNO L. Remoção químico-mecânica da cárie: evidências atuais. *RBO*, 2005; **62**: 125-127.

ARAÚJO PV, TEIXEIRA KI, LANZA LD, CORTES ME, POLETTO LT. In vitro lethal photosensitization of *S. mutans* using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*.2009; **22**: 93-97.

ASTRATH, Ana Cláudia Nogueira. *Espectroscopia Fotoacústica: determinação das taxas de difusão de complexos nanoencapsulados na pele e de fotossensibilizadores na dentina*. 2011. Dissertação (Mestrado em Física) - Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

BAPTISTA, Alessandra. *Efeito da Terapia Fotodinâmica na doença cárie. Estudo in vivo*. 2009. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Lasers em Odontologia) - Autarquia Associada à Universidade São Paulo, São Paulo, 2009.

BEVILACQUA IM, NICOLAU RA, KHOURI M, BRUGNERA JR A, TEODORO GR, ZÂNGARO RA, PACHECO MTT. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg*, 2007; **25**: 513-518.

BOLEAN M, PAULINO TP, THEDEI JUNIOR G, CIANCAGLINI P. Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2010; **28**: 79-84.

BÖNECKER M, TENUTA LMA, PUCCA JUNIOR GA, COSTA PB, PITTS N. A social movement to reduce caries prevalence in the world. *Braz. Oral Res*. 2012; **26**: 491-2.

CARVALHO FG, GONÇALVES LS, CARLO HL, SOARES CJ, CORRER-SOBRINHO L, PUPPIN-RONTANI RM. Influence of sterilization method on the bond strength of caries-affected dentin. *Braz Oral Res*. 2009; **23**: 11-16.

CHUI C, AOKI A, TAKEUCHI Y, SASAKI Y, HIRATSUKA K, ABIKO Y, IZUMI Y. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agente on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2013; **48**:696-705.

CUNHA MG, FRANCHIN M, GALVÃO LCC, BUENO-SILVA B, IKEGAKI M, ALENCAR SM, ROSALEN PL. Apolar bioactive fraction of *Melipona scutellaris* geopropolis on *Streptococcus mutans* biofilm. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; ID 256287.

CURY JA, TENUTA LMA, RIBEIRO CCC, PAES LEME, AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz. Dent. J.* 2004; **15**: 167-174.

FERREIRA JM, PINHEIRO SL, SAMPAIO FC, MENEZES VA. Use of Glass Ionomer Cement Containing Antibiotics to Seal off Infected Dentin: a Randomized Clinical Trial. *Brazilian Dental Journal*. 2013; **24**: 68-73.

FRAZÃO P. Epidemiology of dental caries: when structure and context matter. *Braz. Oral Res.* 2012; **26**: 108-114.

FU XJ, FANG Y, YAO M. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Biomed Res Int.* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/159157>

GALVÃO LCC, FURLETTI VF, BERSAN SMF, CUNHA MGC, RUIZ ALTG, CARVALHO JE, SARTORATTO A, REHDER VLG, FIGUEIRA GM, DUARTE MCT, IKEGAKI M, ALENCAR SM, ROSALEN PL. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 751435, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/751435

GIUSTI JSM, SANTOS-PINTO L, PIZZOLITO AC, HELMERSON K, CARVALHO-FILHO E, KURACHI C, BAGNATO VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*, 2008; **26**: 281-287.

GRANVILLE-GARCIA AF, MENEZES VA, ROCHA MRS, CAVALCANTI AL. Remoção químico-mecânica de tecido cariado: bases biológicas e materiais utilizados. *Stomatos*. 2009; **15**: 67-76.

GUPTA A, AVCI P, DAI T, HUANG YY, HAMBLIN MR. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; **2**:422-437.

GUGLIELMI CAB, SIMIONATO MRL, RAMALHO KM, IMPARATO JCP, PINHEIRO SL, LUZA MAAC. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *Journal of Biomedical Optics*. 2011; **16**: 088003

KIDD EAM. How 'Clean' Must a Cavity Be before Restoration? *Caries Res.* 2004; **38**: 305–313

KONOPKA K, GOSLINSKI T. Photodynamic Therapy in Dentistry. *J Dent Res.* 2007; **86**: 694-707.

LEE JJ, NETTEY-MARBELL A, COOK-JR A, PIMENTA LAF, LEONARD R, RITTER AV. Using extracted teeth for research The effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *JADA.* 2007; **138**: 1599-1603.

LIMA JPM, MELO MAS, BORGES FMC, TEIXEIRA AH, STEINER-OLIVEIRA C, SANTOS MN, RODRIGUES LKA, ZANIN ICJ. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur J Oral Sci.* 2009; **117**: 568–574.

LOVE RM, MCMILLAN MD, JENKINSON HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect. Immun.* 1997; **65**: 5157–5164.

MACHADO AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova.* 2000; **23**: 237-243.

MAISCH T, WAGNER J, PAPASTAMOU V, NERL HJ, HILLER AK, SZEIMIES RM, SCHMALZ G. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology.* 2009; **107**: 1569–1578.

MELO MA, ROLIM JP, ZANIN IC, SILVA JJ, PASCHOAL AR, AYALA AP, RODRIGUES LK. A comparative study of the photosensitizer penetration into artificial caries lesions in dentin measured by the confocal Raman microscopy. *Photochem Photobiol.* 2013 Oct 15. doi: 10.1111/php.12186.

MOURADIAN WE, WERH E, CRALL JJ. Disparities in children's oral health and access to dental care. *JAMA.* 2000; **284**: 2625-2631.

NAGATA, Juliana Yuri. *Estudo de diferentes corantes para aplicação em inativação fotodinâmica na odontologia.* 2011. Dissertação (Mestrado em Odontologia Integrada)-Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

NAGATA JY, KIMURA E, BATISTELA VR, TERADA RSS, GRACIANO AX, BAESSO ML, HAYACIBARA MF. Antibacterial photodynamic therapy for dental caries:

Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2012; **9**: 122–131.

NOGUEIRA AC, GRACIANO AX, NAGATA JY, FUJIMAKI M, TERADA RSS, BENTO AC, ASTRATH NGC, BAESSO ML. Photosensitizer and light diffusion through dentin in photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics.* 2013; **8**: 055004.

PASHLEY DH, LIVINGSTON MJ. Effect of molecular size on permeability coefficients in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1978; **23**:391-395.

PASHLEY DH, LIVINGSTON MJ, GREENHILL JD. Regional resistances to fluid flow in human dentine *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 1978; **23**: 807-810.

PAULINO TP, RIBEIRO KF, THEDEI G, TEDESCO AC, CIANCAGLINI P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology.* 2005; **50**: 353-359.

PELLOSI DS, BATISTELA VR, SOUZA VR, SCARMINIO IS, CAETANO W, HIOKA N. Evaluation of the Photodynamic Activity of Xanthene Dyes on *Artemia salina* described by Chemometric Approaches. *An Acad Bras Cienc.* 2013.

PETERSEN PE, LENNON MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; **32**: 319–21.

PETERSEN PE, BOURGEOIS D, OGAWA H, ESTUPINAN-DAY S, NDIAYE C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bulletin of the World Health Organization. 2005; **83**: 661-9.

PORTO CLA, PEREIRA JC, NETTO CA. Cariologia. Artes Médicas/Divisão Odontológica, 2008.

RICKETTS D, KIDD E, INNES NPT, CLARKSON JE. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. Cochrane Database of Systematic Reviews, v.3, 2006.

SELWITZ RH, ISMAIL AI, PITTS NB. Dental caries. *Lancet.* 2007; **369**: 51–59.

SCHWENDICKE F, MEYER-LUECKEL H, DÖRFER C, PARIS S. Attitudes and Behaviour regarding Deep Dentin Caries Removal: A Survey among German Dentists. *Caries Res,* 2013; **47**: 566–573.

SPERANDIO M, SOUZA JB, OLIVEIRIA DT. Effect of gamma radiation on dentin bond strenght and morphology. *Braz Dent J.* 2001;**12**: 205-8.

THOMAS RZ, RUBEN JL, BOSCH JJ, HUYSMANS MCDNJM. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization *in vitro*. *Journal of dentistry*. 2007; **35**: 547–551.

THOMPSON V, CRAIG RG, CURRO FA, GREEN WS, SHIP JA. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review, *J Am Dent Assoc*. 2008; **139**:705-712.

VIEIRA AR. Genetics and caries: prospects. *Braz. oral res*. 2012; **26**: 7-9.

WILLIAMS JA, PEARSON GJ, COLLES MJ, WILSON M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 2003; **37**: 190-193

WILSON BC, PATTERSON MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 2008; **53**: 61–109.

WILSON M, BURNS T, PRARTEN, J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agente. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996; **37**: 377-381.

WOOD S, METCALF D, DEVINE D, ROBINSON C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006; **57**: 680-684.

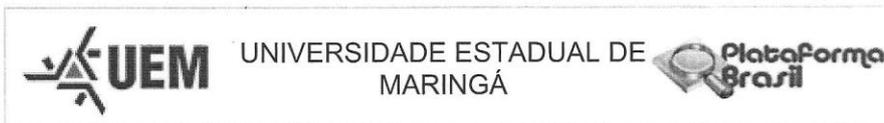
YASSEN GH, PLATT JA, HARA AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *Journal of oral science*. 2011; **53**:273-282.

ZANIN ICJ, BRUGNERA JUNIOR A, ZANI F, GONÇALVES RB. Terapia fotodinâmica na odontologia (T.F.D.). *RGO*. 2003; **51**: 179-182.

ZANIN ICJ, LOBO MM, RODRIGUES LKA, PIMENTA LAF, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*. 2006; **114**: 64-69.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA DE CORANTES E DA LUZ HALÓGENA UTILIZADAS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Pesquisador: Mitsue Fujimaki Hayacibara

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 14398113.2.0000.0104

Instituição Proponente: Núcleo/Incubadora Unitrabalho

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 448.028

Data da Relatoria: 07/10/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa com finalidade acadêmica, sob orientação da pesquisadora supra-identificada.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos primários da pesquisa são: (1) avaliar in vitro a profundidade de penetração da eritrosina e do rosa de bengala em dentina pela técnica da espectroscopia fotoacústica e, (2) avaliar in vitro a profundidade de penetração de luz halógena em dentina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avalia-se que os possíveis riscos a que estarão submetidos os sujeitos da pesquisa serão suportados pelos benefícios apontados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta seus objetivos, hipóteses e metodologia de forma clara e concisa. Trata-se de um estudo in vitro no qual serão utilizados dentes humanos e dentes bovinos para a avaliação da permeabilidade de corantes e da luz halógena utilizados na terapia fotodinâmica. Inicialmente será realizado um estudo piloto para uma avaliação inicial da permeabilidade dentinária. Está previsto o

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 **Fax:** (44)3011-4518 **E-mail:** copep@uem.br

A handwritten signature or set of initials in dark ink, located in the bottom right corner of the page.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
MARINGÁ



Continuação do Parecer: 448.028

uso de 44 amostras de dentes humanos, fornecidas pelo Banco de Dentes da UEM. O orçamento apresentado é de R\$ 28,00, para itens de custeio, com indicação de financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Anexados ao projeto de pesquisa, encontram-se: Folha de rosto, devidamente assinada pela pesquisadora responsável e pelo responsável institucional (chefe do departamento de Odontologia); Declaração do Banco de dentes Humanos da UEM, assegurando o fornecimento das amostras necessárias para a pesquisa; Pedido de dispensa de apresentação de TCLE, cuja justificativa considera-se adequada e suficiente.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá é de parecer favorável à aprovação do protocolo de pesquisa apresentado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Face ao exposto e considerando a normativa ética vigente, este Comitê se manifesta pela aprovação do protocolo de pesquisa em tela.

MARINGÁ, 06 de Novembro de 2013

Assinador por:
Ricardo Cesar Gardiolo
(Coordenador)

Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética e Biossegurança
Michella Siqueira de Brito Carnaffo

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário CEP: 87.020-900
UF: PR Município: MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4444 Fax: (44)3011-4518 E-mail: copep@uem.br

ANEXO 2

PROTOCOLO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Ensaio de biofilme com Streptococcus mutans – não radioativo

Modelo de formação de biofilme de *S. mutans* UA159 usando blocos de dentina revestidos com saliva

Procedimentos para o preparo do biofilme

Reagentes:

- Meio de baixo peso molecular (em inglês, Low Molecular Weight - LMW)
- Glicose a 20% (em H₂O)
- Sacarose a 20% (em H₂O)
- Tampão AB (Adsorption Buffer) – [50 mM KCl; 1.0 mM KPO₄; 1.0 mM CaCl₂; 0.1 mM MgCl₂ – pH = 6,5]
- 0.89% NaCl (em H₂O)
- 0.1 M PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (guardar na geladeira. Aquecer antes do uso. Expira em 9 meses). Não esterilizar. Dissolver em etanol ou álcool isopropílico.

Todas essas soluções devem ser estéreis. Para esterilizar o tampão AB, sacarose a 20% e glicose a 20%, filtrar através de filtro de seringa (PES – Syringe Filters – K18-230, KASVI®, PES membrane pore size 0,22 µm, max pressure: 4,5 bars/ 67,5psi).

Trabalhar asépticamente atrás da chama. Não autoclavar o tampão AB e a sacarose a 20%.

1) Dia antes do experimento – Preparo da Cultura “Starter”:

- Pipetar 9,5 ml do meio LMW + 0,5 ml de glicose a 20% em um tubo Falcon de centrífuga de 15ml.
- Transferir de 5 a 10 colônias de *S. mutans* UA159 (tiradas aleatoriamente de uma placa com menos de 1 mês) e inocular o meio. Deixar crescer durante a noite (incubado por 18h a 37°C, 5% de CO₂).

2) Primeiro dia do experimento (Dia 0):

2.1) Preparo do inóculo de bactéria para formação do biofilme

Preparar 9,5 ml de meio LMW + 0,5 ml de glicose a 20%, em tubos de vidro com rosca (pirex) estéreis, obtendo 2 tubos, onde um será o inóculo e o outro o BLANK. Após as 18h de incubação da cultura “starter”, remover 0,5 ml do inóculo e acrescentar 0,5 ml da cultura “starter”. Feito isto, medir a absorbância do inóculo, utilizando primeiro o BLANK para zerar, e depois o tubo do inóculo. A leitura da absorbância deve ser feita em 600nm, e os tubos devem estar limpos e sempre na mesma posição. Geralmente esta leitura inicial será igual a

0,1 ou 0,09. Anotar o resultado e o horário, e incubar o inóculo com a tampa a meia rosca por 2h a 37°C e 5% de CO₂. Após as 2h de incubação, verificar a absorvância novamente e anotar. A absorvância tem que aumentar 0,5 do valor inicial, por exemplo, se o valor inicial foi de 0,170, o inóculo deve ficar incubado até sua absorvância for igual a 0,670 aproximadamente. Enquanto se espera o tempo de incubação pode-se seguir com o preparo da saliva. Quanto a absorvância necessária for atingida, deve-se transferir 80µl do inóculo para cada 20ml de meio (19ml de meio LMW + 1ml de sacarose a 20%).

2.2) Formação da película salivar:

- De manhã enxague sua boca com água estéril para remover detritos de comida e etc.

- Mastigue um pequeno pedaço de parafilme para estimular a produção de saliva.

****NOTA:** Certifique-se de usar dentifrício contendo apenas fluoreto de sódio como princípio ativo, tanto na manhã do experimento, quanto na noite anterior. Não usar Listerine ou colutórios que possuam agentes como o triclosan. Não coma nada pela manhã antes de coletar a saliva.

- Coletar os primeiros 5 mL de saliva e descarte.

- Coletar o volume desejado de saliva. SEMPRE A MANTENDO NO GELO.

- Misturar a saliva com tampão AB na proporção de 1:1 (v/v). Adicionar 0.1 M PMSF na proporção de 1:1000 (concentração final 0,1 mM PMSF). Exemplo: para 9ml de saliva, acrescentar 9ml de tampão AB e 18µl de 0,1 PMSF. Não adicionar NaN₃.

- Armazenar a solução em um tubo Falcon de 50ml. Centrifugar por 10 minutos, a 6350 rpm, 4°C (Alegria TM 25R Centrifuge). Lembrar-se de colocar H₂O em outro tubo falcon de 50ml com peso equivalente, para balancear a centrífuga.

- Coletar o sobrenadante (toda a saliva clara), e filtrar através de filtro para seringa PES de 0,22 µm. Trabalhar de forma asséptica atrás da chama.

- > Enquanto se prepara a saliva, em uma placa de 96 poços de fundo côncavo, deixar os blocos de dentina mergulhados em H₂O estéril a temperatura ambiente de 20-30 minutos.

- > Com auxílio de uma pipeta, remover a H₂O estéril de cada poço, e pipetar a solução de saliva (aproximadamente 200 µl em cada poço). Feito isto, incubar a placa a 37°C por 1h em um agitador orbital.

- Depois de 1h de incubação em solução de saliva, remover com auxílio de uma pipeta o conteúdo de cada poço, e colocar tampão AB. Depois se remove a solução de tampão AB, e pipeta-se 200 µl do meio inoculado.

- Certificar se os blocos de dentina estão completamente submersos, mas não transbordando. Se o volume for muito alto, o meio estará em contato com a tampa da placa, correndo o risco de uma contaminação.

- > Coloque a placa contendo os blocos de dentina na incubadora (37°C, 5% CO₂) por 24 horas. O início da incubação é considerado Dia 0.

3) Depois de 24h (Dia 1) até 120h (Dia 5) de experimento

Mudança diária de meio

- Preparar meio LMW + 1% de sacarose SOMENTE (sem *mutans*), como descrito acima.
- Remover o meio de cada poço, e pipetar solução de tampão AB. Remover o tampão AB e pipetar o meio novo (sem *mutans*) em cada poço.
- No dia 5 o meio não precisa ser trocado. Seja cuidadoso para não perturbar o biofilme.
- Retorne a placa para a incubadora (37°C, 5% CO₂).
- Repita estes passos em cada dia do experimento (depois do período de incubação de 24h). Sempre use técnicas assépticas.

4) Último dia de experimento (Dia 5)

-> Depois de 120h de formação de biofilme, remova com auxílio de pipeta o meio de cada poço. Feito isto, com auxílio de uma pinça, transfira os bloco de dentina para um frasco contendo NaCl a 0,89% estéril (um para cada bloco). Para dispersar o biofilme, coloque os frascos dentro de um béquer contendo água destilada, e coloque o béquer em banho ultrassônico (nível de água do béquer e do banho deve ser mais alto que a dos frascos com os blocos de dentina). Sonicar durante 10 minutos.

ANEXO 3

GRÁFICOS DO ESTUDO PILOTO 2

Avaliação da permeabilidade da dentina hidratada e desidratada e remoção da "smear layer" (n=6)

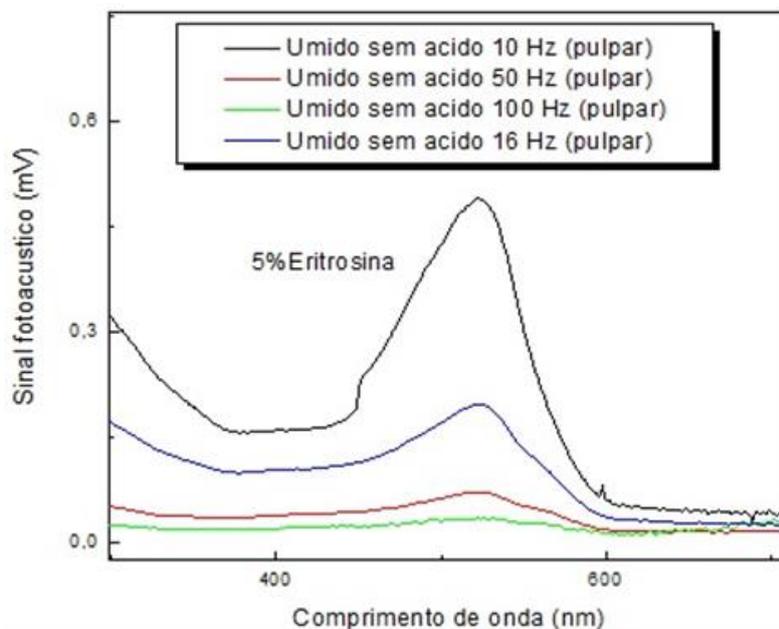


Gráfico 1. Dente hidratado (úmido), sem remoção da "smear layer" com aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 572 μm .

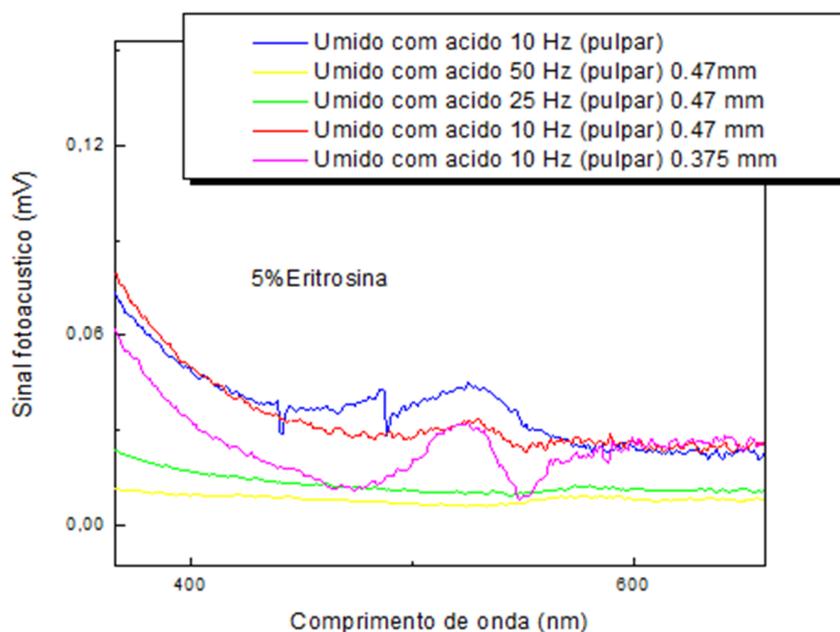


Gráfico 2. Dente hidratado (úmido), com remoção da "smear layer" com aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 290 μm .

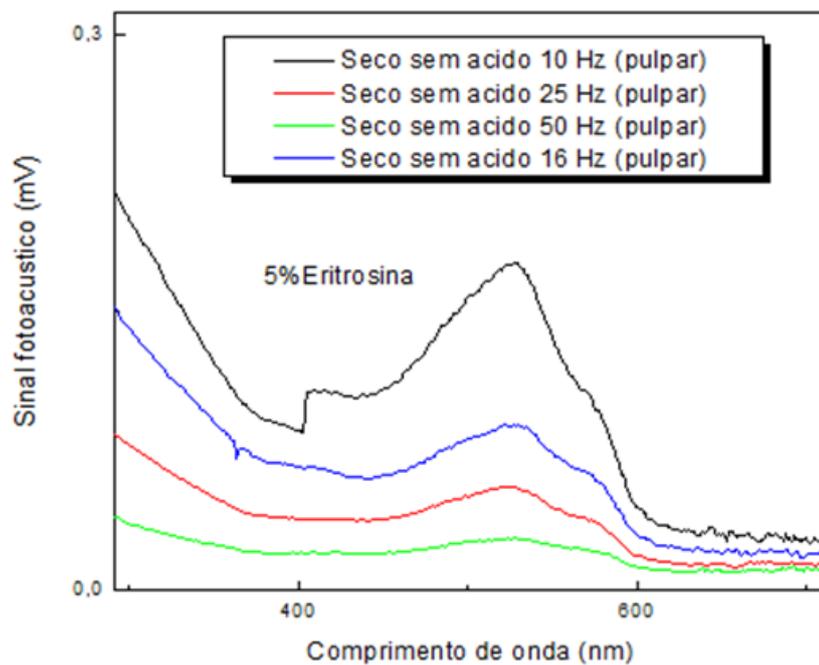


Gráfico 3. Dente desidratado (seco), sem remoção da “smear layer” com aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 560 μm .

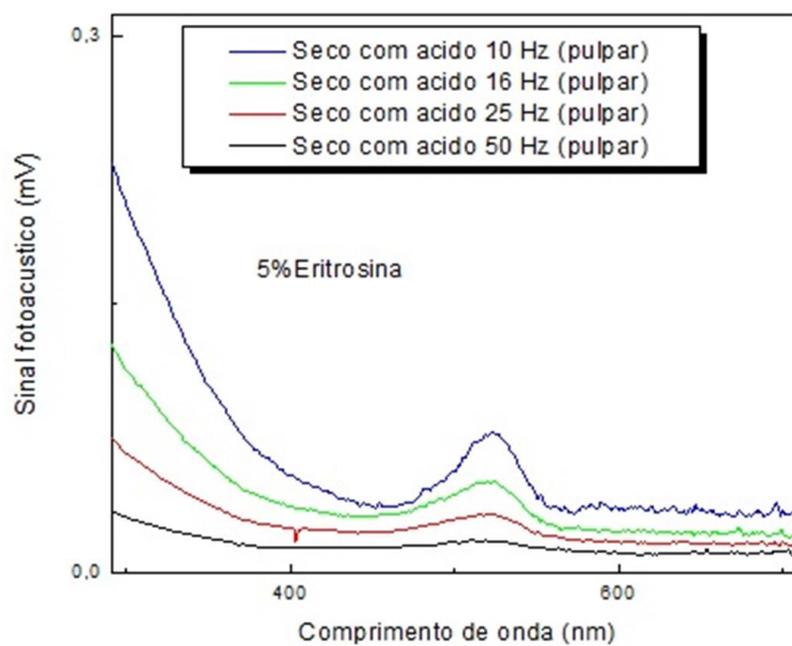


Gráfico 4. Dente desidratado (seco), com remoção da “smear layer” com aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 560 μm .

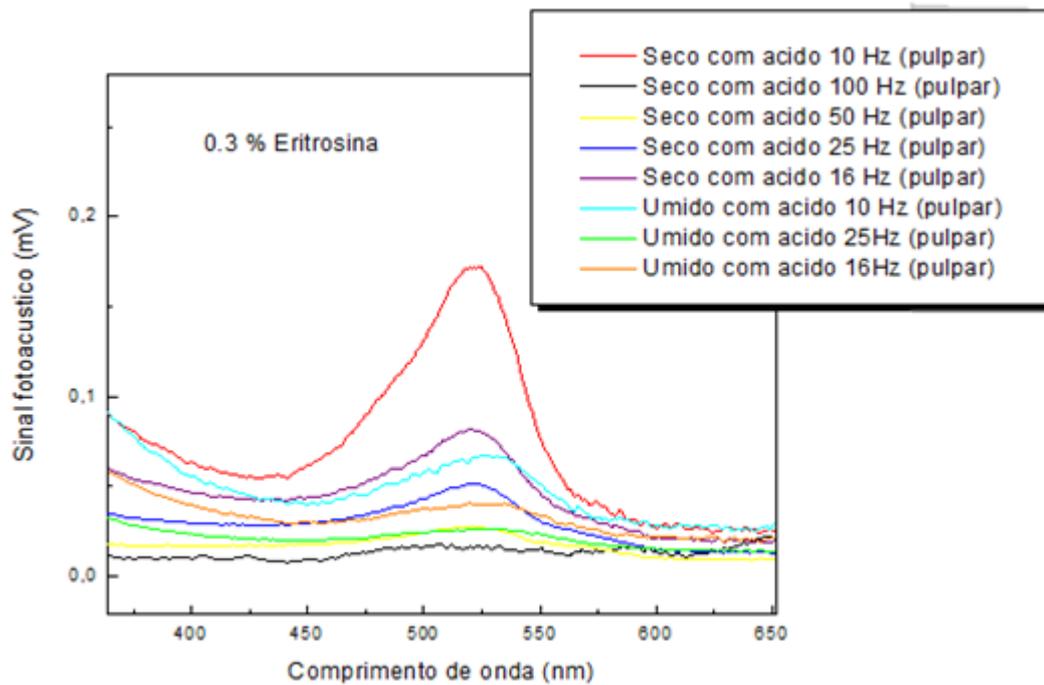


Gráfico 5. Dente desidratado (seco), com remoção da “smear layer” com aplicação de eritrosina a 0,3% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 572 μm . Dente hidratado (úmido), com remoção da “smear layer” com aplicação de eritrosina a 0,3% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 544 μm .

ANEXO 4

GRÁFICOS DO ESTUDO PILOTO 3
Avaliação da permeabilidade em diferentes
tempos de aplicação de eritrosina a 5% (n=6)

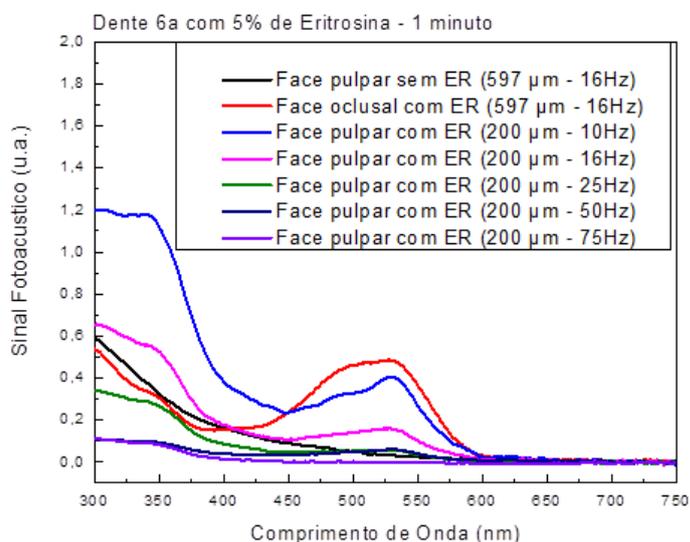


Gráfico 1. Dente 6 com aplicação de eritrosina a 5% por 1 minuto. O corante foi detectado em uma espessura de 144 μm .

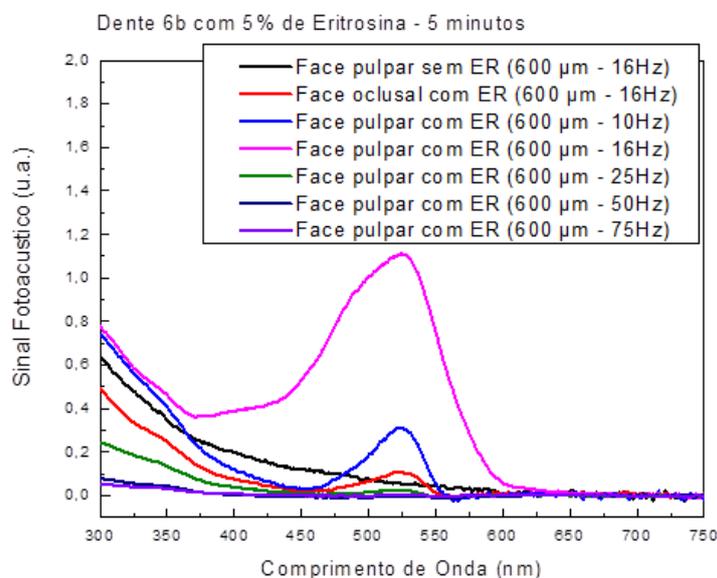


Gráfico 1. Dente 6 com aplicação de eritrosina a 5% por 5 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 544 μm .

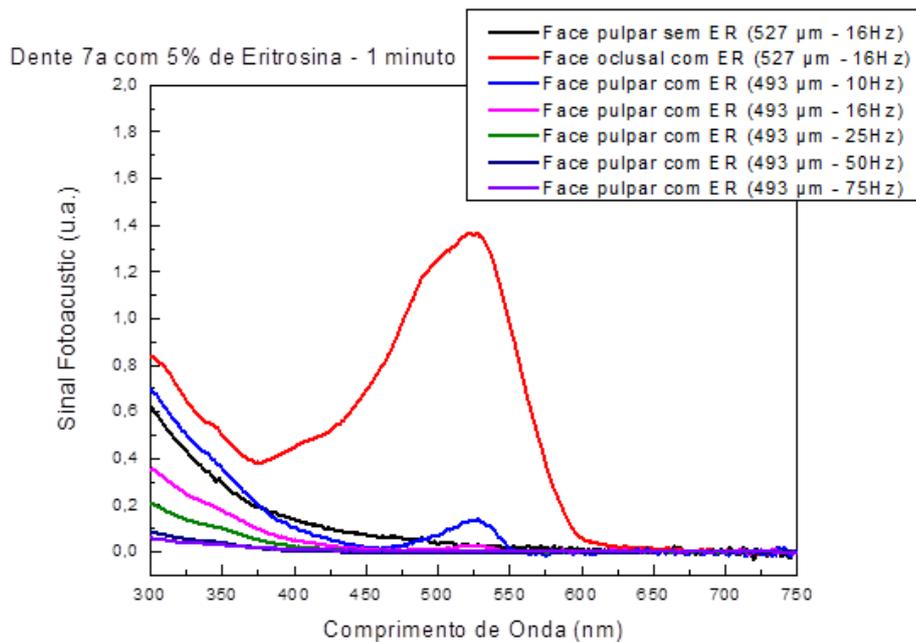


Gráfico 3. Dente 7 com aplicação de eritrosina a 5% por 1 minuto. O corante foi detectado em uma espessura de 457 μm .

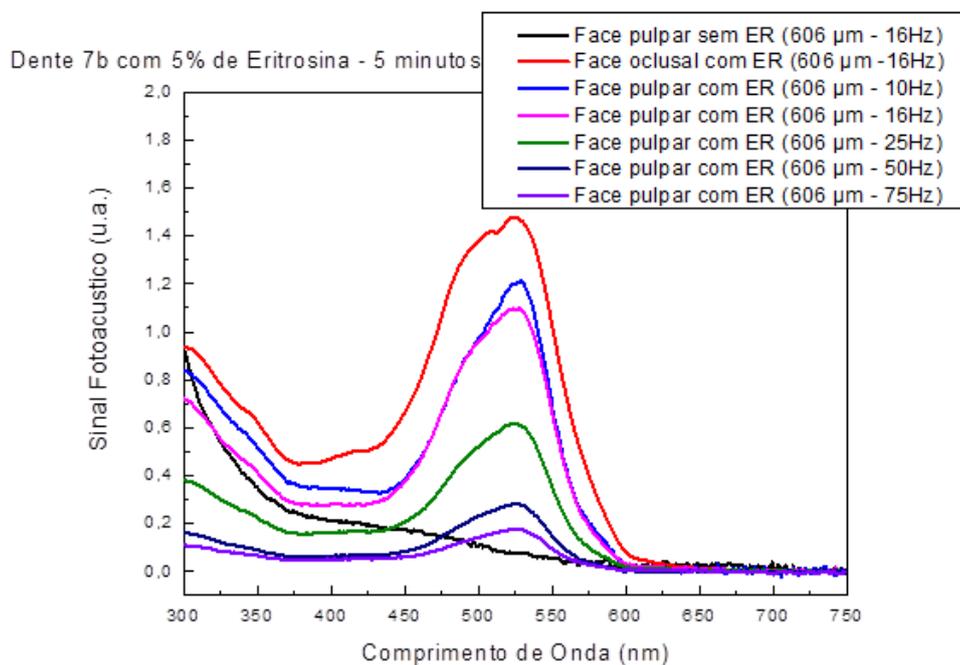


Gráfico 4. Dente 7 com aplicação de eritrosina a 5% por 5 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 578 μm .

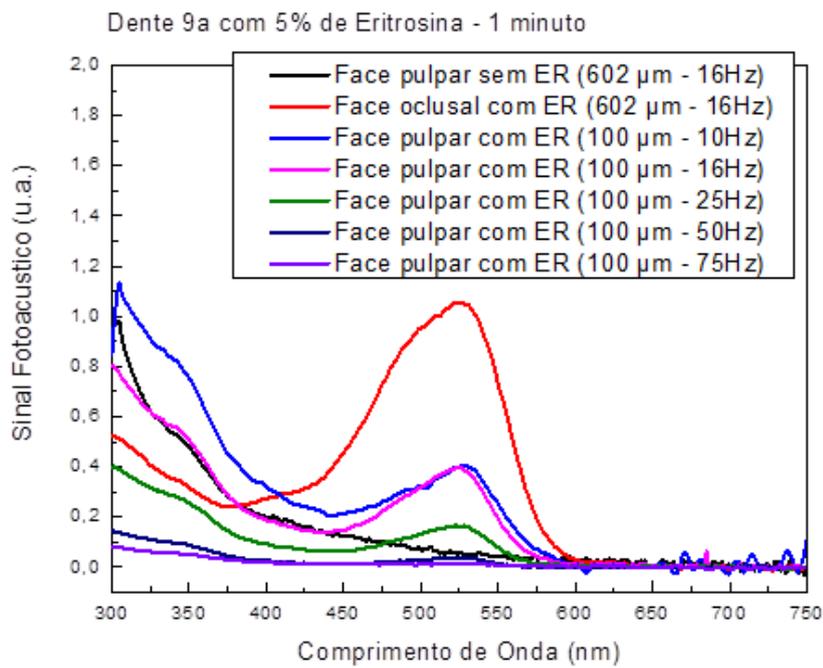


Gráfico 5. Dente 9 com aplicação de eritrosina a 5% por 1 minuto. O corante foi detectado em uma espessura de 60 μm .

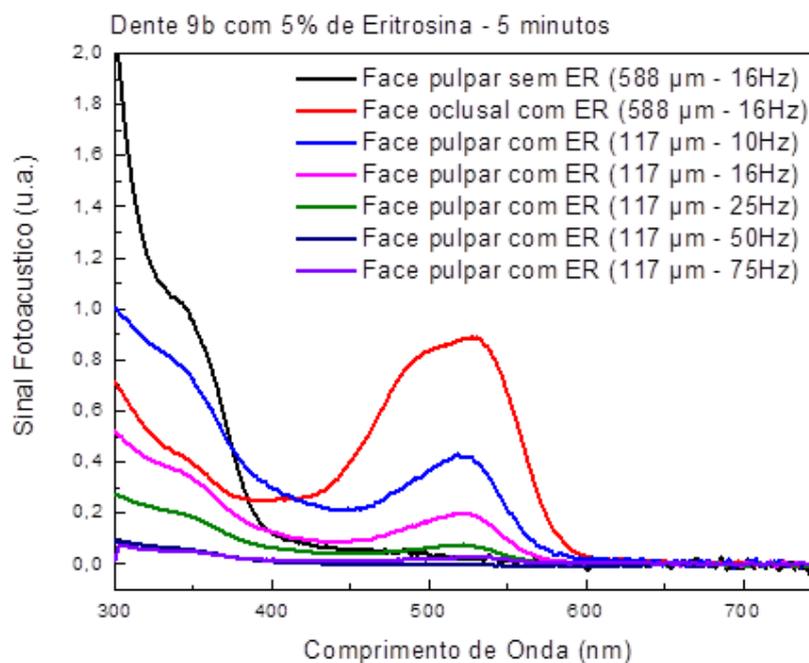


Gráfico 6. Dente 9 com aplicação de eritrosina a 5% por 5 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 61 μm .

ANEXO 5

GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 1

Avaliação da perda em espessura e da permeabilidade de eritrosina a 5% em dentes cariado durante 5, 7 e 10 dias (n=9)

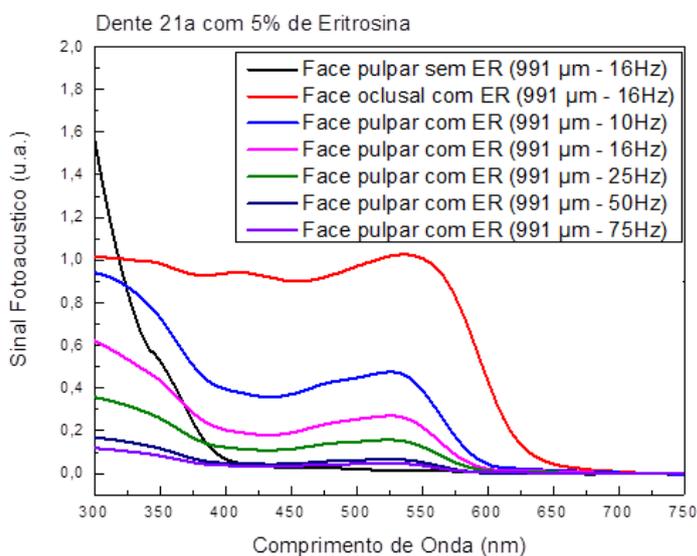


Gráfico 1. Dente 21a com formação de biofilme por 5 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 954 μm .

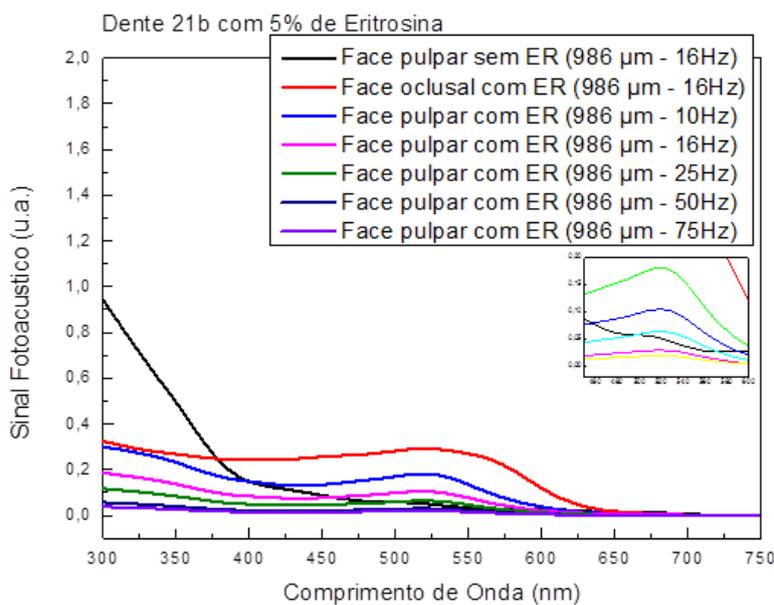


Gráfico 2. Dente 21b com formação de biofilme por 5 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 948 μm .

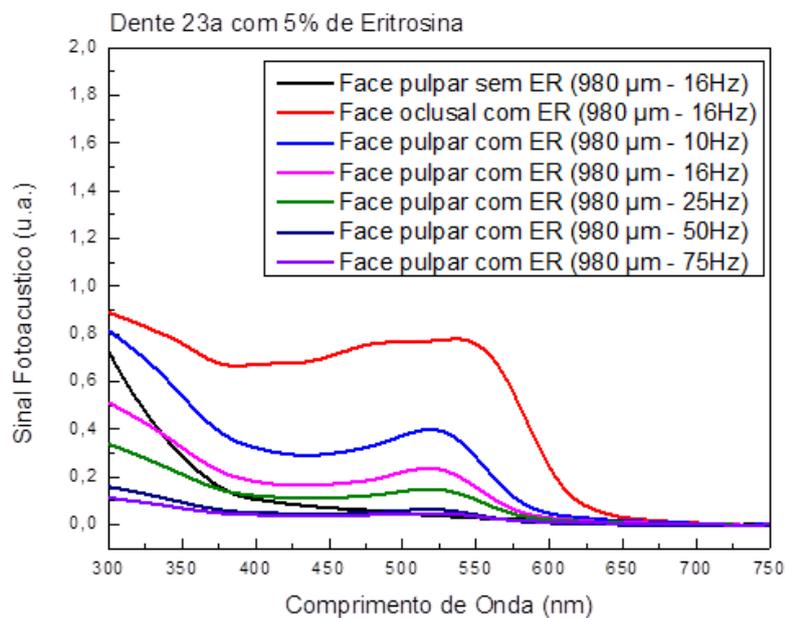


Gráfico 3. Dente 23a com formação de biofilme por 5 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 867 µm.

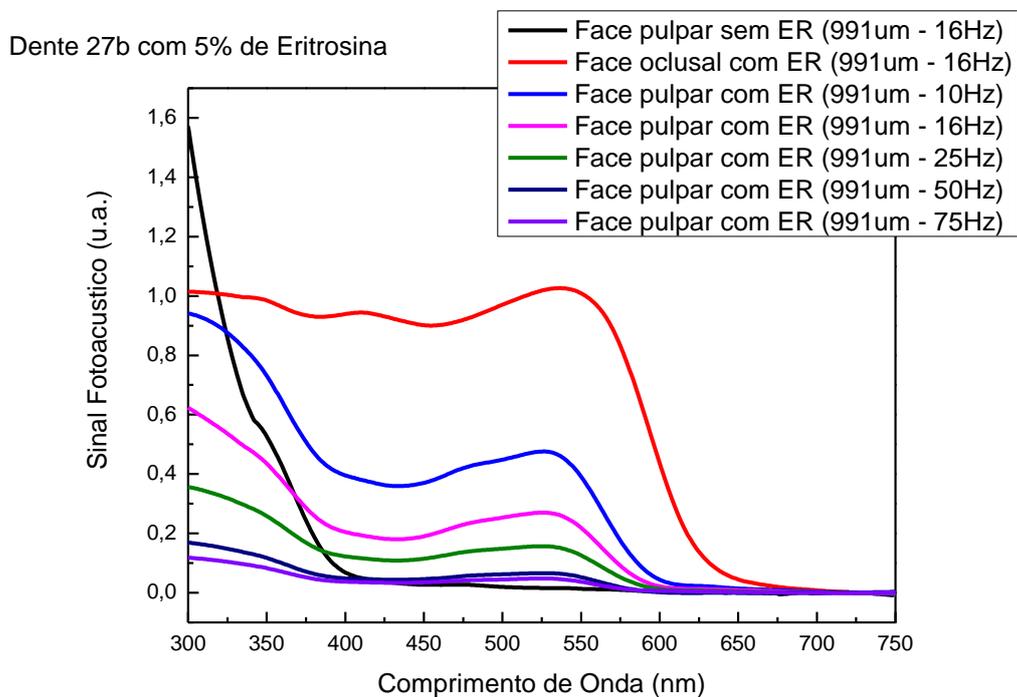


Gráfico 4. Dente 27b com formação de biofilme por 5 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 959 µm.

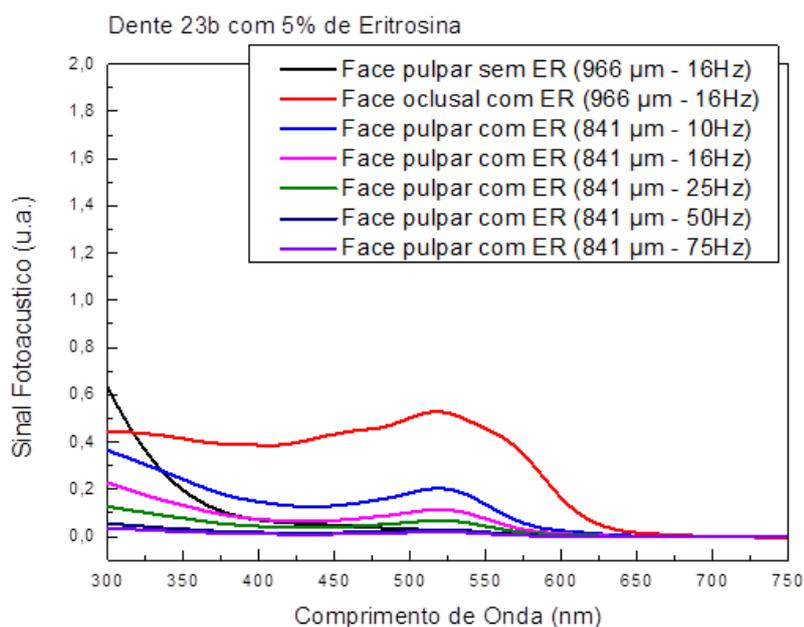


Gráfico 5. Dente 23b com formação de biofilme por 7 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 809 μm.

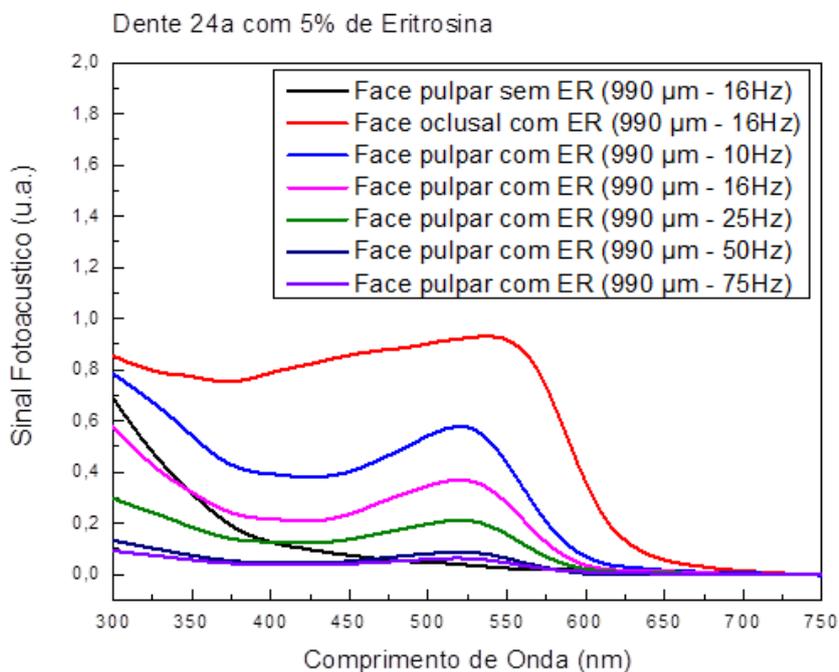


Gráfico 6. Dente 24a com formação de biofilme por 7 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 958 μm.

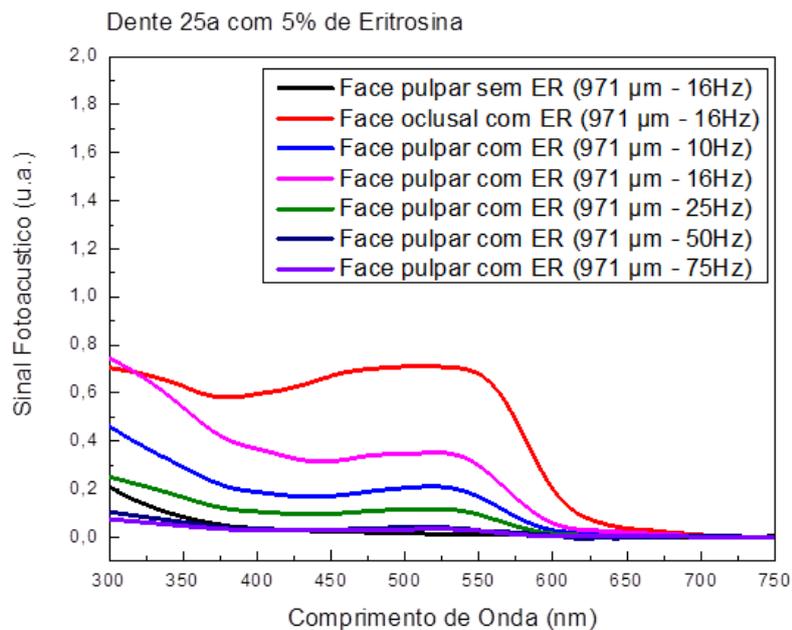


Gráfico 7. Dente 25a com formação de biofilme por 10 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 939 μm .

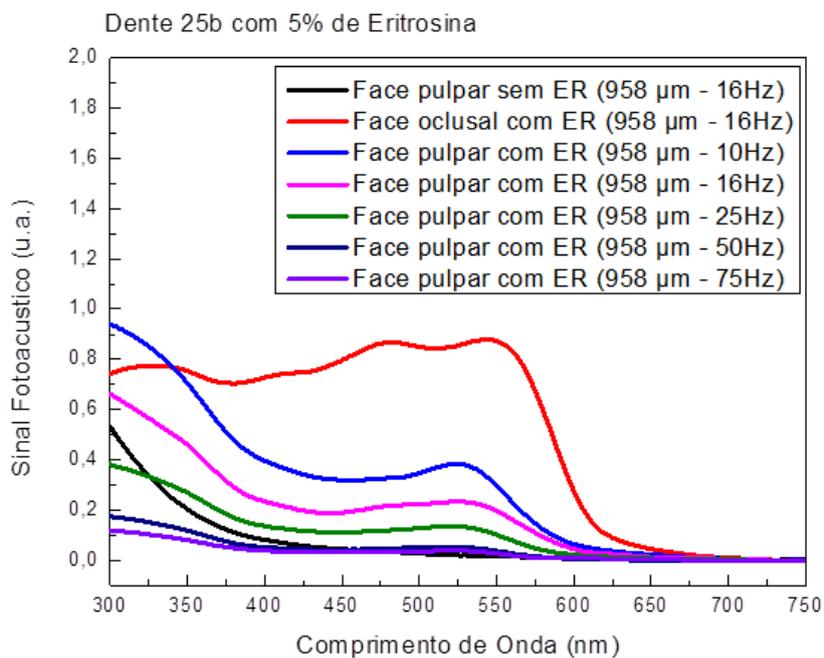


Gráfico 8. Dente 25b com formação de biofilme por 10 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 926 μm .

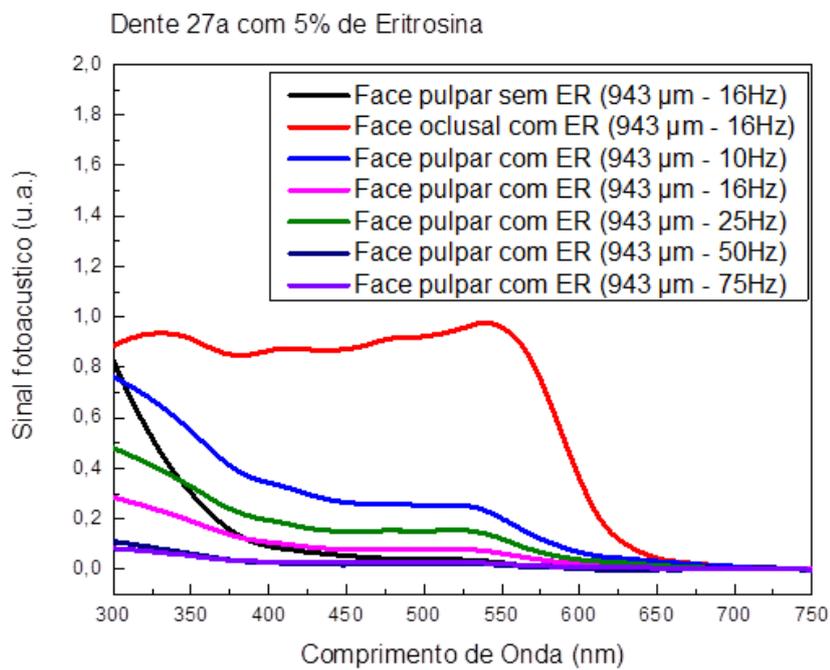


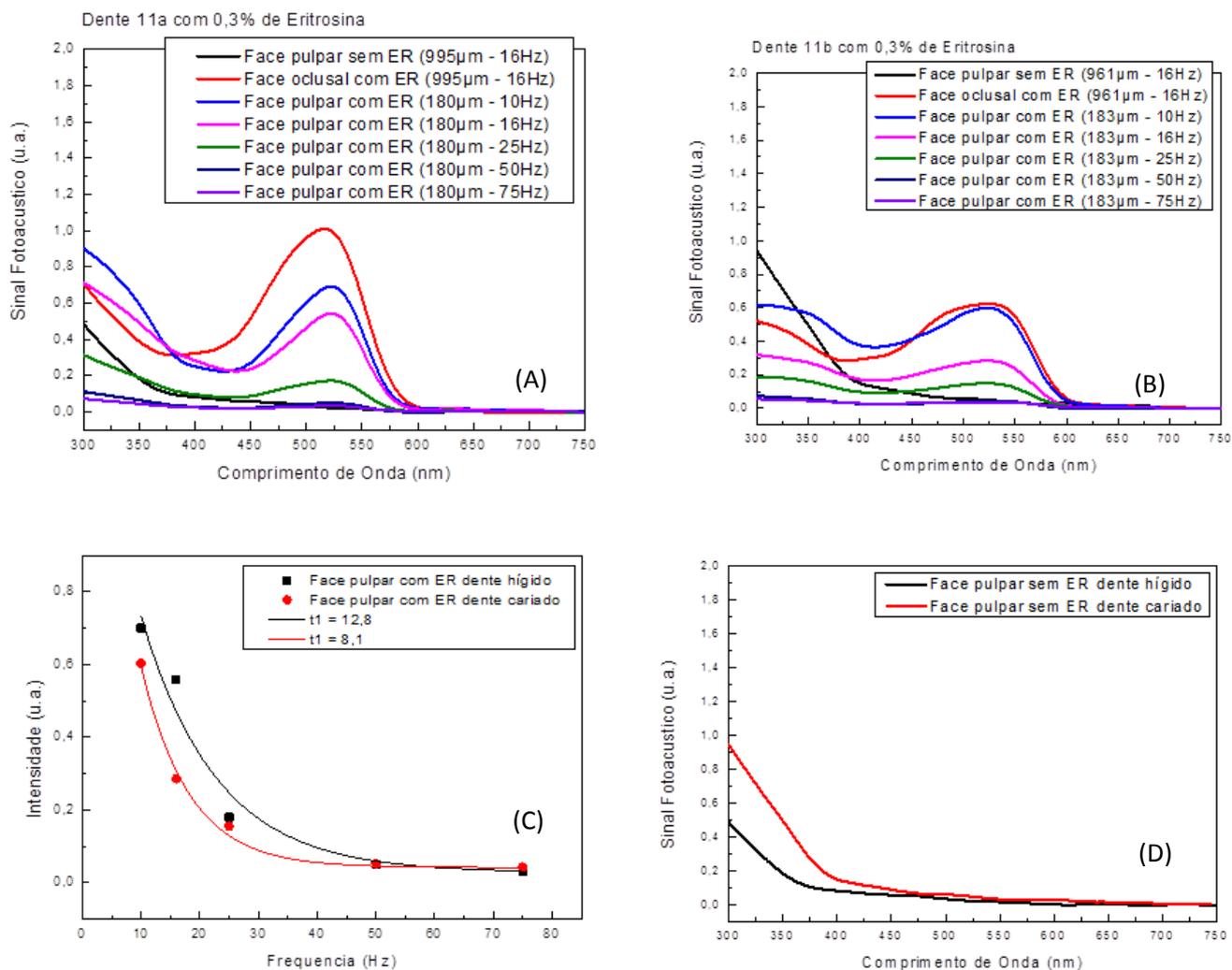
Gráfico 9. Dente 27a com formação de biofilme por 10 dias e aplicação de eritrosina a 5% por 30 minutos. O corante foi detectado em uma espessura de 911 μm .

ANEXO 6

GRÁFICOS DO EXPERIMENTO 2

Avaliação da permeabilidade de eritrosina a 0,3 e 5% em dentina hígida e dentina após formação de biofilme de *S. mutans* UA159 por 5 dias (n=22)

ERITROSINA 0,3 %



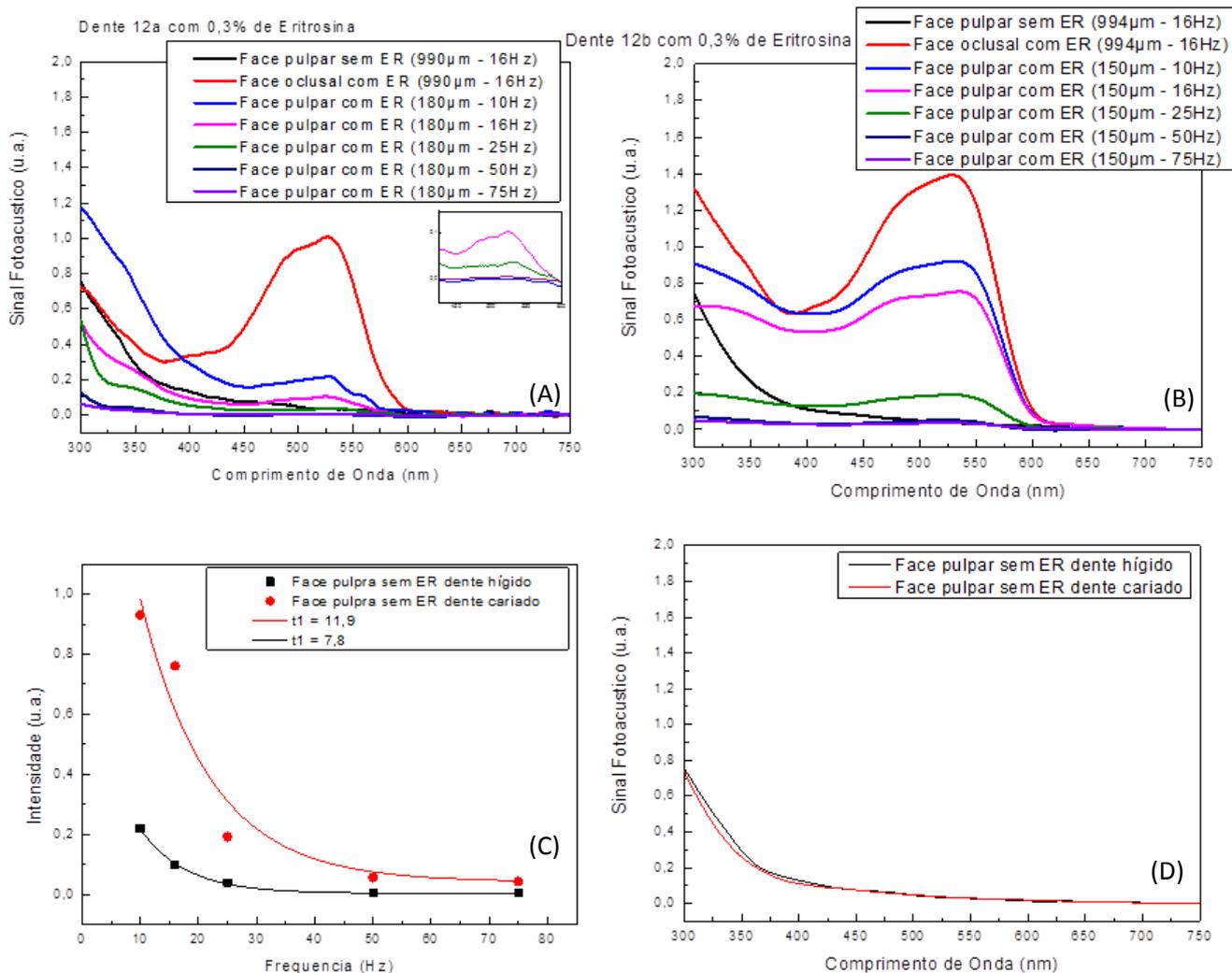
Dente 11

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 148 μm .

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 151 μm .

(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



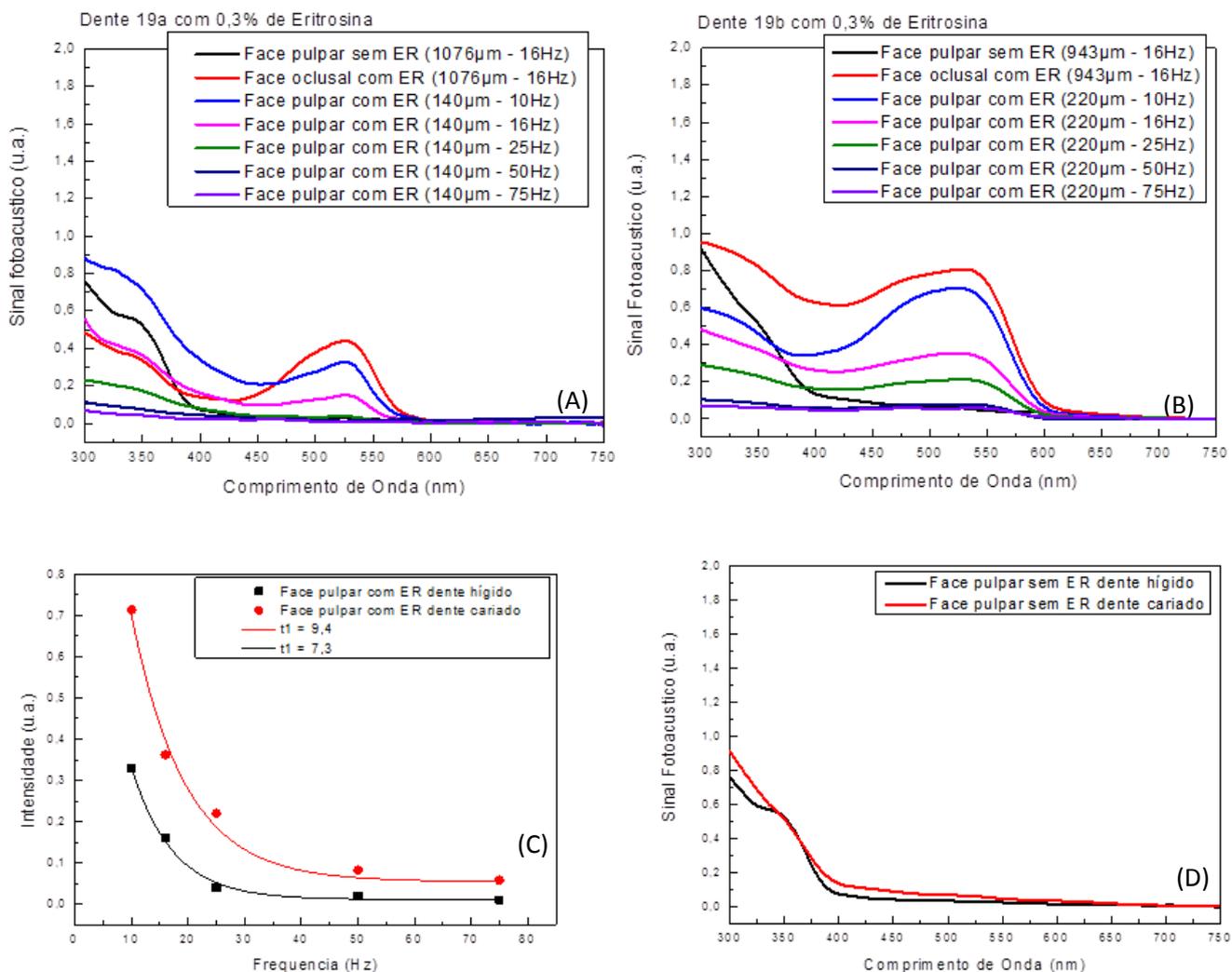
Dente 12

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 151 µm.

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 118 µm.

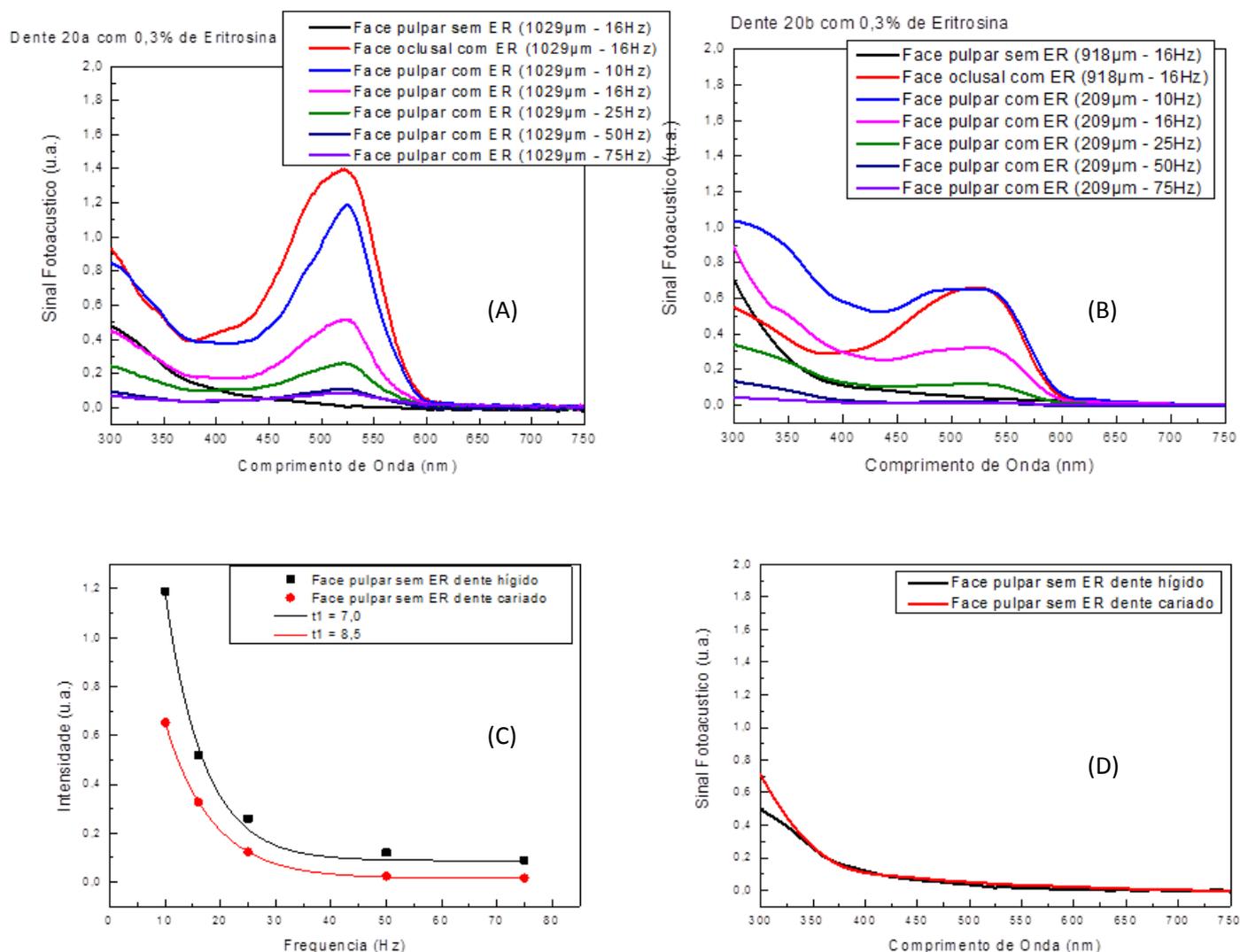
(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



Dente 19

- (A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 108 μ m.
 (B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 188 μ m.
 (C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).
 (D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



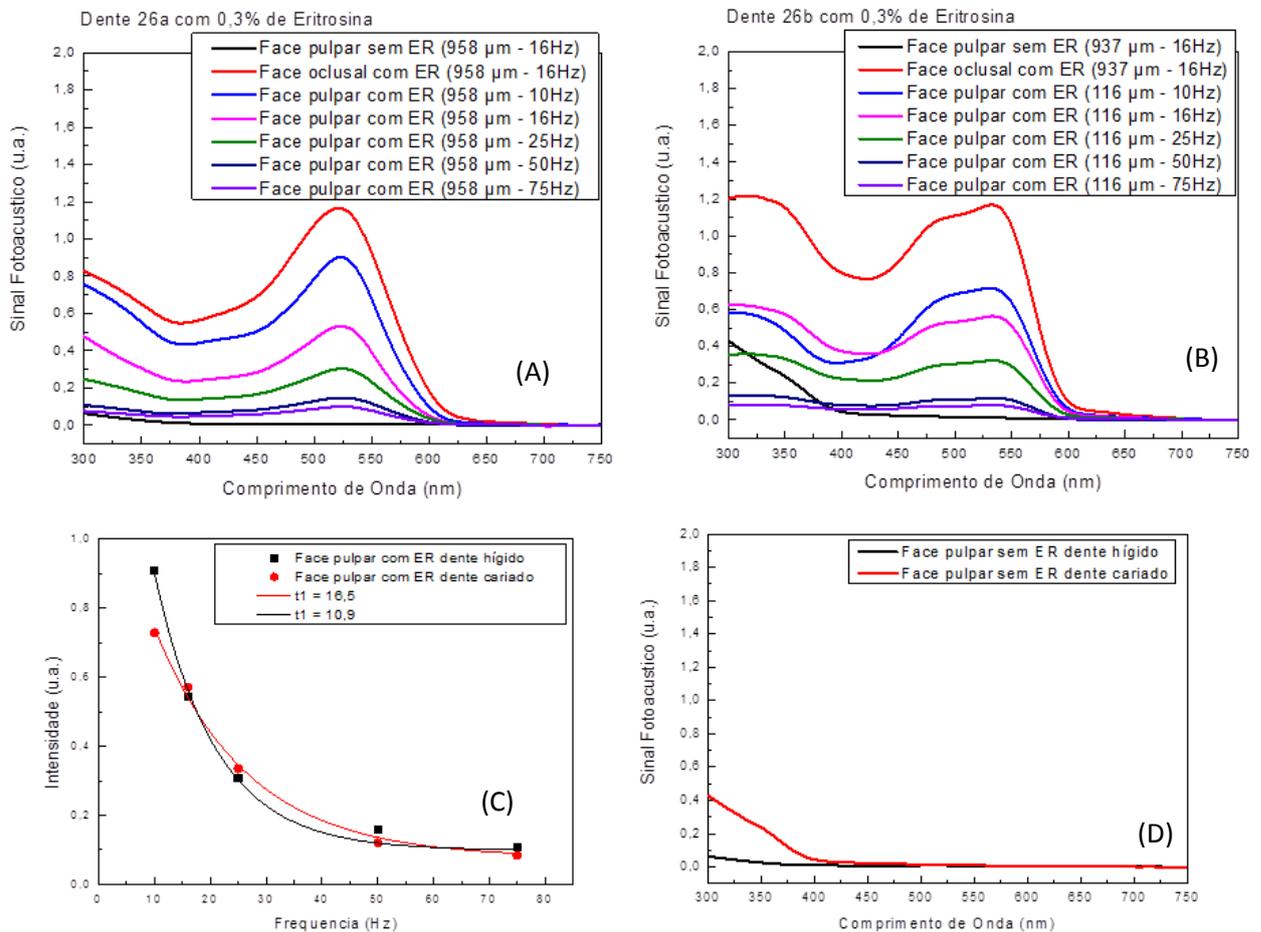
Dente 20

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 997 μ m.

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 117 μ m.

(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

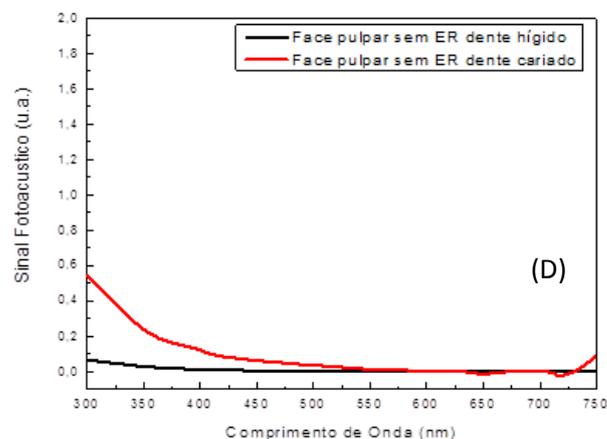
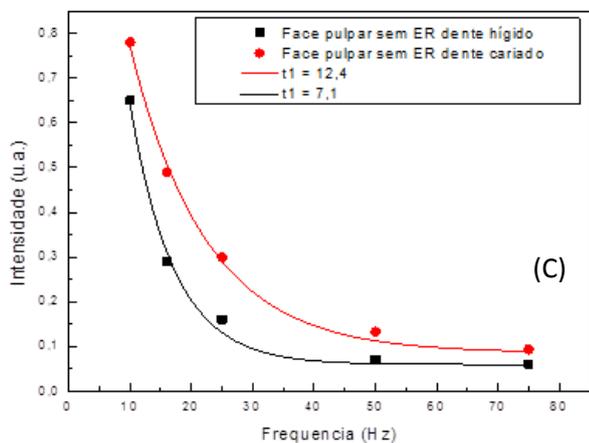
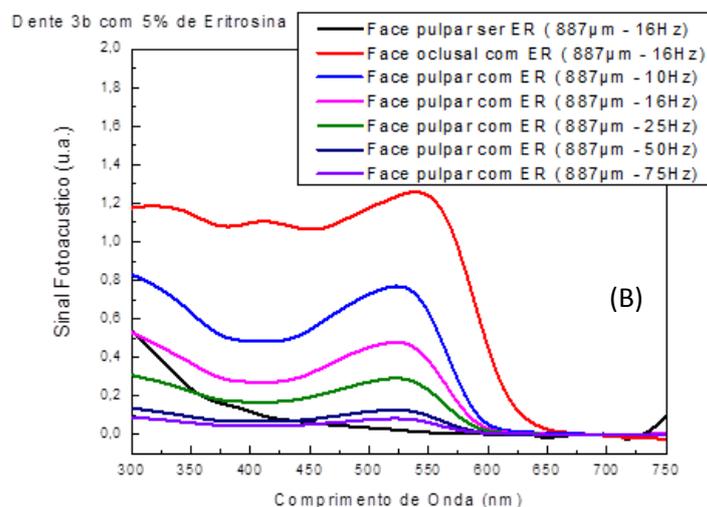
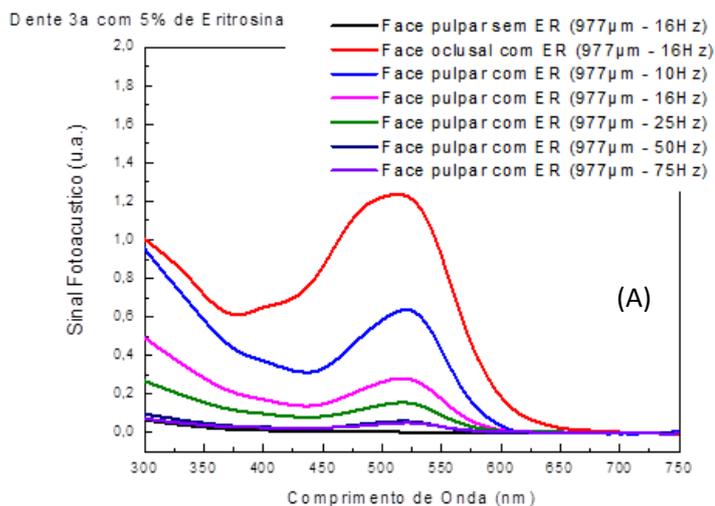
(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



Dente 26

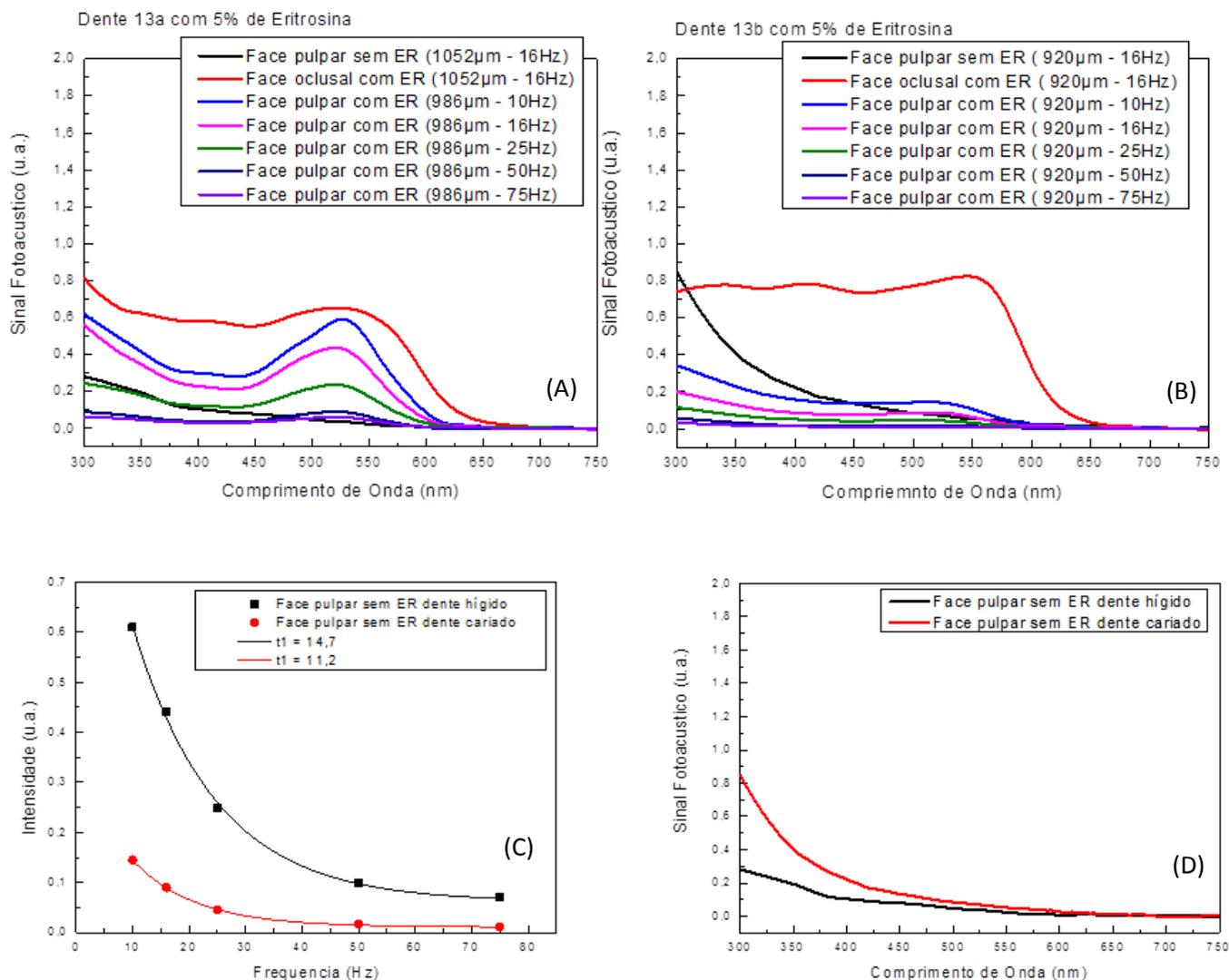
- (A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 926 μm .
 (B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 84 μm .
 (C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).
 (D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.

ERITROSINA 5 %



Dente 3

- (A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 945 μ m.
 (B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 855 μ m.
 (C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).
 (D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



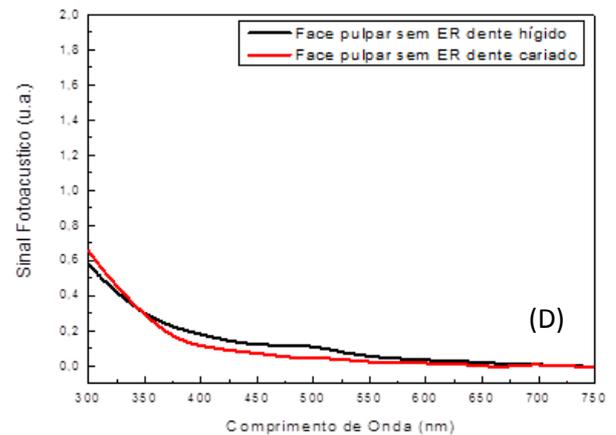
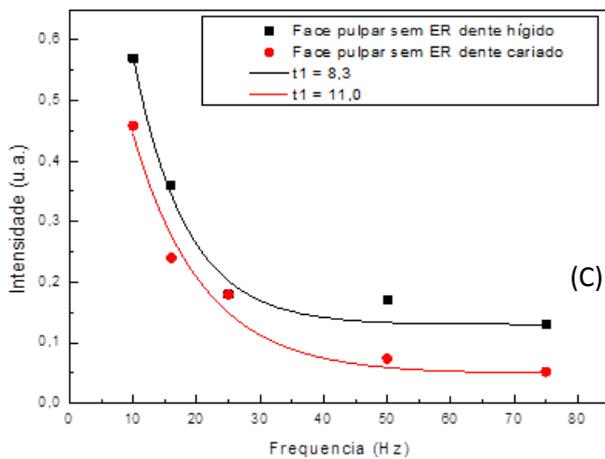
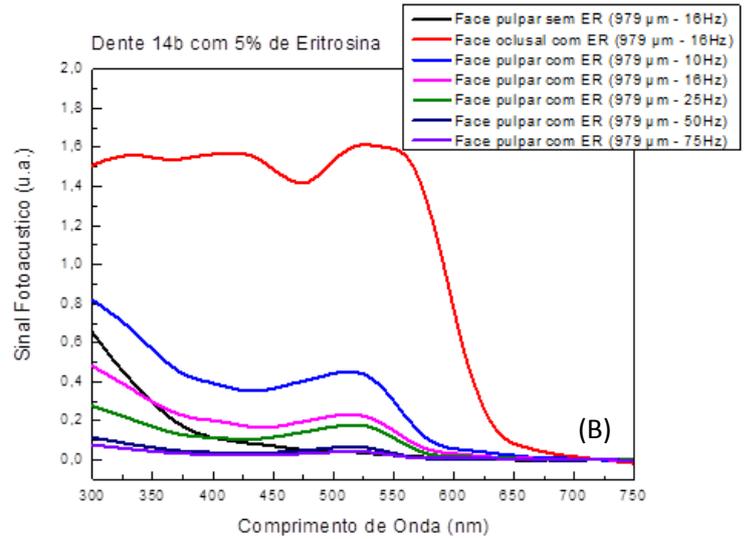
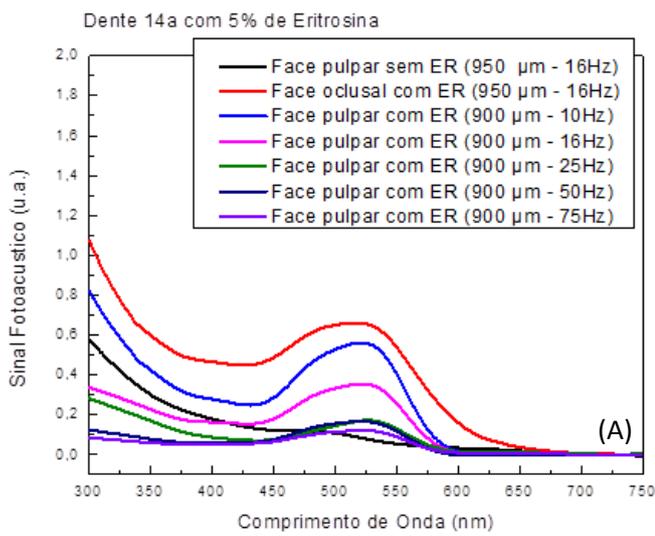
Dente 13

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 954 μ m.

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 888 μ m.

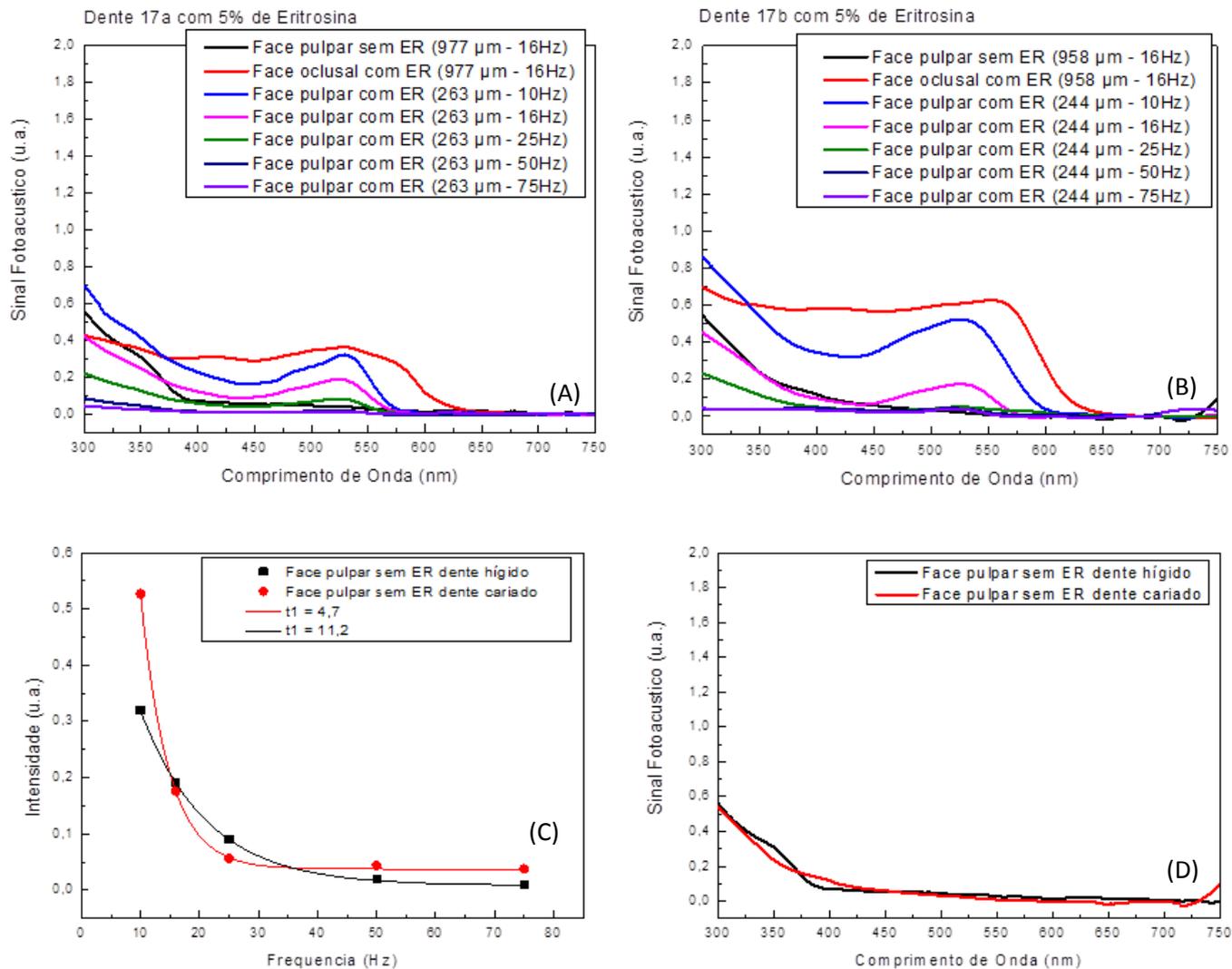
(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



Dente 14

- (A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 868 μm .
- (B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 947 μm .
- (C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).
- (D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



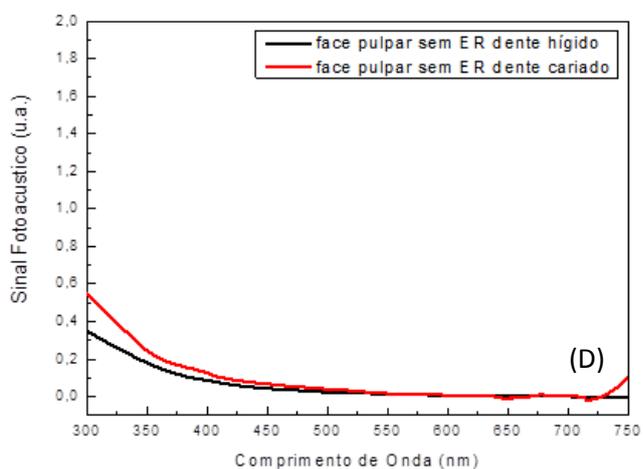
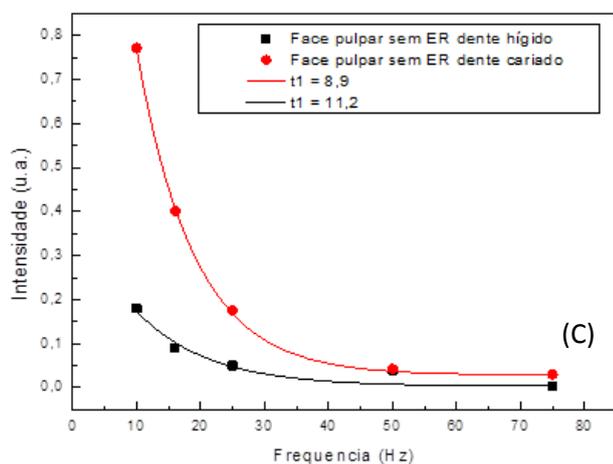
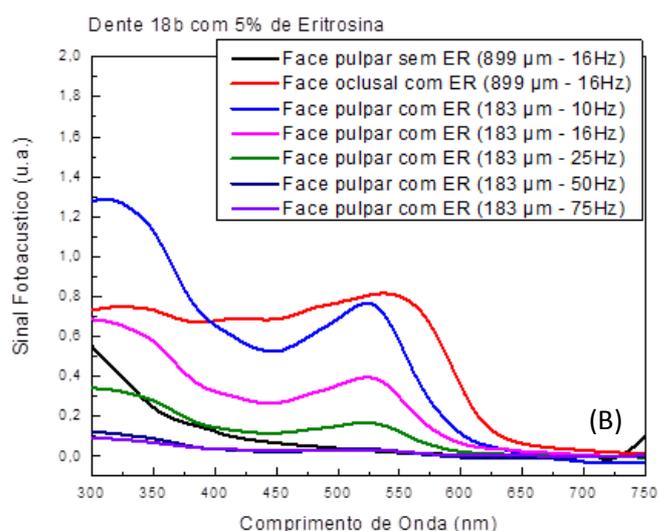
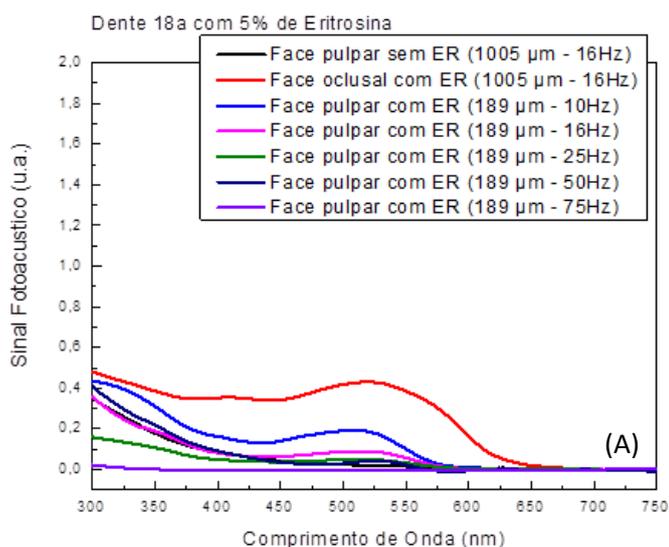
Dente 17

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 231 μm .

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 212 μm .

(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



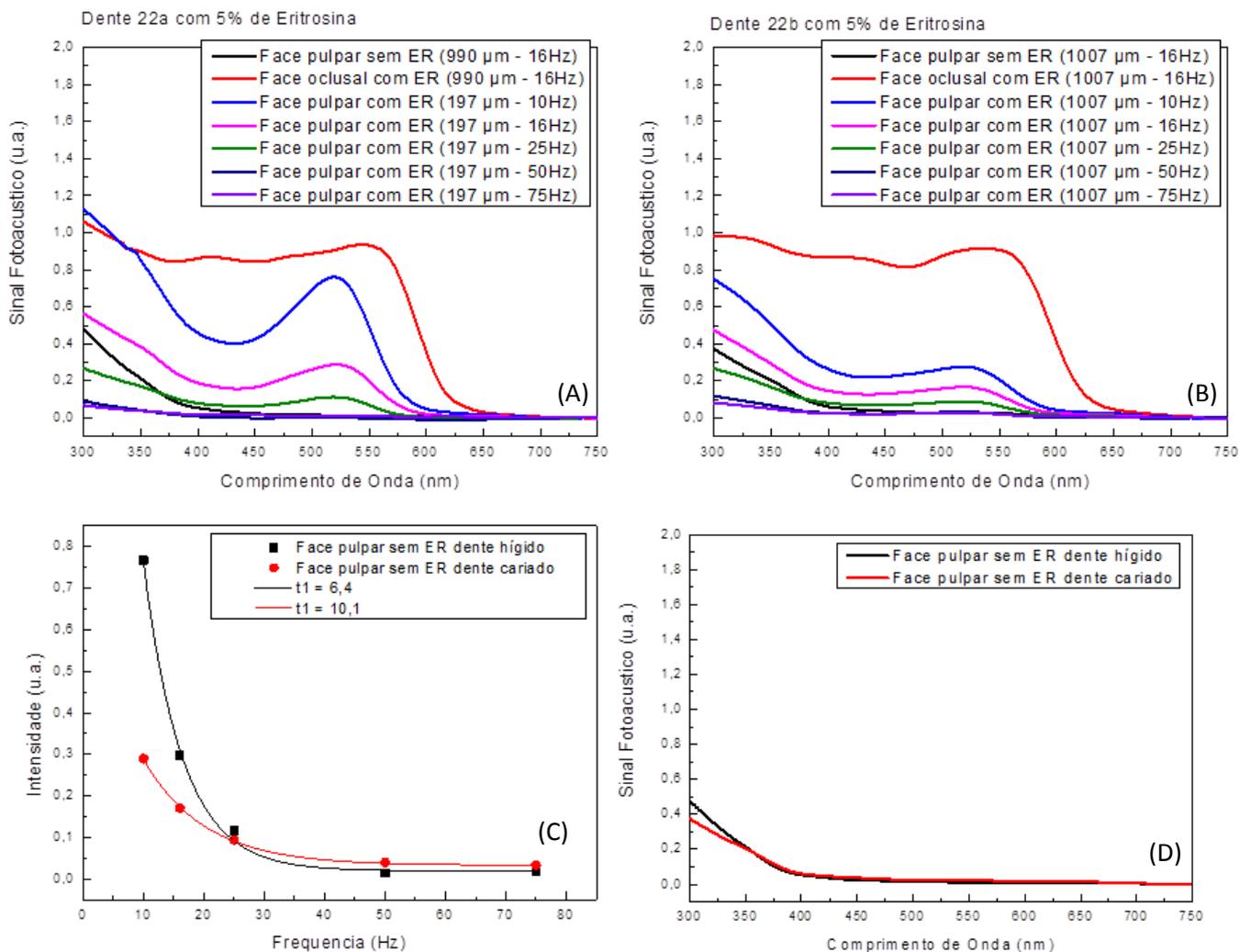
Dente 18

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 157 μm .

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 151 μm .

(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.



Dente 22

(A) Leituras em dentina hígida, com detecção do corante a partir de 165 μm .

(B) Leituras para o mesmo dente, porém neste caso a metade cariada, na qual o corante foi detectado a partir de 975 μm .

(C) Diferença na intensidade do sinal fotoacústico para o dente hígido (preto) e cariado (vermelho).

(D) Sinal fotoacústico da dentina hígida (preto) e cariada (vermelho) antes da aplicação do corante.